

Kültür ve Antifungal Duyarlılık Testleri: Ne zaman, Nasıl Yapalım? Nasıl Yorumlayalım?

Uz. Dr. Özlem DOĞAN

Koç Üniversitesi

Sunum Planı

Kültür

- Hangi örneklerle, hangi hastalara yapalım?
- Mikolojide kullanılan konvansiyonel kültür yöntemleri
- Sonuçların yorumlanması

Antifungal Duyarlılık Testleri

- Hangi örneklerle, hangi hastalara yapalım?
- Hangi yöntemi kullanalım?
- Güncel antifungal direnç sorunu
- Sonuçların yorumlanması

En sık görülen invazif fungal infeksiyon etkenleri

- *Candida* türleri (%70-90)
- *Aspergillus* türleri (%5-10)
- *Cryptococcus*
- *Mucorales*
- *Scedosporium*
- *Fusarium*



Mikoloji Laboratuvarı İnvazif Mikozlar

Kan

Kemik iliği

Beyin omurilik sıvısı

Derin doku biyopsisi örnekleri

Solunum yolu örnekleri (BAL,DTA, Balgam)

Vücut sıvıları (plevra,periton)

İdrar

Pü, Dışkı

Mantar hastalıklarının tanısında kültür

Avantajları

- Altın standart yöntem
- Kesin tanı
- Tür düzeyinde tanımlama
- Antifungal duyarlılık testleri

Dezavantajları

- Zaman alıcı
- Deneyimli personel gerektirir
- Üremelerin değerlendirilmesinde zorluklar
- Kontaminasyon/Kolonizasyon?

Kan kültürü

- İnvazif Kandidiyazis
- *Candida* türlerinin idrar dışındaki steril vücut sıvılarından izolasyonu
- İnvazif kandida enfeksiyonları iki grupta incelenir
 - Kandidemi
 - Sistemik (dissemine) kandidiyaz

Kan kültürü pozitifliğini takiben antifungal tedavide gecikme mortaliteyi ↑

Kan kültürü-Kandidemi

ECCMID- Fungal Infection Study Group (EFISG)

- 3 set (her set 1 aerobik 1 anaerobik şişe)
- Ardışık 3 gün- otomatize sistemlerde en az 5 gün inkübasyon
- Bu yöntem ile *Candida* izolasyonu duyarlılığı %50-75
- Sistemik kandidiyasis → Hastaların 1/3'ünde kan kültürü negatif
- Nötropenik hastalarda, antifungal tedavi altında duyarlılık ↓
- Tür düzeyinde tanımlama önemli → *Candida* dışı maya etkenleri %5



Kan kültürü-Kandidemi

Fungal kan kültürü şişesi kullanılmalı mı?

- Duyarlılık birçok türde değişiklik göstermiyor
- BACTEC (Becton Dickinson Diagnostic Systems) +*C.glabrata*
- *C.glabrata* aerop ve anaerop kan kültürü şişelerinde daha geç üremekte
- Fungal kan kültürü şişesi kullanımı ile daha hızlı pozitif sonuç
- Kılavuzlarda önerisi yok
- *C.glabrata*'nın sık görüldüğü merkezlerde kullanılabilir

Kan kültürü-Kandidemi

Ülkemizde Kandidemi Etkeni *Candida* Türlerinin Dağılımı

Çalışma	Yer	Yıl	Suş sayısı	C.albicans %	C.pps %	c.tropicalis %	c.glabrata %	c.krusei %
Arslan U.	Konya	2006	136	51,5	5,1	6,6	2,2	1,5
Celebi S.	Bursa	2008	102	39,2	21,6	15,7	6,9	4,9
Dağlar D	Antalya	2007	118	41,5	25,5	11,9	1,7	0,8
Akyüz Z.	Trabzon	2008	170	37,1	28,2	8,3	3,6	0,0
Gültekin B.	Aydın	2010	74	49,0	23,0	14,0	12,0	1,0
Gurcuoğlu E.	izmir	2010	760	45,0	26,0	7,0	3,5	7,0
Yapar N.	izmir	2014	66	53,1	21,1	7,6	6,1	12
Alışkan EH	Ankara	2015	163	48,5	32,9	6,1	3	1,2
Doğan O	İstanbul	2017	559	47.8	24,7	9,5	10	1

C. albicans en sık izole edilen tür ($\cong$ %50)
C. parapsilosis en sık izole edilen 2. tür, yıllar içinde sıklığı artmakta

Kan kültürü- Küf Mantarları

- Aspergillus türleri ➡ kontaminasyon olarak kabul edilmelidir
- Fungemi etkeni küf mantarları
- *Scedosporium* spp.
- *Fusarium* spp.
- Antifungallere yüksek direnç, mortalite çok yüksek

BOS- Kültür

- Kriptokokkozis

- 48-72 saat → 30⁰ C ve 37⁰ C en az 3 hafta inkübasyon
- Kuş yemli agar-koyu renk pigment retimi
- Kafeik asit disk testi-feniloksidaz aktivitesi
- Kan kültürü → ≅%50 (HIV(+)) hastalarda ↑
- Üreaz pozitiflięi



İnvasif Mikozlar-Doku Kültürü

- Biyopsi örneklerinin
 - Nemli tutulması
 - Laboratuvara acil transferi önemli (bakteri kontaminasyonu)
- Fungal ayırt edici besiyeri kullanılmalı (5-14 gün inkübasyon)
- Mantar üremesi→ derin doku tutulumu
- Negatif sonuçlar enfeksiyonu dışlamamakta...

Sık yapılan hatalar

Ağız açık tüpte idrar

Heparinsiz tüpe alınmış kemik iliği

Gazlı bez üzerinde doku

Formol içinde doku

Kuru eküvyon

Mucorales takımı ➡ Hızlı üreme (24-48 saat)

Esmer mantarlar / hiyalen küf mantarları ➡ uzun süre inkübasyon

Kontaminasyonu engellemek için kloramfenikol ve/veya sikloheksimid

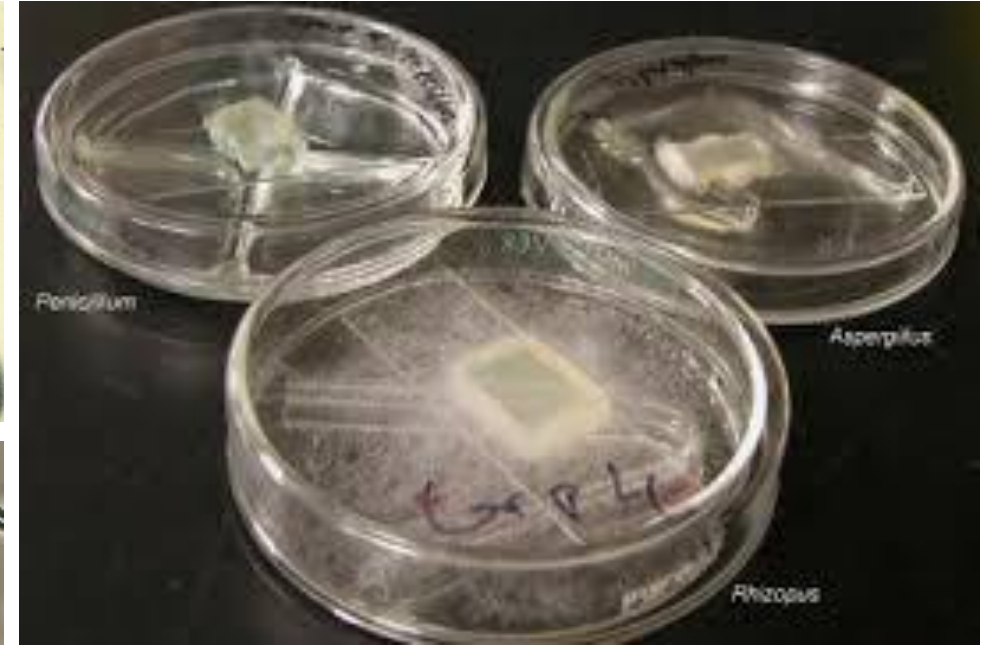
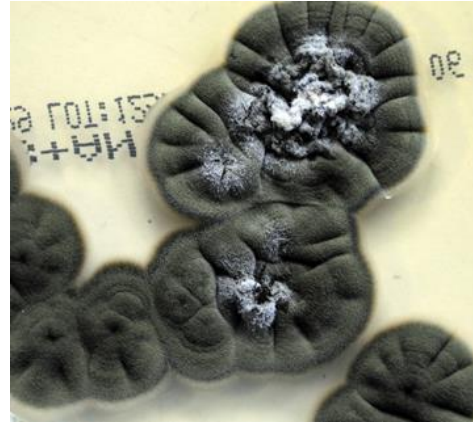
İnkübasyon ➡ 2 veya daha fazla farklı sıcaklık (25⁰ C, 30⁰C, 37⁰C)

Derin doku mikozları ➡ Biyogüvenlik açısından risk

İnvasif Mikozlar-Doku Kültürü

İnvasif Mikozlar Doku Kültürü

- *Mucorales* takımı
- *Aspergillus* spp.
- *Scedosporium* spp.
- *Fusarium* spp.
- *Exophiala* spp.
- Endemik mikozlar
- *Cladosporium* spp.



Doğru örnek
alınması önemli

Doku> BAL> DTA>
Balgam

Balgam kültürü en
az iki örnekte (+)

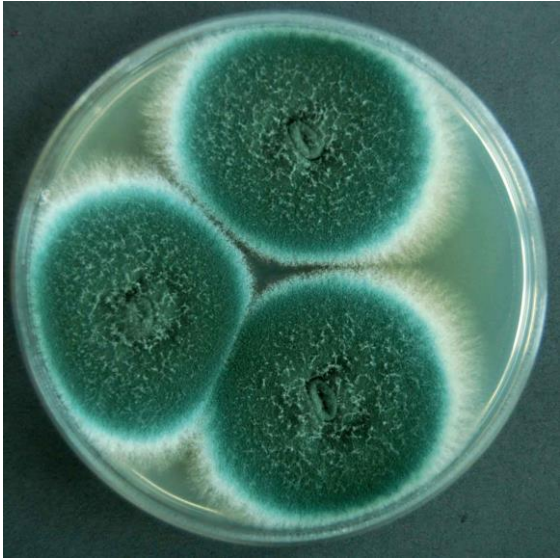
Kontaminasyon
Kolonizasyon
Enfeksiyon

Birden fazla kültür
plağına ekim /
Farklı ekim
teknikleri

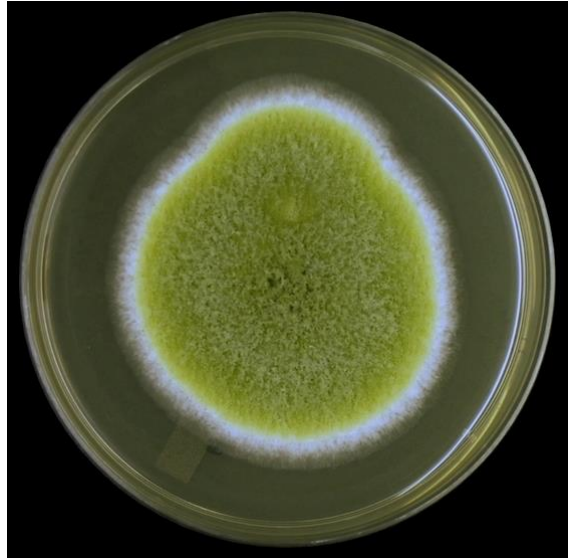
Solunum yolu örnekleri

Horvath JA. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med. 1996

Kültür-*Aspergillus* türleri



Aspergillus fumigatus



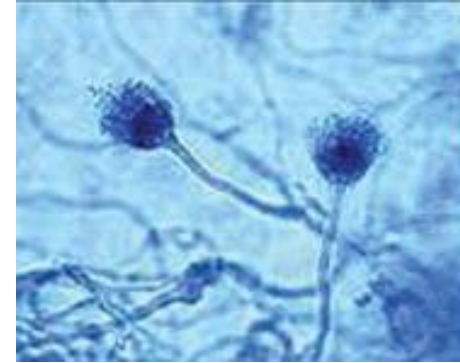
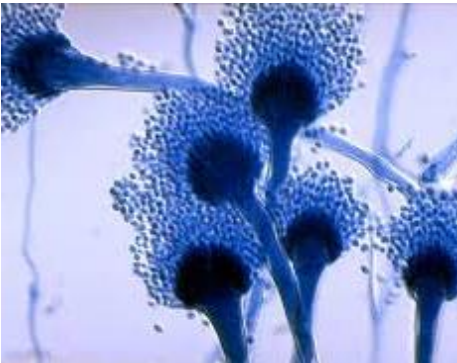
Aspergillus flavus



Aspergillus terreus



Aspergillus niger



Sorunlu örnekler Yorumlama

Balgam

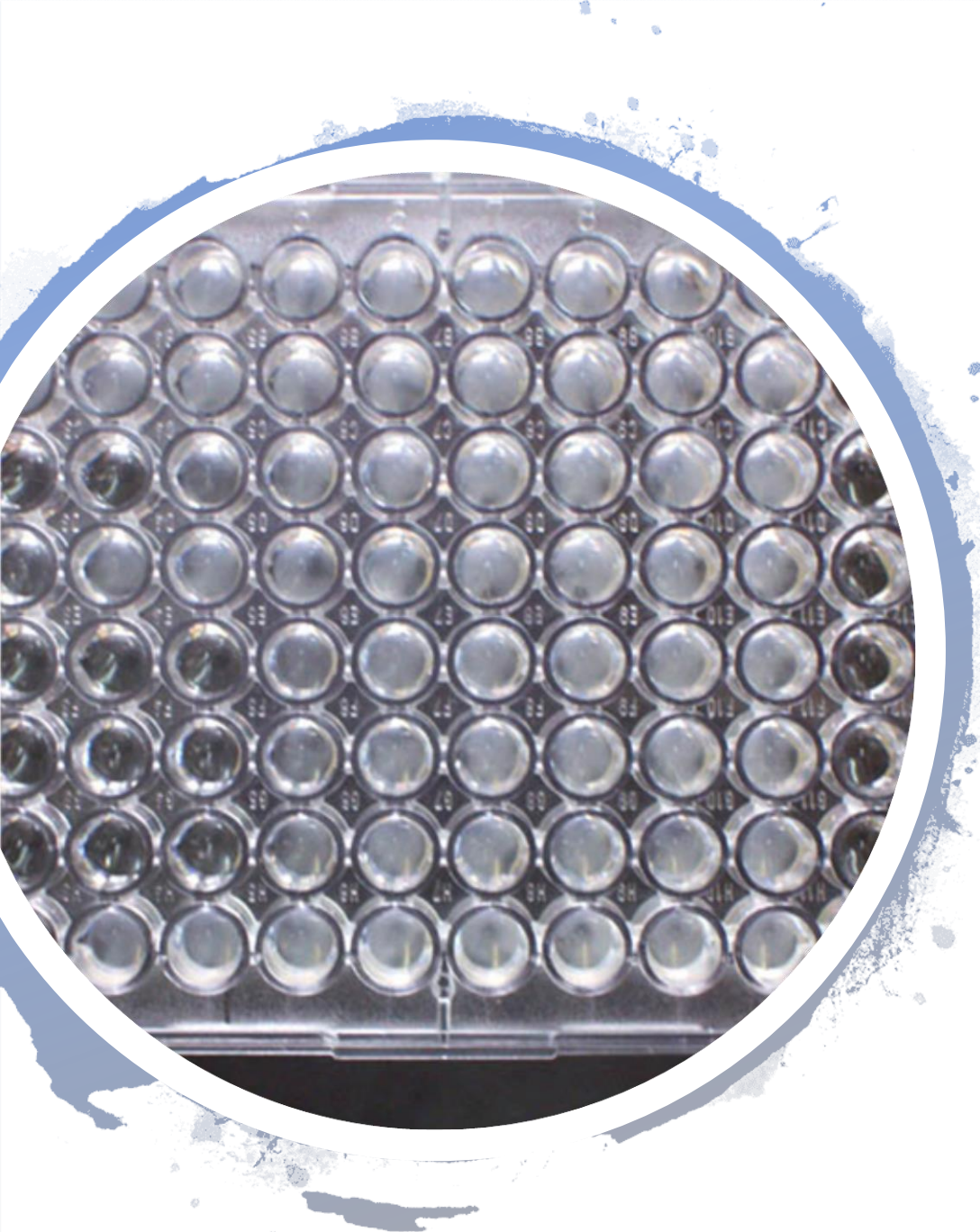
- *Candida* pnömonisi??
- *Aspergillus*-kontaminasyon??

İdrar

- Mayaların etken olduğu üriner system enfeksiyonu??

Sürüntü (Oral/ Vajinal)

- Mikrobiota elemanı/ Enfeksiyon etkeni??



Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)

- Rutin hasta tedavisinin başlatılması ve takibinde
- Genel ve lokal direnç sürveyansının takibinde
- Duyarlı bir popülasyon içinde direnç gelişiminin takip edilmesi için
- Yeni bulunmuş bir deneysel ilacın etkinliğinin belirlenmesi amacıyla uygulanmaktadır.

Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)



- Hangi durumda antifungal duyarlılık testleri çalışılmalı?
 - Her hasta ve her suş için önerilmiyor
 - Steril vücut bölgesinden izolasyon
 - İnvazif enfeksiyon
 - Dirençli olduğu bilinen tür izolasyonu (*C.glabrata*-flukonazol)
 - Daha önce antifungal almış hastalarda (sekonder R?)
 - Nadir ve yeni ortaya çıkan türlerde

Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)

Klinik başarısızlığın nedeni sadece direnç midir?

HAYIR!!!

90/60 kuralı

Diğer faktörler çok önemli

- Tedavi ile ilişkili
 - Doz, emilim, dağılım, meabolizma
- Hasta ile ilişkili
 - İmmun yetmezlik
 - İnfeksiyon bölgesi-apse vs
 - Yabancı cisim

Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT) Referans Yöntemler

CLSI	M27-A3-Maya- Sıvı mikrodilüsyon M38-A2-Küf-Sıvı mikrodilüsyon M44 A2-Maya- Disk difüzyon M51-A-Küf- Disk difüzyon
EUCAST	E.Dis 7.3.1- Maya- Sıvı Mikrodilüsyon E.Dis 9.3.1- Küf- Sıvı Mikrodillüsyon E.Def 10.1- Azol direnci tarama

Klinik direnç sınır değerleri (CBP)

- Türe özgü değerler (tür düzeyinde tanımlama önemli)

Epidemiyolojik eşik değer (ECV-ECOFFs)

- Tedavi sonucunu belirlemez
- Kazanılmış direnç mekanizmalarının saptanmadığı sokak tipi (wild-type) izolatların MIK dağılımını gösterir
- ECV üzerindeki MIK değerlerine sahip suşların (non-wild type) direnç taşıyabileceğini gösterir
- Sokak tipi suşların %95'i ECV değerinin altındadır

Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)

Notlar

- Kaspofungin ile yapılan testlerde laboratuvarlar arası uyum düşük, diğer ekinokandinler ile çalışılmalı
- *Candida* türlerinde (*C.glabrata*-*C.krusei* hariç) vorikonazol direnci nadir, R izolatlar referans laboratuvarda doğrulanmalı
- *C.guilliermondii* – diğer türlere göre yüksek ECOFF değerleri
- Türe özgü olmayan flukonazol eşik değeri Pk/Pd değerine göre belirlenmiştir

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)															
	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints ¹	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	1	1	IE	IE	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.032	0.032	IE	IE	0.064	0.064	0.064	0.064	0.002	4	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE	IE
Caspofungin	Note ³	Note ³	IE	IE	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	IE ²	IE ²	IE	IE
Fluconazole	2	4	IE	IE	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	2	4
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Itraconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.125	0.125	0.125	0.125	IE ²	IE ²	IE	IE
Micafungin	0.016	0.016	IE	IE	0.032	0.032	IE ⁴	IE ⁴	0.002	2	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE	IE
Posaconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE	IE
Voriconazole ⁶	0.064 ⁵	0.25 ⁵	0.064	0.25	IE	IE	IE	IE	0.125 ⁵	0.25 ⁵	0.125 ⁵	0.25 ⁵	IE ²	IE ²	IE	IE

Antifungal Direnç- Candida türleri

Flukonazol

- *C. krusei* (doğal)
- *C. glabrata* ($\cong$ %15)
 - *C. dubliniensis*
 - *C. tropicalis*
 - *C. norvegensis*
- *C. parapsilosis**
 - *C. auris*

Amphoteresin B

- *C. lusitaniae*
- *C. guilliermondii*
 - *C. rugosa*
 - *C. auris*

Ekinokandin

- *C. glabrata*
- *C. auris*

Antifungal Direnç- *Candida* türleri

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 85 (2016) 200–204

Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013)

Mariana Castanheira ^{a,*}, Shawn A. Messer ^a, Paul R. Rhomberg ^a, Michael A. Pfaller ^{a,b}

1846 izolat ➡ 31 ülke

Azol R

C.glabrata %12

C.tropicalis %11.6

C.parapsilosis %2.3

Ekinokandin R

C.glabrata

- Anidulafungin %2.4
- Kaspofungin %2
- Mikafungin %0.8

Antifungal Direnç- *C. glabrata* kompleks

Fukonazol

- Amerika ve Kuzey avrupa'da en sık izole edilen 2. tür
- Direnç % 10-15 (Amerika/Kuzey Avrupa)
- Türkiye ➡ Direnç nadir

Ekinokandin

- *Fks 1-2* genleri
- Amerika ve Kuzey Avrupa için “emerging resistance”
- Türkiye ➡ Direnç çok nadir
- 3-4 hafta tedavi

Antifungal Direnç- *C. parapsilosis* kompleks

ORIGINAL RESEARCH

published: 05 December 2018

An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkz029

**Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy**

Emergence of clonal fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India

• Flukonazol

- SVK ilişkili enfeksiyonlar (slime-biofilm)
- Azol dirençli klonlar salgınlar yapmakta...
- Türkiye' de en sık görülen 2. tür ve sıklığı artmakta
- Dirençli izolatların yayılımı ülkemiz için büyük risk
- Direnç & mortalite ilişkisi ???

KLİMİK-MIÇG

2015-2018

10 Merkez-395 Candidemi izolatu

110 *C.parapsilosis* (%28,4)

Flukonazol R %14.5

AFDT-Küf Mantarları Primer Direnç

- Primer direnç önemli
- Kompleks içindeki kardeş türlere dikkat edilmeli
- Kompleks içinde tür düzeyinde tanımlama için sekanslama gerekmekte
- Referans laboratuvara gönderilmeli

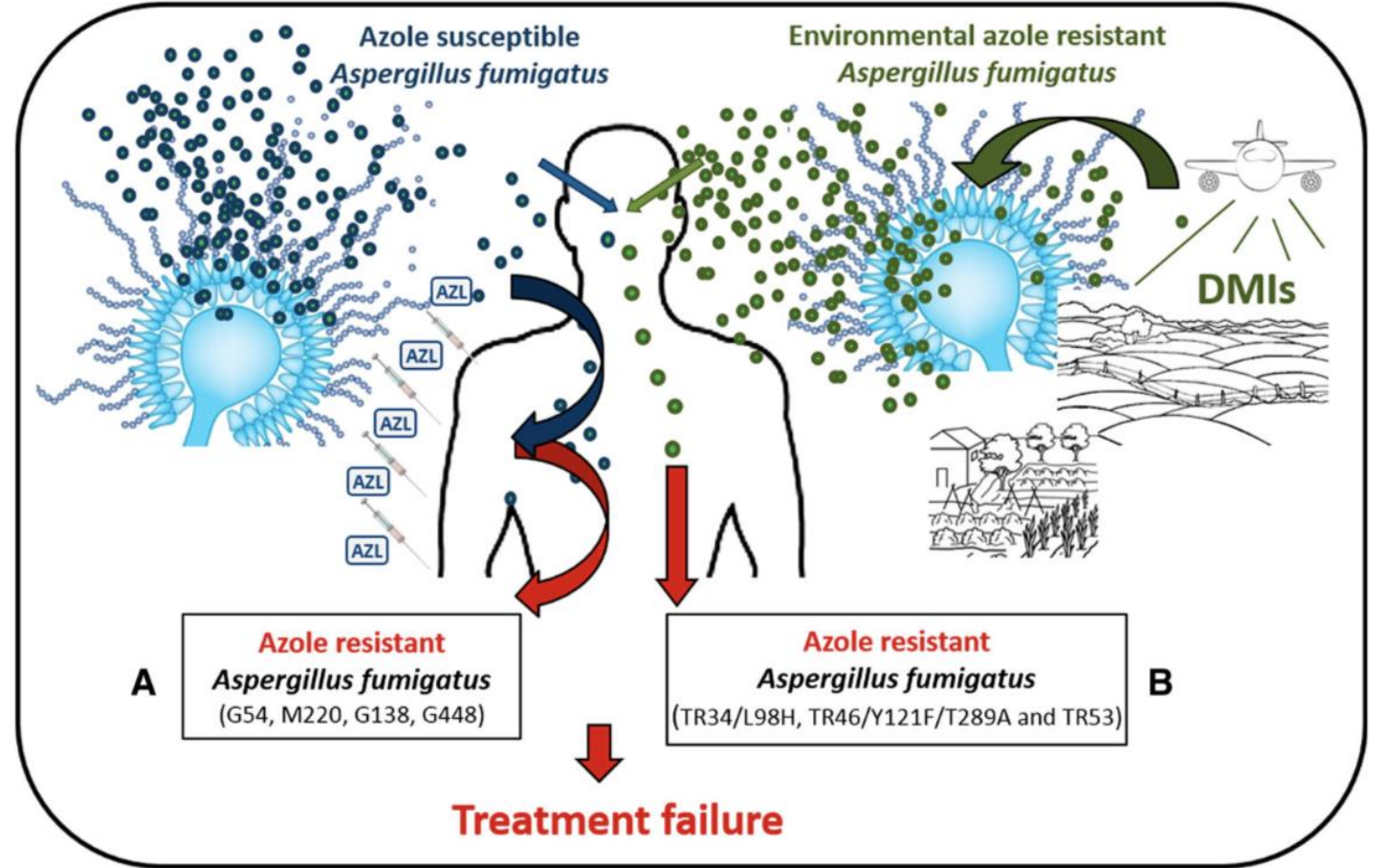
	Amphotericin B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
<i>Aspergillus lentulus</i>	Red	Red	Red	Grey
<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	Red	Red	Red	Grey
<i>Aspergillus udagawae</i>	Grey	White	Grey	White
<i>Aspergillus viridinutans</i>	White	Red	Red	Red
<i>Aspergillus pseudofischeri</i>	White	Red	Red	Red
<i>Aspergillus hiratsukae</i>	White	White	White	White
<i>Aspergillus calidoustus</i>	Red	Red	Red	Red
<i>Fusarium solani</i>	Grey	Red	Red	Red
<i>Fusarium spp</i>	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>Scedosporium apiospermum</i> complex	Grey	Red	Grey	Red
<i>Lomentospora prolificans</i>	Red	Red	Red	Red
Mucorales	Grey	Grey	Red	Grey

Figure 2: Antifungal resistance in less common fungal species

Red=species resistant to drug. White=species susceptible to drug. Grey=species has intermediate or low minimum inhibitory concentration to drug.

AFDT-Küf Mantarları Sekonder Direnç

- Tarımda azol fungisidlerin yaygın kullanımı ile ilişkili
- Hem çevre hem hasta izolatları(+)
- Azol naif hastalarda
- Azollerin hedef olan enzimin (cyp51A) promotor bölgesinde TR ve enzimde nokta mutasyonu



Aspergillus fumigatus Azol direnci

Review Article

Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*

Agustin Resendiz Sharpe^{1,*}, Katrien Lagrou¹, Jacques F. Meis^{2,3},
Anuradha Chowdhary⁴, Shawn R. Lockhart⁵ and Paul E. Verweij^{3,6}
on behalf of the ISHAM/ECMM *Aspergillus* Resistance Surveillance
working group[†]

- Tüm dünyada yaygın bildirim
- En yüksek oranda bildirim Hollanda ve İngiltere
- Türkiye’den bildirim (+)



Aspergillus fumigatus Azol direnci

- Özmerdiven ve ark.
- Bursa-2015
- Klinik izolatlar
- %10.2 azol direnci
- Dirençli izolatların %86.8 TR34L98H mutasyonu

Country	No. isolates	Overall resistance rate (%)	Resistance mechanisms ^a	
			TR ₃₄	TR ₄₆
Europe				
Belgium	192	5.7	54.5	9.1
Denmark	413	4.5	33.3	0
	1162	2.6	57.0	
France	118	0.85	0	0
	125	4.6	16.6	0
	85	8	55.6	0
Germany	527	3.2	35.3	0
	119	5	66.7	16.7
	27	30	71.4	28.5
Portugal	159	0	0	0
Spain	156	0.6	0	0
	362	1.8	0	0
The Netherlands	170	1.7	–	–
	1912	1.7–6	94	0
	209	1.9	100	0
	2062	4.6	90.2	0
	1315	6.8	74.6	20.6
	105	20	62.0	14.3
	2941	3.2	48.9	6.4
Turkey	746	10.2	86.8	0
UK	519	6.6	5.9	0

AFDT- *A.fumigatus*

ECCMID-European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases

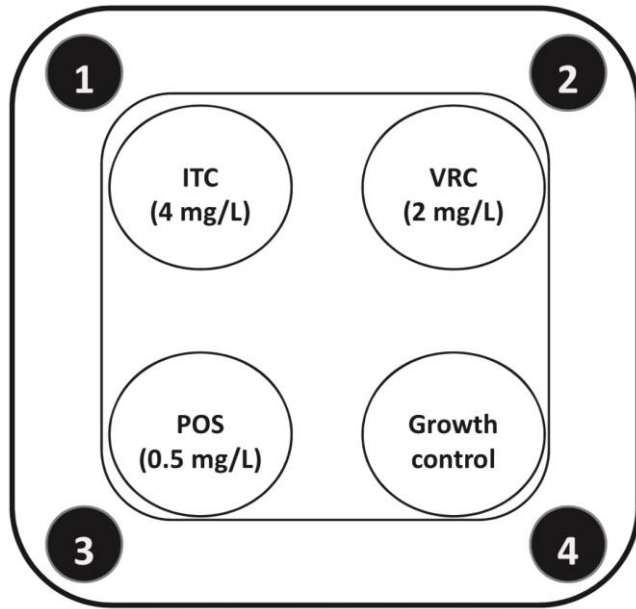
ECMM-European Confederation of Medical Mycology

ERS-European Respiratory Society

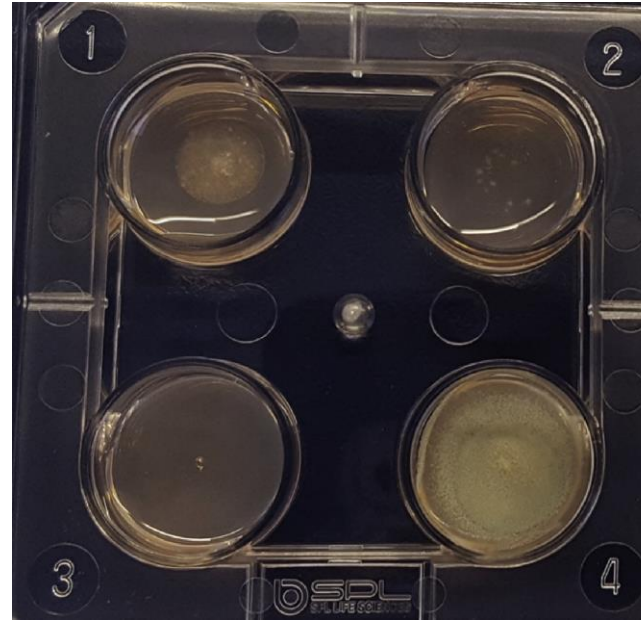
Indications for testing for azole resistance in clinical *Aspergillus* isolates

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
All clinically relevant <i>Aspergillus</i> isolates (in patient groups or regions with known azole resistance)	Identify azole resistance	Reference MIC testing	A	II	In situations where rapid testing is available
Clinically relevant <i>Aspergillus</i> isolates in patient groups with high prevalence of azole resistance or patients unresponsive to treatment	Identify isolates with intrinsic resistance	Species identification to complex level	A	III	Some species are intrinsically resistant—e.g. <i>A. calidoustus</i> (azole resistant) and <i>A. terreus</i> (AmB resistant)
Clinically relevant <i>A. fumigatus</i> isolates	Identify azole-resistant <i>A. fumigatus</i>	Routine azole agar screening	B	III	Identifies resistant colonies that require MIC-testing
All isolates –resistance surveillance	Determine the local epidemiology of azole resistance	Periodical reference MIC testing of <i>A. fumigatus</i> complex	A	II	Test at least 100 isolates
Azole-resistant isolates	Determine nature and trends in Cyp51A mutation distribution	Cyp51A-gene mutation analysis	A	II	Test resistant isolates from surveillance survey

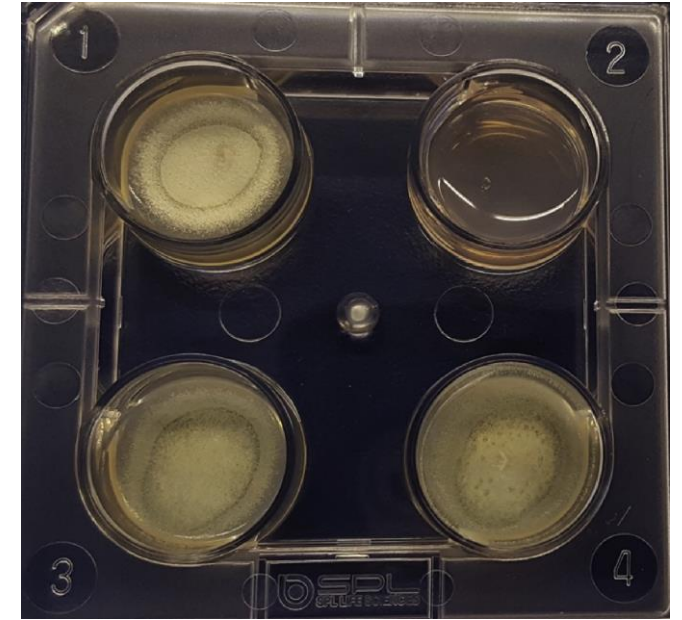
Azol direnci tarama- *A.fumigatus*



Antifungal oranları



Cyp51A L98H mutasyonu



Cyp51A G54W mutasyonu



Son sözler

- ❖ Mantar enfeksiyonlarının tanısında kültür altın standart
- ❖ Kültür $\Rightarrow$ Zaman alıcı
- ❖ Yeni biyobelirteçlere ihtiyaç devam ediyor
- ❖ Antifungal duyarlılık testleri özellikle hastalarda kritik önemde
- ❖ Yerel epidemiyolojisi son derece önemli
- ❖ Ülke çapında büyük araştırmalara ihtiyaç devam ediyor
- ❖ Mantar enfeksiyonlarında mortalite hala çok yüksek
- ❖ Mortaliteyi etkileyen diğer faktörler irdelenmeli