

Antifungal Duyarlılık Testleri

Ne Zaman alışılmalı? Nasıl Yorumlanmalı?

Dr Beyza Ener
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi
20. KLİMİK Kongresi
15.03.2019-Antalya

- ✓ İnvazif fungal enfeksiyonların insidansında artış
- ✓ Antifungal ajanların sayılarının artması
- ✓ Primer dirençli nadir ve kriptik türler
- ✓ Sekonder antifungal direncin klinik bir problem olarak görülmeye başlaması

Referans Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri

CLSI

- **CLSI M27** 4th edition 2017
 - *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans*
- **CLSI M44** 3rd Edition 2018
 - Bazı *Candida* türleri
- **CLSI M60** 1st Edition 2017
 - M27 ve M44 için ek döküman
- **CLSI M38** 3rd Edition 2017
 - *Aspergillus* tür kompleksleri, *Fusarium* tür kompleksleri, *Rhizopus* ve diğer *Mucorales* takımı, *Lomentospora prolificans*, *S. schenckii*-küf formu , esmer mantarlar ve dermatofitler
- **CLSI M51** 1st Edition 2010
 - *Aspergillus* tür kompleksleri, *Fusarium* tür kompleksleri, *Rhizopus* ve diğer *Mucorales* takımı, *Lomentospora prolificans*, *S. schenckii*-küf formu , esmer mantarlar ve dermatofitler
- **CLSI M61**: 1st Edition 2017
 - M38 ve M51 için ek döküman

Referans Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri

EUCAST

- EUCAST E.Def 7.3.1 (2017)
 - *Candida* ve *Cryptococcus neoformans*
- EUCAST E.Def 9.3.1 (2017)
 - Konidya oluşturan küf mantarları
- Rasyonel dokümanları
 - [WWW.eucast.org/antifungal suseptibility testing afst/rational documents for antifungals](http://WWW.eucast.org/antifungal_suseptibility_testing_afst/rational_documents_for_antifungals)
- EUCAST E.Def 10.1 (2018)
 - Azol direnç tarama plakları

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)

Minimum Efektif Konsantrasyon (MEK)

- Epidemiyolojik eşik değerler (WT, non-WT)
- Klinik sınır değerleri (S, SDD, I, R)
 - Türe göre
 - Yönteme göre
 - İnkübasyon süresine göre

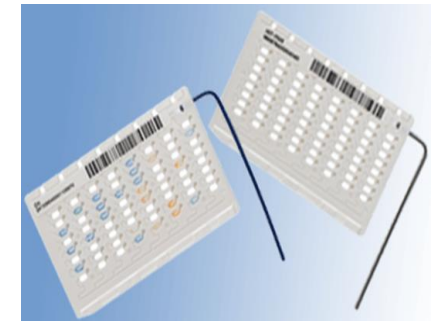
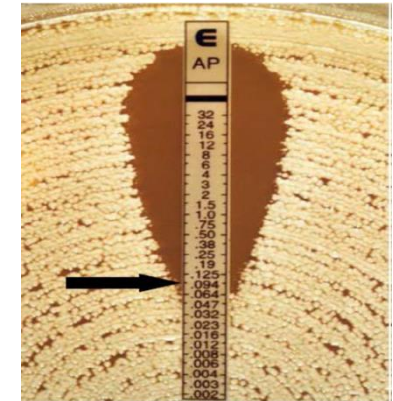
Species	Method	ECOFF (µg/ml)			CBP (µg/ml)					
		Fluconazole	Anidulafungin	Micafungin	Fluconazole		Anidulafungin		Micafungin	
					S ^b	R ^b	S	R	S	R
<i>C. albicans</i>	CLSI	0.5	≤0.12	≤0.03	2	4	0.25	0.5	0.25	0.5
	EUCAST	1	0.03	0.015	2	4	0.03	0.03	0.016	0.016
<i>C. glabrata</i>	CLSI	32	≤0.25	≤0.03	0.002	32	0.12	0.25	0.06	0.12
	EUCAST	32	0.06	0.03	0.002	32	0.06	0.06	0.03	0.03
<i>C. parapsilosis</i>	CLSI	2	≤4	≤4	2	4	2	4	2	4
	EUCAST	2	4	2	2	4	0.002	4	0.002	2
<i>C. tropicalis</i>	CLSI	2	≤0.12	≤0.12	2	4	0.25	0.5	0.25	0.5
	EUCAST	2	0.06	0.06	2	4	0.06	0.06	NA ^c	NA
<i>C. krusei</i>	CLSI	64	≤0.12	≤0.12	– ^d	–	0.25	0.5	0.25	0.5
	EUCAST	128	0.06	0.25	–	–	0.06	0.06	NA	NA

Referans yöntemler ile yaşanan zorluklar

- Zaman alıcı /emek yoğun ve ham madde bulma zorluğu olan yöntemler
 - Mikofungin dışındakileri ticari bulmak mümkün
 - Laboratuvarlar arası farklılıktan dolayı Kaspofunginin in-vitro antifungal duyarlılıkta kullanılmaması
 - Az bir ham madde ile çok uzun süre idame edilebilir
 - Başlangıç antifungal tedaviye sınırlı katkı
- **MİK okumasındaki subjektivite**
- Bazı türlerle ve antifungaller yaşanan kötü in-vitro/in vivo korelasyon
- CLSI ve EUCAST sınır değerlerindeki farklılıklar

FDA Tarafından Onaylanan Üç ticari Sistem

- Sensititre YeastOne Colorimetric Plate (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH)
- Agar gradiyet metot (Etest; bioMerieux)
- Vitek 2 yeast susceptibility test (bioMerieux, Inc., Marcy l' Etoile, France)



Valide Ticari Sistemlerin Değerlendirilmesi

Accuracy of Sensititre YeastOne echinocandins epidemiological cut-off values for identification of *FKS* mutant *Candida albicans* and *Candida glabrata*: a ten year national survey of the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS)

Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) 1214.e1–1214.e4

Comparison of Three Statistical Methods for Establishing Tentative Wild-Type Population and Epidemiological Cutoff Values for Echinocandins, Amphotericin B, Flucytosine, and Six *Candida* Species as Determined by the Colorimetric Sensititre YeastOne Method

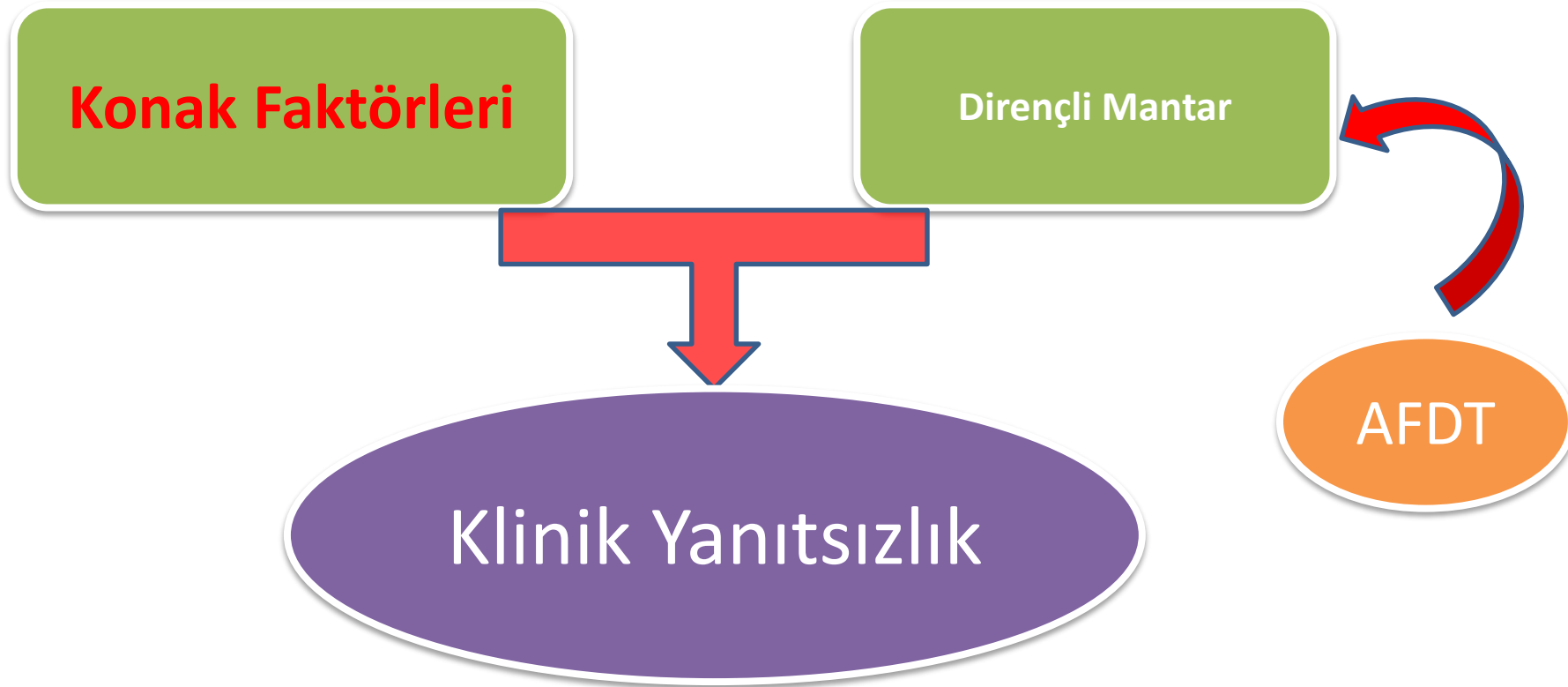
Journal of Clinical Microbiology

doi:10.1128/JCM.01730-12

- Merkeze giderken;
 - Laboratuvarda hangi AFDT kullanılıyor
 - Referans yöntem ise;
 - Mikrobiyoloji uzmanının deneyimi ????
 - Ticari yöntem ise;
 - FDA onaylılar dışında ise hiç dikkate alma !!!!
- FDA onaylı bir sistem ise;
 - Sensititre en güvenilir. Kendi epidemiyolojik eşik değerleri oluşturuluyor. MİK yorumunda tercihan bunlar kullanılmalı
 - Etest
 - Vitek 2 yeast susceptibility test: Cihazın kendi yorumu manuel yorum yapmak da mümkün.

Dirençli suşlar mutlaka referans yöntemlerden biri ile doğrulanmalı

Antifungal Direncin Fiziksel Tek Ölçümü In Vitro Duyarlılık Testleri



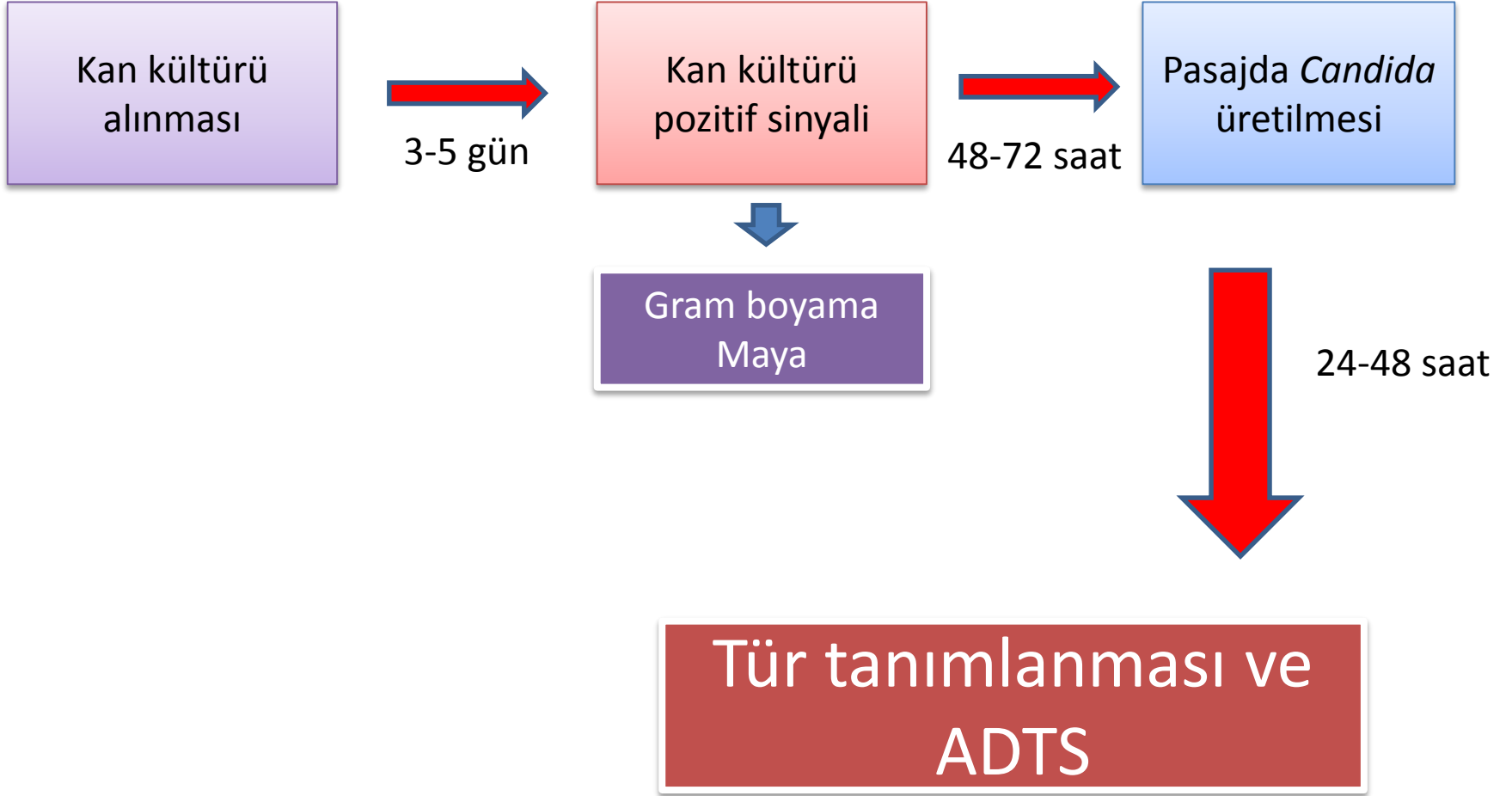
Mantar Enfeksiyonlarının Tedavisinde Başarı İçin Erken Antifungal Verilmesi

Timing of susceptibility-based antifungal drug administration in patients with *Candida* bloodstream infection: correlation with outcomes

Shellee A. Grim^{1,2*}, Karen Berger^{1†}, Christine Teng³, Sandeep Gupta⁴, Jennifer E. Layden², William M. Janda⁵ and Nina M. Clark²

J Antimicrob Chemother 2012; 67: 707–714

72 saat içinde antifungal başlanan hastalardaki mortalite,
72 saatten sonra başlanan hastalardaki mortaliteden
anlamli olarak düşük bulunmuş
%27 karşı 40%, P=0.004



En iyi ihtimal 7 gün
En kötü ihtimal ≥ 10 gün

AFDT Hangi Amaçlarla Yapılmalı ?

– Rutin amaçla yapılmalı

- *Candida* türleri → Flukonazol, Ekinokandin
» *Candida glabrata*
- *Aspergillus fumigatus* → Azol direnci
- Nadir ve kriptik suşlar → MİK değerleri nasıl ?

– Epidemiyolojik veri elde edilmesi amacıyla yapılmalı

Candida türleri - AFDT

ESCIMID	CLSI	ECIL	IDSA
✓ Kan ve derin dokulardan izole	✓ Kan ve steril bölgelerden izole	✓ Kan ve steril bölgelerde üreten	✓ Kan ve steril vücut sıvılarından izole
• Primer dirençli olduğu bilinen suşlara duyarlılık çalışmamalı ➤ <i>C. krusei</i> - Flukonazol			
	tür için yeterli olabilir ✓ <i>C. glabrata</i> için flukonazol ve ekinokandin duyarlılığına rutin bakılması		tüm türlerin ekinokandin duyarlılığına bakılmalıdır

Aspergillus türleri-ADTS

Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America

Thomas F. Patterson,^{1,a} George R. Thompson III,² David W. Denning,³ Jay A. Fishman,⁴ Susan Hadley,^{5,b} Raoul Herbrecht,⁶ Dimitrios P. Kontoyannis,⁷ Kieren A. Marr,⁸ Vicki A. Morrison,⁹ M. Hong Nguyen,¹⁰ Brahm H. Segal,¹¹ William J. Steinbach,¹² David A. Stevens,¹³ Thomas J. Walsh,¹⁴ John R. Wingard,¹⁵ Jo-Anne H. Young,¹⁶ and John E. Bennett^{17,a}

When Should Antifungal Susceptibility Testing Be Performed, and How Should Results Be Interpreted and Affect Management?

Recommendation.

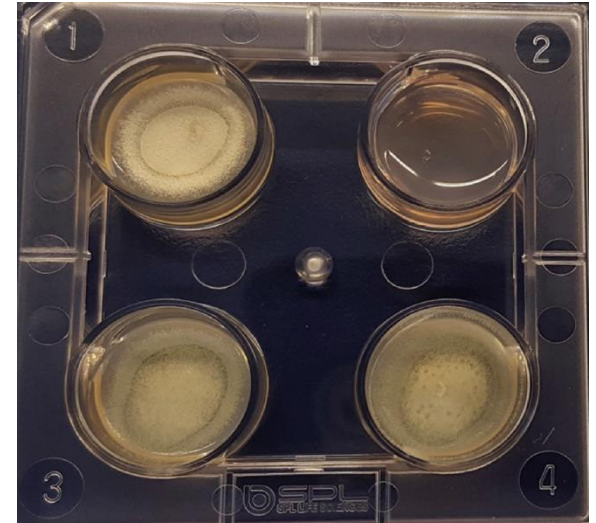
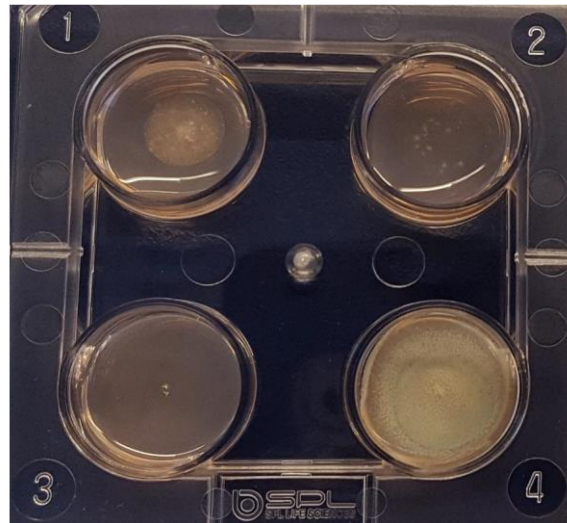
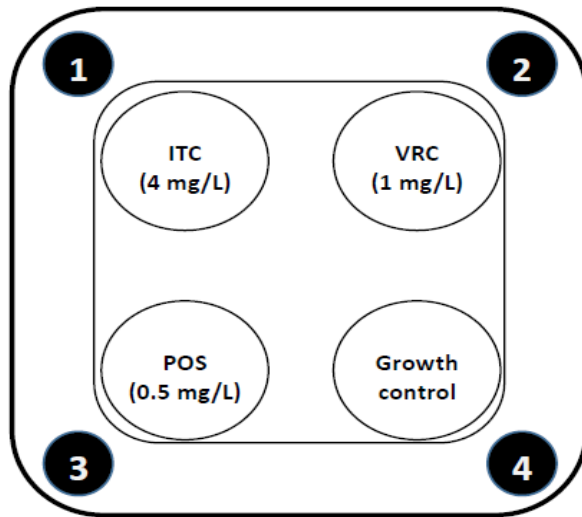
24. Routine antifungal susceptibility testing (AFST) of isolates recovered during initial infection is not recommended. AFST of *Aspergillus* isolates using a reference method is reserved for patients suspected to have an azole-resistant isolate or who are unresponsive to antifungal agents, or for epidemiological purposes (strong recommendation; moderate-quality evidence).

Aspergillus türleri-ADTS

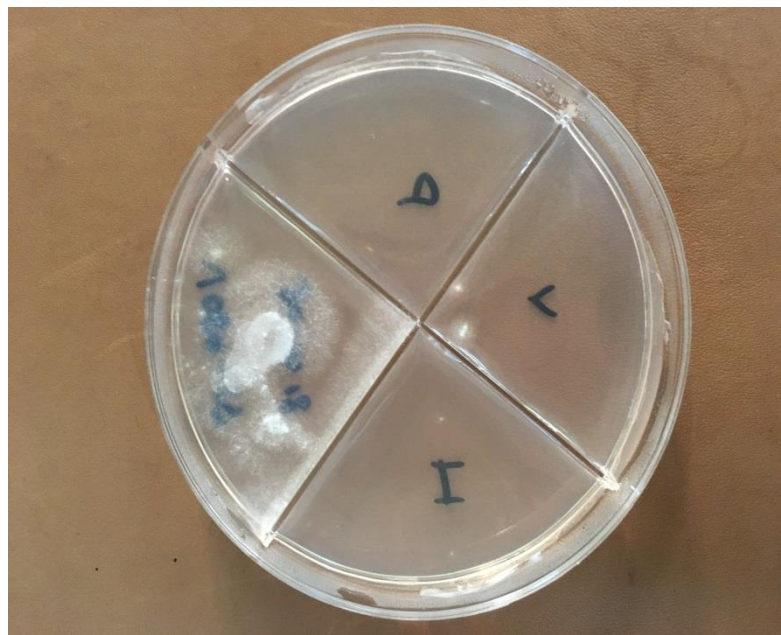
Azol direnci olan bölgede tüm anlamli klinik izolatlar	Tür kompleksi düzeyinde tanımlanmalı	Bazı türlerde primer direnç var	AIII
Azol direnci olan bölgede tüm anlamli klinik izolatlar	Azol direncini belirlemek için	CLSI 38-A2 EUCAST 9.3.1	AII
Tüm anlamli klinik izolatlar	Direnç süveyansı (En az 100 izolatla)	CLSI 38-A2 EUCAST 9.3.1	AII
Tüm anlamli <i>Aspergillus fumigatus</i> izolatları	Azol direncini belirlemek için	Rutin azol tarama plağı	AIII/ BIII

Ullmann A J, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. CMI 2018; 24 (suppl 1): E1-E38.
(10.1016/j.cmi.2018.01.002)

VIPcheck™78 , Nijmegen, the Netherlands



Guinea J, et al How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four well azole-containing agar plates, *Clinical Microbiology and Infection* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.09.008>.



Kriptik ve Nadir *Aspergillus* Türlerinde Antifungal Duyarlılık

- *A. fumigatus* tür kompleksi
 - *A. lentulus* → Azol monoterapisinden kaçınılmalı
 - *A. udagawae*
 - *Neosartorya pseudofischeri*
- *A. flavus* tür kompleksi
 - *A. alliaceus* →
- *A. terreus* tür kompleksi → } AmB tedavisinden kaçınılmalı
 - *A. carneus*
 - *A. alabamensis*
- *A. niger* tür kompleksi
 - *A. tubingensis* → Azol monoterapisinden kaçınılmalı
 - *A. luchuensis*
- *A. ustus* tür kompleksi
 - *A. calidoustus* → Tüm azollerden kaçınılmalı
- *A. nidulans* tür kompleksi → AmB tedavisinden kaçınılmalı
 - *Emericella nidulans*
 - *E. quadrilineata*

Antifungal Duyarlılığı En Fazla Ne İçin İsteriz?

- *C. glabrata*
 - Flukonazol direnci var mı?
 - Ekinokandin direnci var mı?
- *A. fumigatus*
 - Azol direnci var mı?
- Kriptik ve nadir türler
 - MİK değerleri nasıl?
- Epidemiyolojik veri

FIRST MULTICENTER REPORT OF IN VITRO RESISTANCE RATES IN CANDIDEMIA ISOLATES IN TURKEY

Arıkan-Akdağlı S, et al.

Basıma Gönderidi

- 12 merkez
 - Hacettepe Üniv, Dokuz Eylül Üniv, Ege Üniv, Erciyes Üniv., Gazi Üniv., İstanbul Üniv. İstanbul Tıp Fak., Marmara Üniv., Ondokuz Mayıs Üniv., Osmangazi Üniv., Sağlık Bilimleri Üniv. Gülhane Tıp Fak., Selçuk Üniv, Uludağ Üniv.
- 1887 kan izolatları (1996-2017)
- CLSI M27A referans yöntemi
- Flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, mikofungin ve amfoterisin B

FLUKONAZOL %

	S	SDD	R	WT	non-WT	n
C.albicans	99,6	0,4	0,0			809
C.parapsilosis	90,0	2,7	7,3			548
C.glabrata	0,0	99,0	1,0			196
C.tropicalis	100,0	0,0	0,0			196
C.krusei	0,0	0,0	100,0			52
C.kefyr				96,7	3,3	30
C.lusitaniae				95,0	5,0	20
C.guilliermondii				100,0	0,0	16
Diğer						20

Yayınlanmamış veri

VORİKONAZOL

	S	SDD	R	WT	non-WT	n
C.albicans	100,0	0,0	0,0			809
C.parapsilosis	98,0	2,0	0,0			548
C.glabrata				99,5	0,5	196
C.tropicalis	100,0	0,0	0,0			196
C.krusei	100,0	0,0	0,0			52
C.kefyr				100,0	0,0	30
C.lusitaniae				100,0	0,0	20
C.guilliermondii				100,0	0,0	16
Diğer						20

Yayınlanmamış veri

MIKAFUNGİN

	S	SDD	R	WT	non-WT	n
<i>C.albicans</i>	100,0	0,0	0,0			809
<i>C.parapsilosis</i>	99,8	0,2	0,0			548
<i>C.glabrata</i>	100,0	0,0	0,0			196
<i>C.tropicalis</i>	100,0	0,0	0,0			196
<i>C.krusei</i>	100,0	0,0	0,0			52
<i>C.kefyr</i>				100,0	0,0	30
<i>C.lusitaniae</i>	100,0	0,0		100,0	0,0	20
<i>C.guilliermondii</i>	100,0	0,0	0,0			16
Diğer						20

Yayınlanmamış veri

AMFOTERISIN B

	S	SDD	R	WT	non-WT	n
C.albicans				99,9	0,1	809
C.parapsilosis				100,0	0,0	548
C.glabrata				99,5	0,5	196
C.tropicalis				99,5	0,5	196
C.krusei				98,1	1,9	52
C.kefyr						30
C.lusitaniae				100,0	0,0	20
C.guilliermondii				100,0	0,0	16
Diğer						20

Yayınlanmamış veri

Original article

First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey



Gülşah Ece Özmerdiven^a, Seçil Ak^b, Beyza Ener^{a, *}, Harun Ağca^a, Burcu Dalyan Cilo^a, Berrin Tunca^b, Halis Akalın^c

^a Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Görükle, 16059 Bursa, Turkey

^b Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Görükle, 16059 Bursa, Turkey

^c Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Görükle, 16059 Bursa, Turkey

- 1999-2012 yılları
- 746 suş tarandı
- 76 suшта (%10,2) dirençli
- Azol dirençli suşlarımızın %86,8'inde (66/76) tarımda kullanılan azol fungisitlerin neden olduğu TR34/L98H mutasyonu sahip

Determination of Azole Resistance and TR₃₄/L98H Mutations in Isolates of *Aspergillus* Section *Fumigati* from Turkish Cystic Fibrosis Patients

Özge Güngör  · Benedita Sampaio-Maia · Antonio Amorim · Ricardo Araujo · Zayre Erturan

- Altı kistik fibrozlu hastanın 31 *A. fumigatus* tür kompleksi incelenmiş
- Bir izolat tüm azollere dirençli bulunuş
- Ancak *cyp51A* geninde direnç paternine rastlanmamış

A. fumigatus'da azol direnç projesi

Koordinatör: Beyza Ener, Sevtap Arıkan Akdağlı

- Toprak örneklerinde azol direncinin aranması
- Klinik örneklerde azol direncinin aranması
- Çok merkezli prospektif
- Yöntem: Azol tarama plağı, direnç saptanan suşlara EUCAST yöntemi ile in-vitro antifungal duyarlılık, direnç mekanizması
- Toprak sonuçları toparlanma aşamasında

SONUÇ

- İn vitro antifungal duyarlılık testleri uzmanlık isteyen bir konu
- Ticari sistemler yeterli değil
- Uygun olmayan yöntemlerle/deneyimsiz kişilerle yapmaktansa hiç yapmamak daha doğru
- İyi bir tanımlama her zaman için daha doğru
- En sıkıntılı tür şu anda *C. glabrata* ve *A. fumigatus*
- *C. glabrata* için ülkemizde şu anda sıkıntı yaratacak bir durum yok
- *A. fumigatus* direnci ile ilgili veriler toplanıyor