



# Küf Mantarlarında Direnç: Yöntemler ve Yorumlanmasındaki Zorluklar

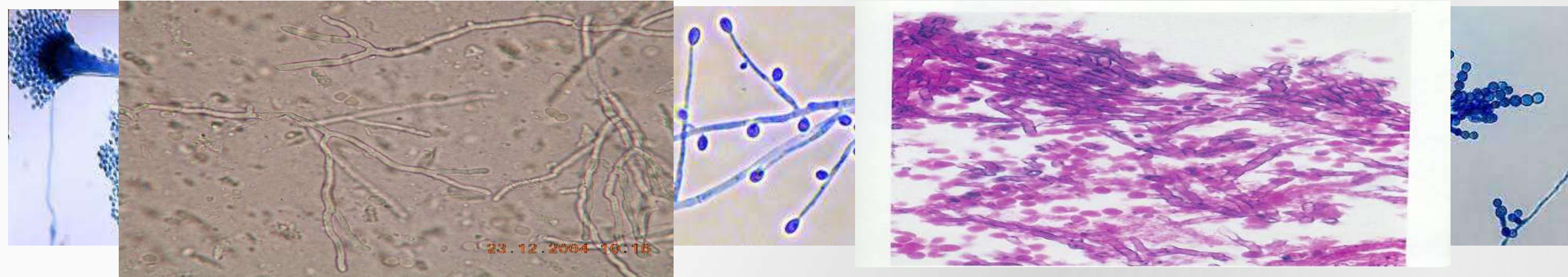
**Dr Beyza Ener**

**Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi**

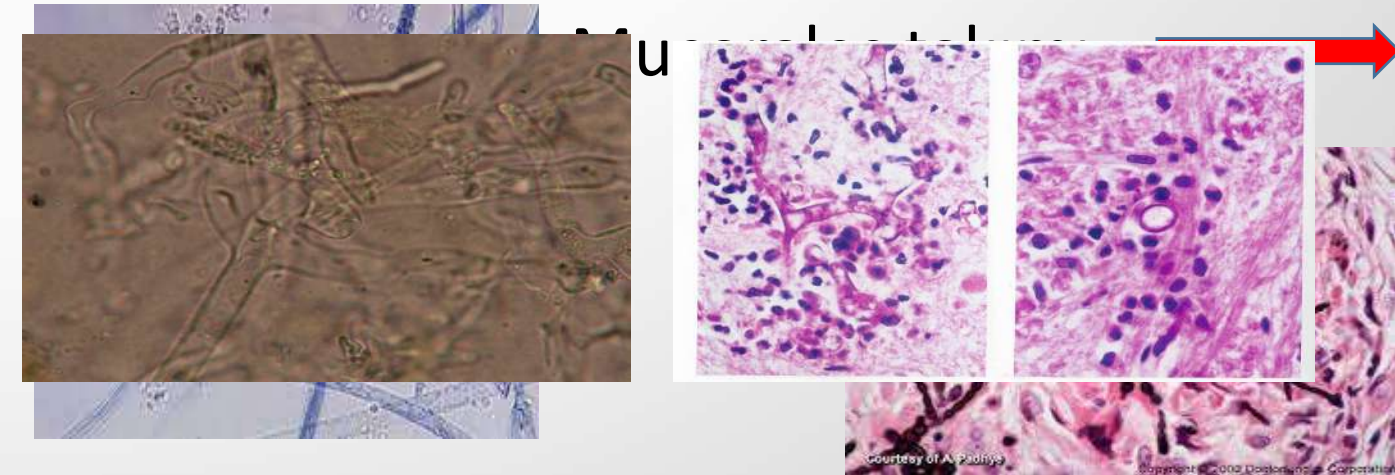
**13.03.2023**

**Belek/Antalya**

# Küf Mantarları



*Aspergillus, Fusarium, Scedosporium, Acremonium, Scoploriopsis* vb küf mantarları → **hiyalohifomikoz**

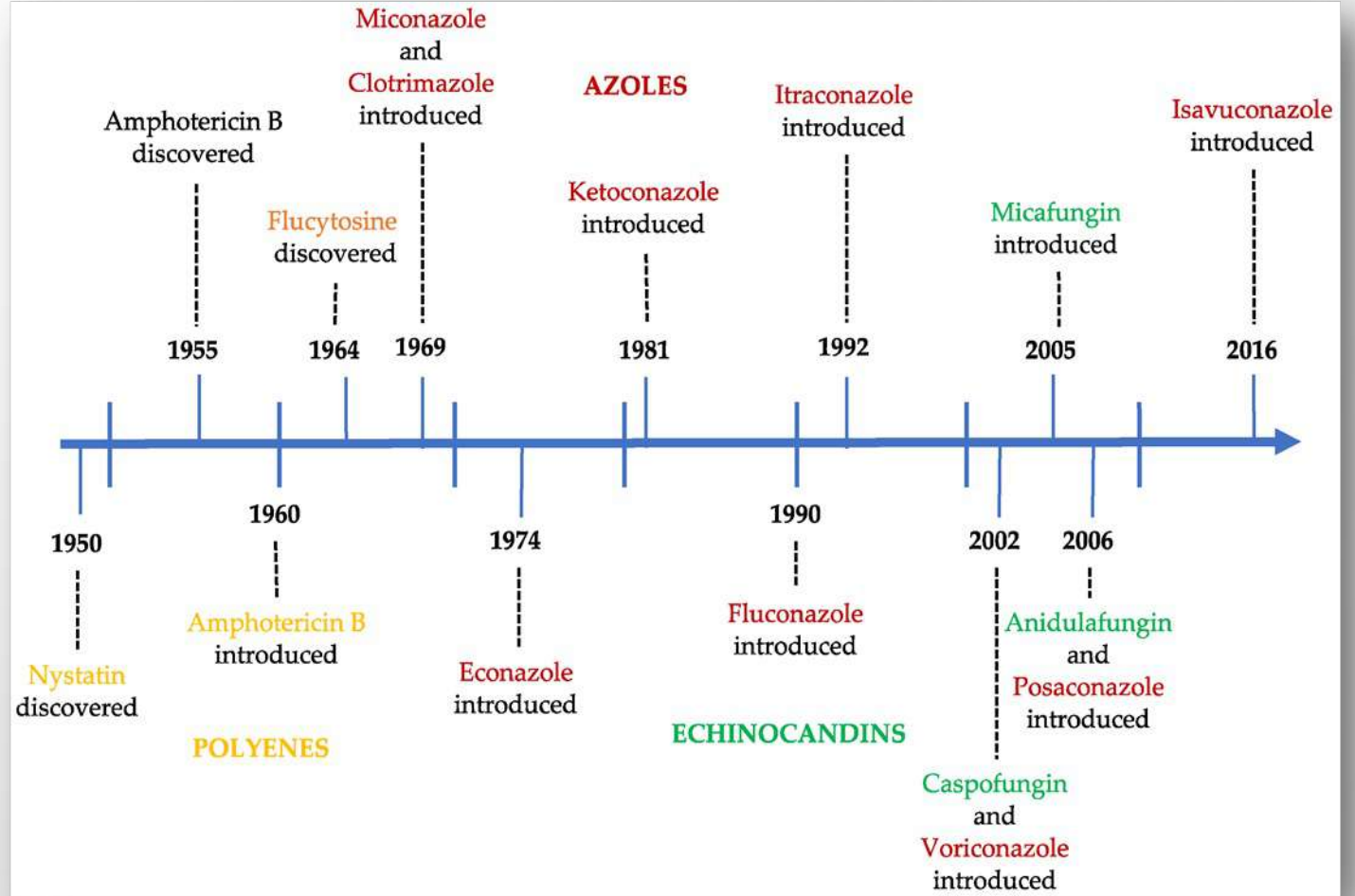


→ **mukormikoz**

Esmer mantarlar → **Feohifomikoz**

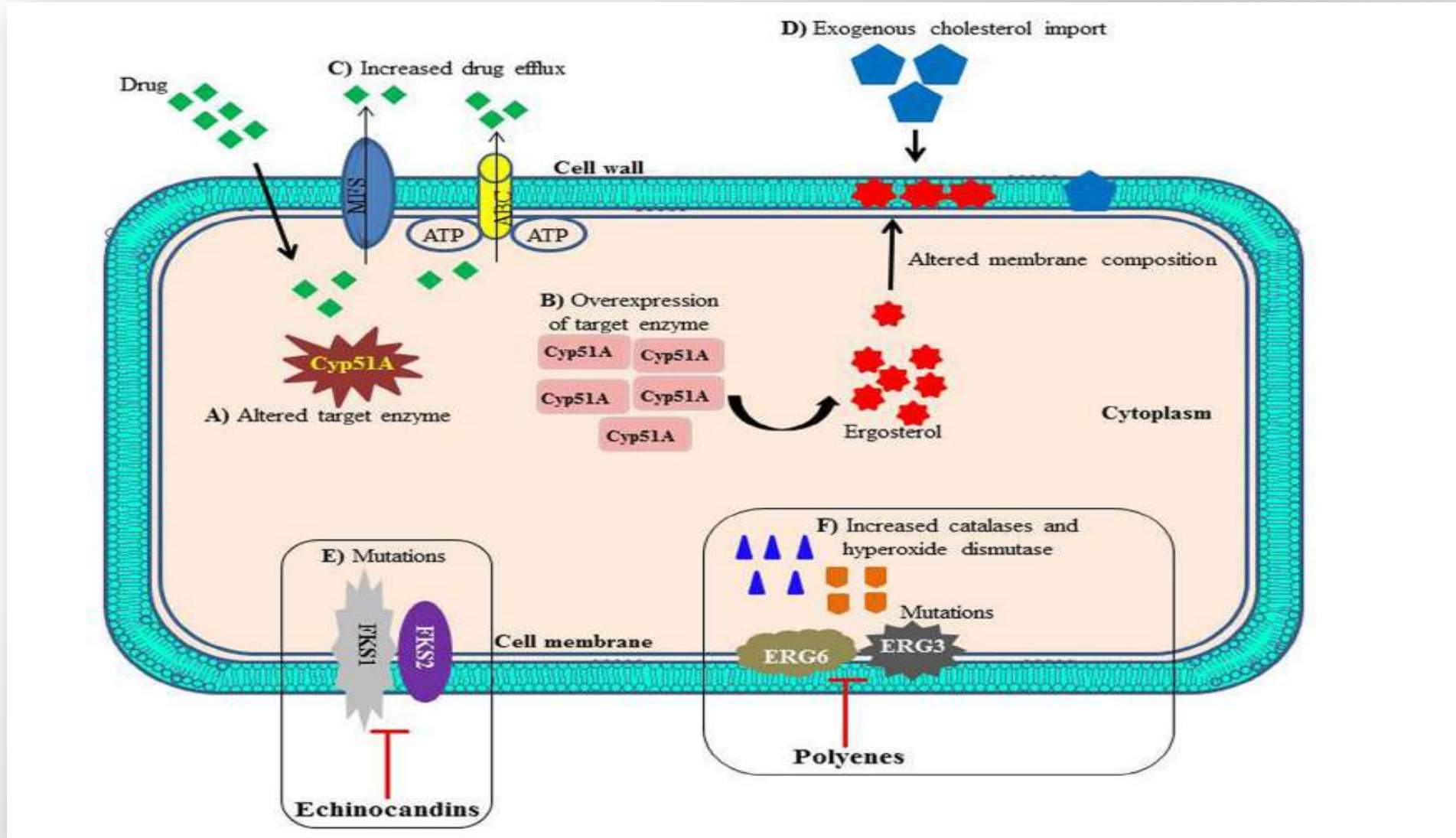
# Antifungal İlaçlar ve Tarihsel Gelişim

- Triazololler
- Poliyenler (Amfoterisin B)
- Ekinokandinler



# Antifungal Direnç

- Primer (İntrinsek) direnç
- Kazanılmış direnç

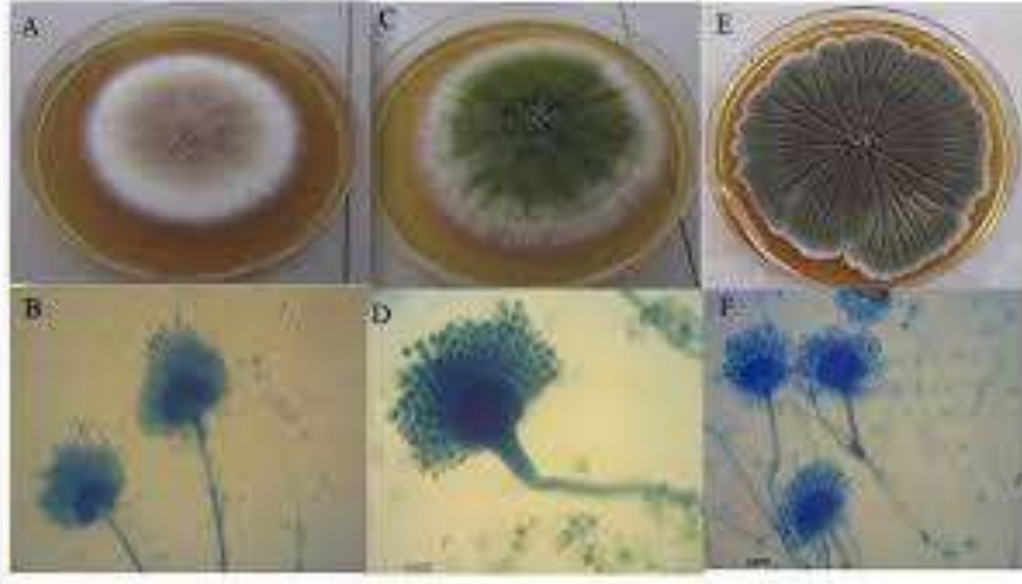


# Azoller ve *Aspergillus* türleri



## *Aspergillus* türleri

- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus terreus*



İntrinsek olarak triazolere (itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, izavukonazol) duyarlıdırlar

# Kriptik *Aspergillus* Türleri



- *Sensu stricto* türler
- Kriptik (Sibling) türler

Yapılan çalışmalarda %6-15 arasında buldukları gösterilmiş

- *Aspergillus niger*'de bu oran çok daha yüksek
  - İzolatların %18-51 *Aspergillus tubingensis* olarak bulunmuş
  - *A. tubingensis* suşlarında itrakonazol MİK'leri çok daha yüksek

Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Pelaez T, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(7):3380–7.

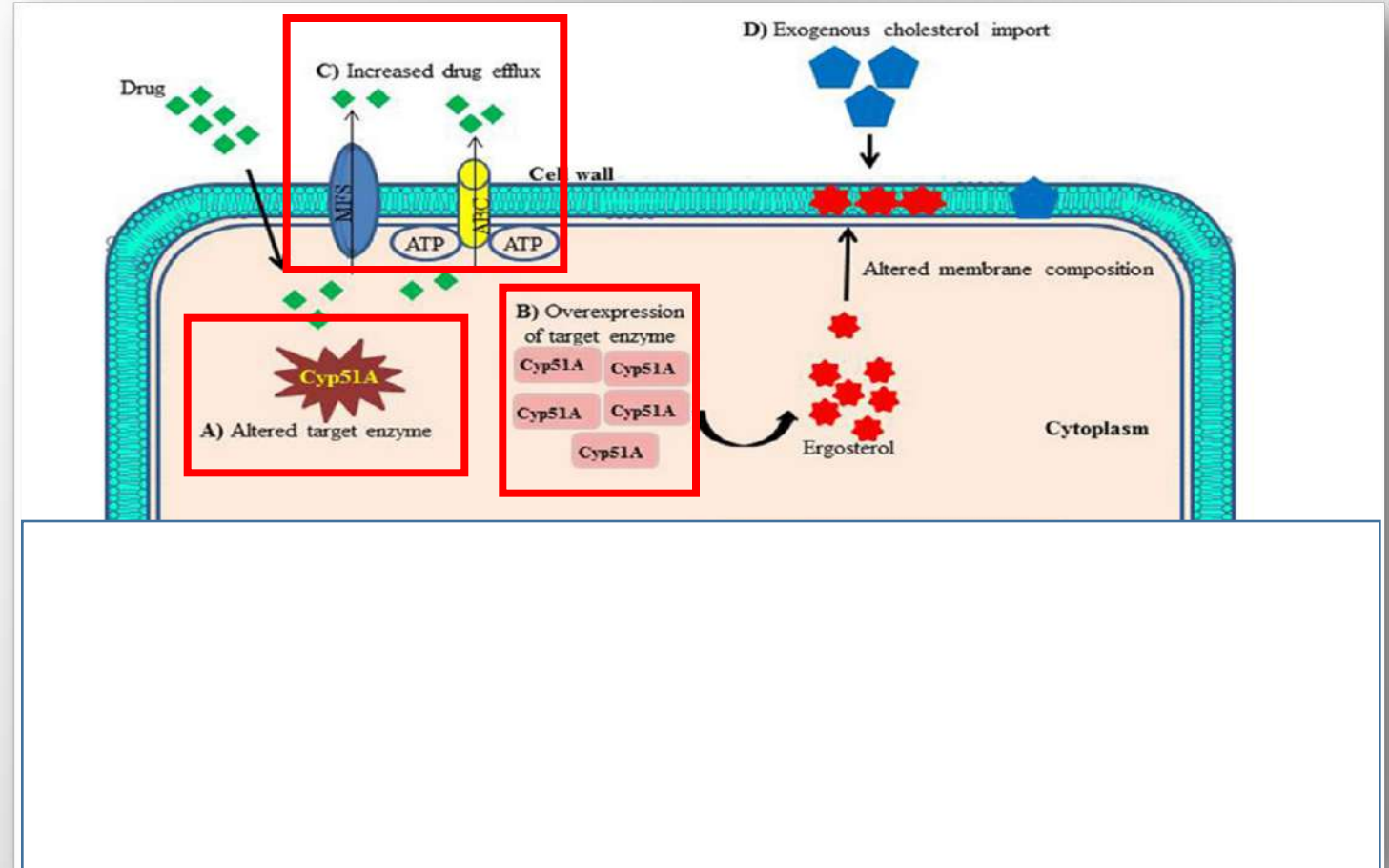
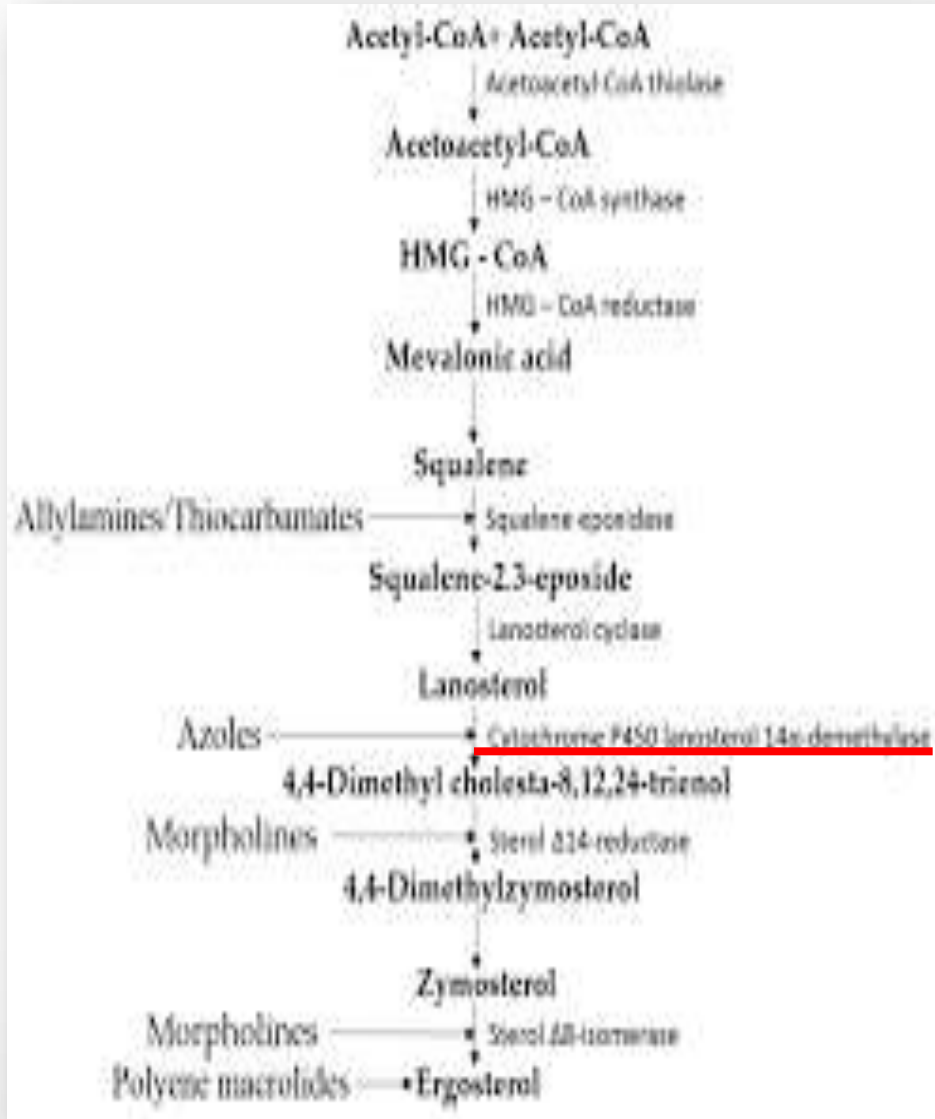
Balajee SA, Kano R, Baddley JW, et al. *J Clin Microbiol* 2009;47(10):3138–41.

Antifungallere karşı yüksek veya değişken MİK oluşturan kriptik türler

- Usti tür kompleksi
  - *Aspergillus calidoustus* (Azole, AmB ve CFG)
  - *Aspergillus pseudodeflectus*
- Fumigati tür kompleksi
  - *Aspergillus lentulus* (AmB, azoler ve CFG)
  - *Aspergillus fumigatiaffinis*
  - *Aspergillus viridinutans*
  - *Neosartorya pseudofischeri*
  - *Aspergillus udagawae* (AmB, Vor)

AmB ve tüm azoller

# Azollerin Etki Mekanizması ve Direnç Gelişimi



# *Aspergillus fumigatus*'da Azol Direnci

- 14  $\alpha$ -demetilaz enzimini kodlayan *cyp51 A* geninde mutasyon

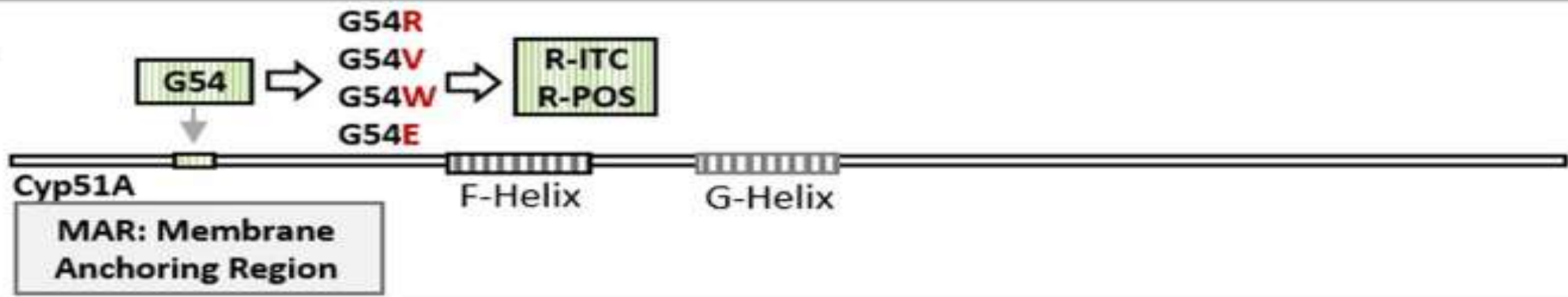
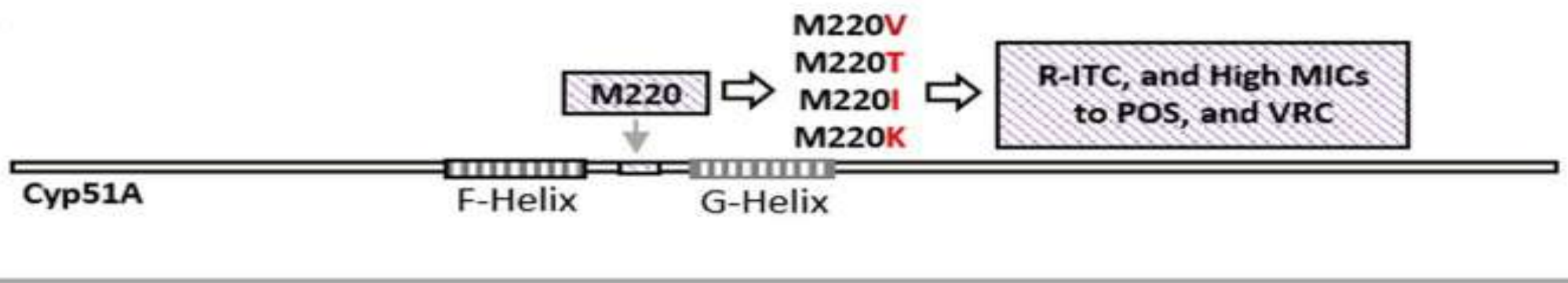
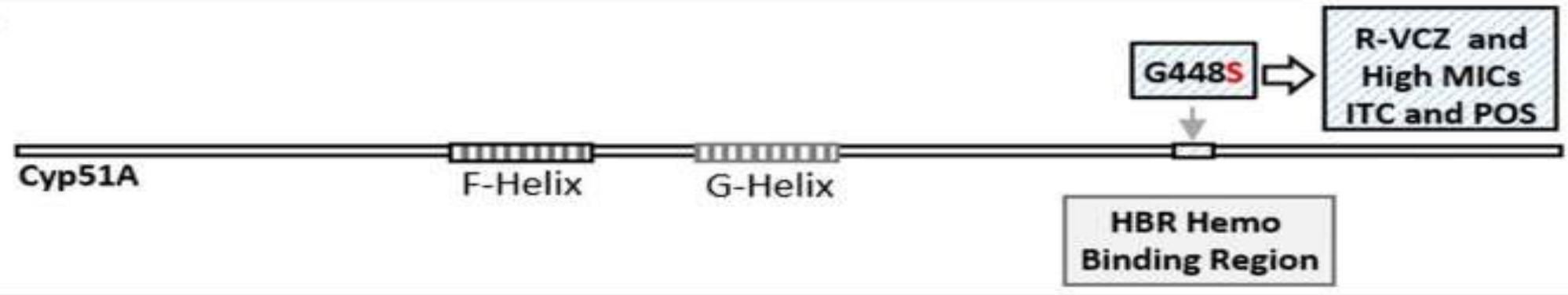
- G54 kodonunda mutasyon
  - İtrakonazol ve Posakonazol direnci
- M220 kodonunda mutasyon
  - Tüm azoller
- G448 kodonunda mutasyon
  - Vorikonazol

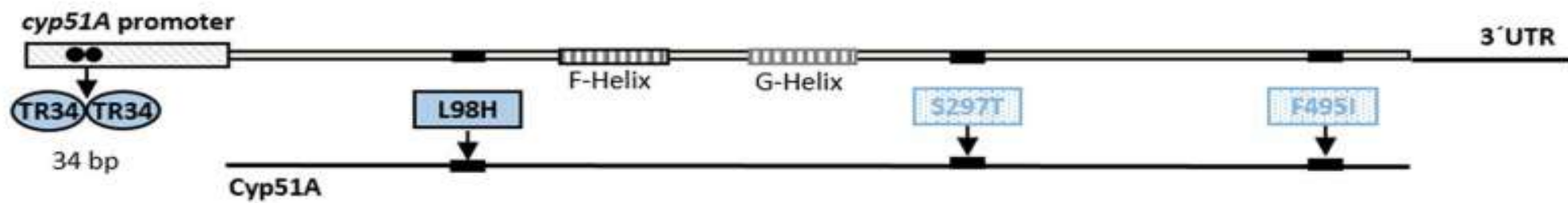
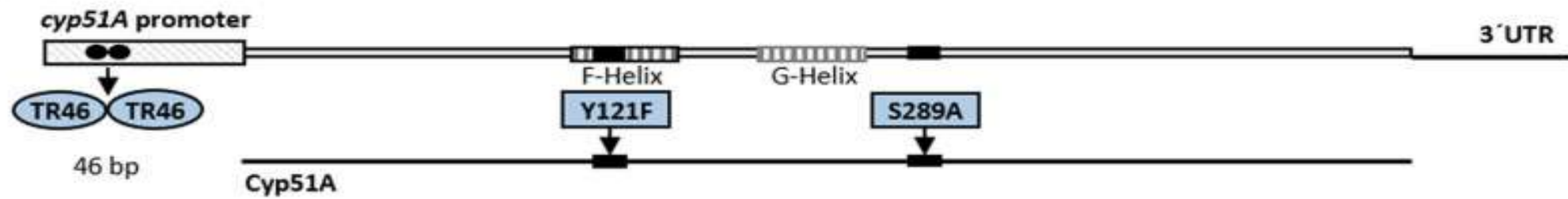
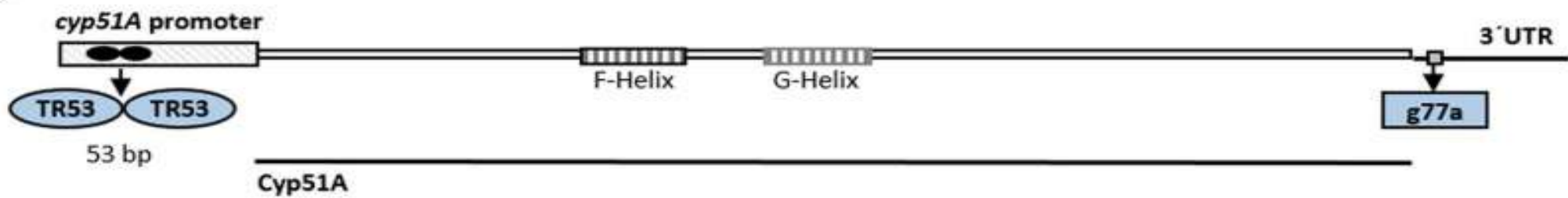
Azollerin uzun süre kullanılması

- **TR34/L98H** mutasyonu
  - Tüm azoller
- **TR46/Y121F/T289A**
  - Vorikonazol

- Zirai azol birleşikleri
  - Gıdaların korunmasında
  - Bitkilerin korunmasında
  - Eşya korunmasında
- Azol naif kişileri de enfekte edebilir



**A****B****C**

**A****B****C**

# *Aspergillus fumigatus*'da azol direncinin yaygınlığı



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**Journal of Infection and Chemotherapy**

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jic>

Original article

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

Gülşah Ece Özmerdiven<sup>a</sup>, Seçil Ak<sup>b</sup>, Beyza Ener<sup>a,\*</sup>, Harun Ağca<sup>a</sup>, Burcu Dalyan Cilo<sup>a</sup>, Berrin Tunca<sup>b</sup>, Halis Akalın<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Görükle, 16059 Bursa, Turkey  
<sup>b</sup> Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Görükle, 16059 Bursa, Turkey  
<sup>c</sup> Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Görükle, 16059 Bursa, Turkey

CrossMark

%0,8-%27

# Ülkemizde *Aspergillus fumigatus* suşlarında azol direnci

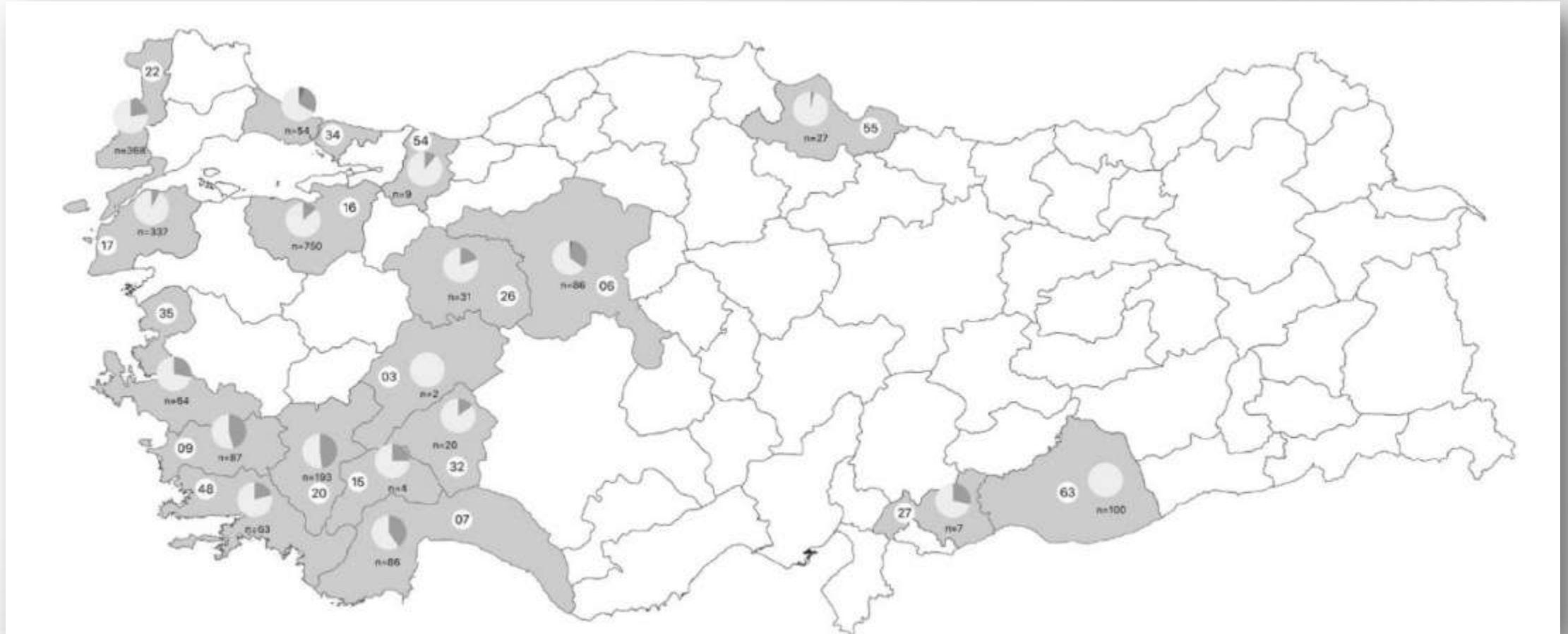
*J Antimicrob Chemother* 2022; **77**: 1894–1898  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkac125> Advance Access publication 21 April 2022

**Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

## **Frequency of azole resistance in clinical and environmental strains of *Aspergillus fumigatus* in Turkey: a multicentre study**

Beyza Ener<sup>1\*</sup>, Çağrı Ergin<sup>2</sup>, Dolunay Gülmez<sup>3</sup>, Harun Ağca<sup>1</sup>, Melek Tikveşli<sup>4</sup>, Seçil Ak Aksoy<sup>5</sup>, Müşerref Otkun<sup>6</sup>, Ali Korhan Siğ<sup>3</sup>, Dilara Ögünç<sup>7</sup>, Betil Özhak<sup>7</sup>, Tuncay Topaç<sup>8</sup>, Aslı Özdemir<sup>6</sup>, Dilek Yeşim Metin<sup>9</sup>, Süleyha Hilmioğlu Polat<sup>9</sup>, Yasemin Öz<sup>10</sup>, Nedret Koç<sup>11</sup>, Mustafa Altay Atalay<sup>11</sup>, Zayre Erturan<sup>12</sup>, Asuman Birinci<sup>13</sup>, Nilgün Çerikçioğlu<sup>14</sup>, Demet Timur<sup>1</sup>, Fahriye Ekşi<sup>15</sup>, Gonca Erköse Genç<sup>12</sup>, Duygu Findik<sup>16</sup>, Şaban Gürcan<sup>4</sup>, Ayşe Kalkancı<sup>17</sup> and Sevtap Arikan-Akdaglı <sup>3</sup>

# Ülkemizde *Aspergillus fumigatus* suşlarında azol direnci



# Ülkemizde *Aspergillus fumigatus* suşlarında azol direnci

Isolate	City code	Sample type	Age (years)	MIC (mg/L) - EUCAST E.DEF 9.3			cyp51A mutation
				itraconazole	voriconazole	posaconazole	
ÇK1	34	hospital environment	-	4	4	2	none
CRK1	34	hospital environment	-	4	4	2	none
CRK2	34	hospital environment	-	4	4	2	none
011KS06SN-B1	06	hospital environment	-	0.5	0.5	0.5	none
011KS06SN-B2	06	hospital environment	-	0.5	0.5	0.5	none
267MT22MR/B	22	hospital environment	-	2	2	2	none
60986	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
61568	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
62946	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
63413	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
63653	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
64955	16	hospital environment	-	2	2	2	TR34/L98H
2455	06	pleural fluid	-	>8	>8	2	TR34/L98H
457	06	pus	-	>8	>8	2	TR34/L98H
MY	27	bronchoalveolar lavage fluid	-	2	2	0.5	TR34/L98H
RT1	34	sputum	75	4	4	0.5	none
RT2	34	sputum	75	4	4	0.5	none
11b	07	sputum	18	4	4	2	none
13b	07	sputum	54	>8	4	2	none

- Çevre izolatlarında %1,3
- Klinik izolatlarda %3,3

# Diğer *Aspergillus* Türlerinde Azol Direnci

- Muhtemelen daha nadir izole edildiklerinden bilgiler çok daha kısıtlı
- *Aspergillus flavus*
  - En fazla Hindistan'dan çalışma var ve %2,5-4 oranında direnç belirtilmekte
  - Hedef gende bazı mutasyonlar bulunmakla beraber daha fazla çalışmaya ihtiyaç var
- *Aspergillus terreus*
  - Danimarka, İspanya ve ABD'den bildirilen dirençli suşlar var
  - *Cyp51A* geninde bazı nokta mutasyonlar dirençli suşlarda tespit edilmiş
    - G51A, M271I,T,V ve D344N
- *Aspergillus niger*
  - İzolatların %18-51 *Aspergillus tubingensis* olarak bulunmuş. Bu suşlarda itrakonazol direnci var

# *Fusarium* Türlerinde Azol Direnci

- *Fusarium* türleri birçok antifungale karşı primer dirençlidir
- Farklı türler farklı antifungal aktivite göstermektedir
- İnvaziv infeksiyonlarda vorikonazol ilk seçenek olmakla beraber, dirençli suşlar vardır

Species (n)	MIC/MEC (mg/L)													
	Amphotericin B		Voriconazole		Posaconazole		Fluconazole		Itraconazole		Anidulafungin		Caspofungin	
	MIC	GM	MIC	GM	MIC	GM	MIC	GM	MIC	GM	MEC	GM	MEC	GM
	Range	MIC	Range	MIC	Range	MIC	Range	MIC	Range	MIC	Range	MEC	Range	MEC
<b>FSSC (15)</b>	<b>0.25-2</b>	<b>0.91</b>	<b>2-16</b>	<b>6.06</b>	<b>0.12-&gt;16</b>	<b>12.12</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>
<i>Fusarium petroliphilum</i> (FSSC-1) (6)	0.25-1	0.71	8-16	8.98	>16	>16	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<i>Fusarium solani</i> s.s (FSSC-5) (6)	0.25-1	0.79	2-8	4.49	>16	>16	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (FSSC-2) (2)	2	2	8	8	0.12-16	1.41	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<i>Fusarium solani</i> haplotype 6 (1)	2	2	2	2	>16	>16	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<b>FFSC (17)</b>	<b>0.12-8</b>	<b>0.88</b>	<b>1-8</b>	<b>2.77</b>	<b>0.12-16</b>	<b>2.26</b>	<b>16-64</b>	<b>58.99</b>	<b>8-64</b>	<b>56.63</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>8-16</b>	<b>15.36</b>
<i>Fusarium proliferatum</i> (FFSC)(13)	0.12-1	0.59	1-8	3.60	0.12-16	4.22	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<i>Fusarium verticillioides</i> (FFSC)(3)	2-4	2.51	1	1	0.12-0.25	0.20	>64	>64	>64	>64	>16	>16	>16	>16
<i>Fusarium andiyazi</i> (1)	8	8	2	2	1	1	16	16	8	8	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	8	8
<b>FOSC (1) <i>Fusarium oxysporum</i></b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>
<b>FDSC (2) <i>Fusarium dimerum</i></b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>4-8</b>	<b>5.65</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>
<b>TOTAL (35)</b>	<b>0.12-8</b>	<b>0.85</b>	<b>1-16</b>	<b>4</b>	<b>0.12-16</b>	<b>5.38</b>	<b>16-&gt;64</b>	<b>61,51</b>	<b>8-&gt;64</b>	<b>60.30</b>	<b>&gt;16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>8-&gt;16</b>	<b>15,67</b>

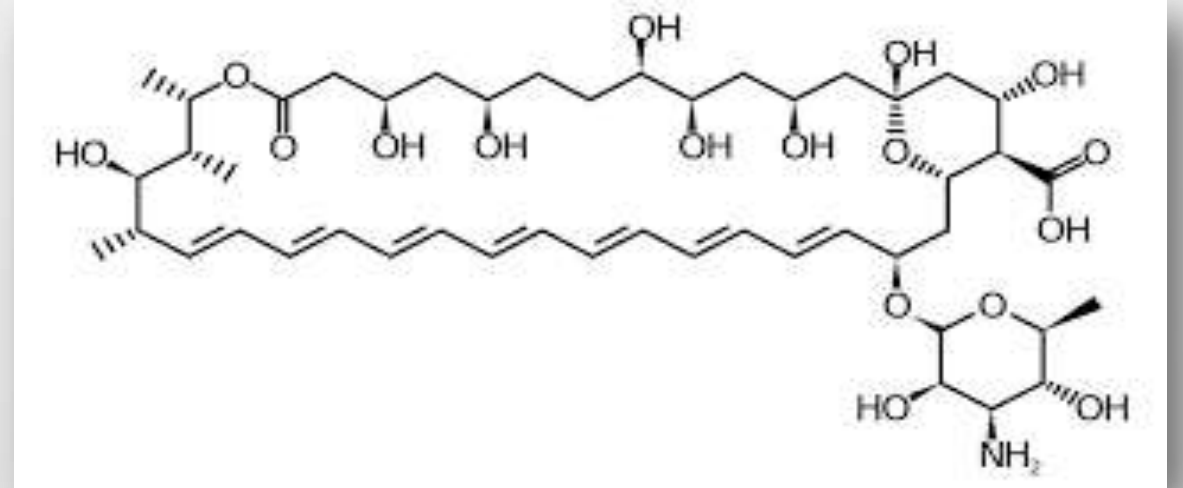


# Diğer Küf Mantarlarında Azol Direnci

- *Rhizopus* türlerinde posakonazol ve *Mucor circinelloides*'de isavuconazol MİK'leri daha yüksektir
- *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium aurantiacum*, *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*) azol MİK'leri yüksek
- *Paecilomyces variotii* dahil *Paecilomyces* türleri azol MİK'leri yüksek

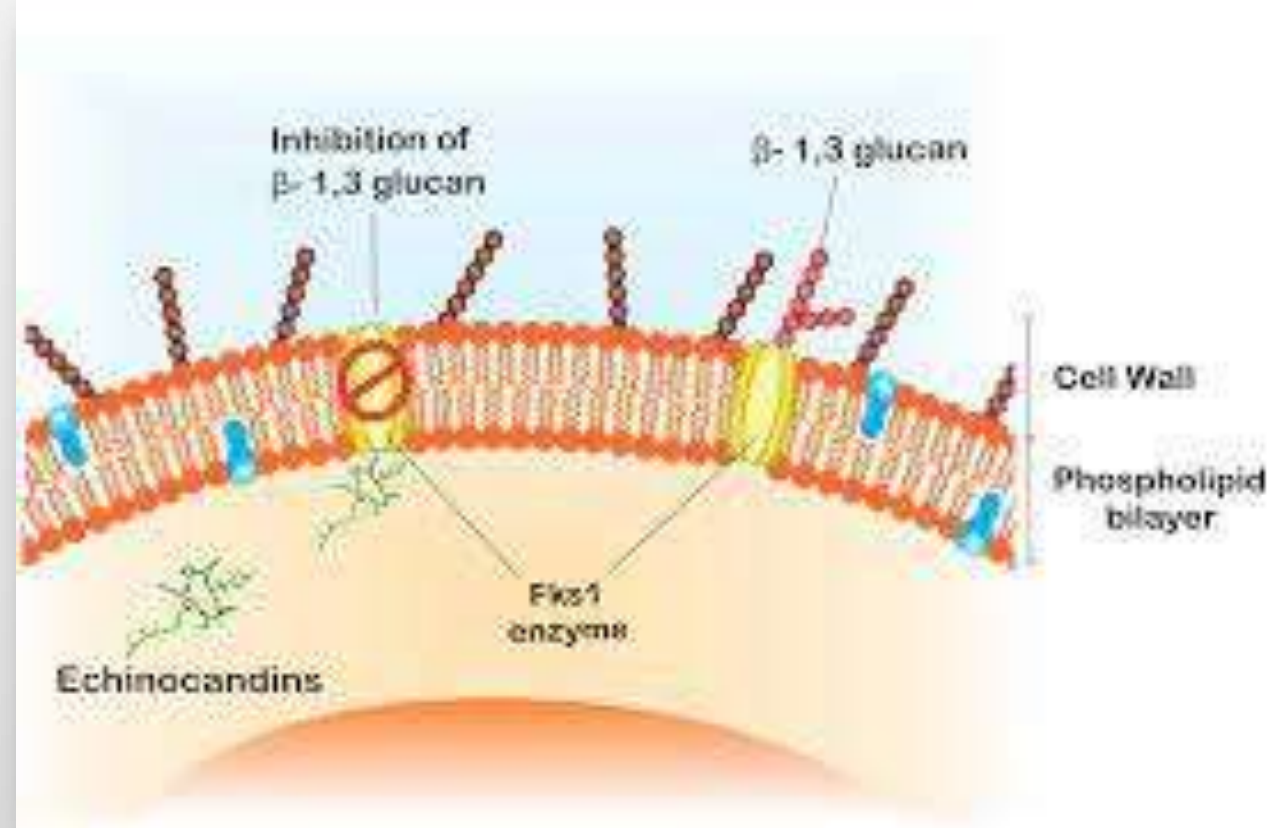
# Amfoterisin B Direnci

- Uzun yıllar kullanılan bir ilaç olmakla beraber dirençle ilgili bilgilerimiz kısıtlı
- Primer dirençli türler bilinmektedir
  - *Aspergillus* türleri
    - *A. terreus*
    - *A. flavus*
    - *A. lentulus*
    - *A. ustus*
  - *Scedosporium apiospermum*
  - *Cunninghamella* türleri
- Kazanılmış direnç oldukça nadirdir



# Ekinokandin Direnci

- Ekinokandinler *Aspergillus* türlerine fungistatik etkilidirler
- *Aspergillus* enfeksiyonlarının primer tedavisinde yerleri yoktur. Ancak kurtarma tedavisinde kullanılabilirler
- Birçok küf mantarı ekinokandilere karşı primer dirençlidir
  - *Fusarium* türleri
  - Mucorales takımı
- *Aspergillus* türlerinde kazanılmış direnç oldukça nadirdir



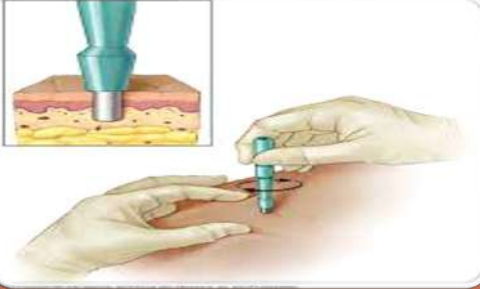
# Antifungal Direncin In Vitro Belirlenmesinde

## SPECIMEN COLLECTION



WWW.NURSEINFO.IN  
WWW.CANESTAR.COM

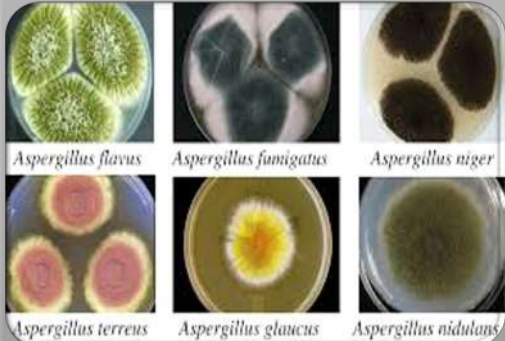
## Yeterli örnek alınması



## Hangi örneklerdeki küf üremeleri dikkate alınmalıdır

- Kan kültürü (*Aspergillus* X, *Fusarium* √, *Scedosporium* √)
- Biyopsi örnekleri (Sinonazal, akciğer, deri, serebral vs)
- Solunum yolu örnekleri (BAL > BL > DTA > Balgam)

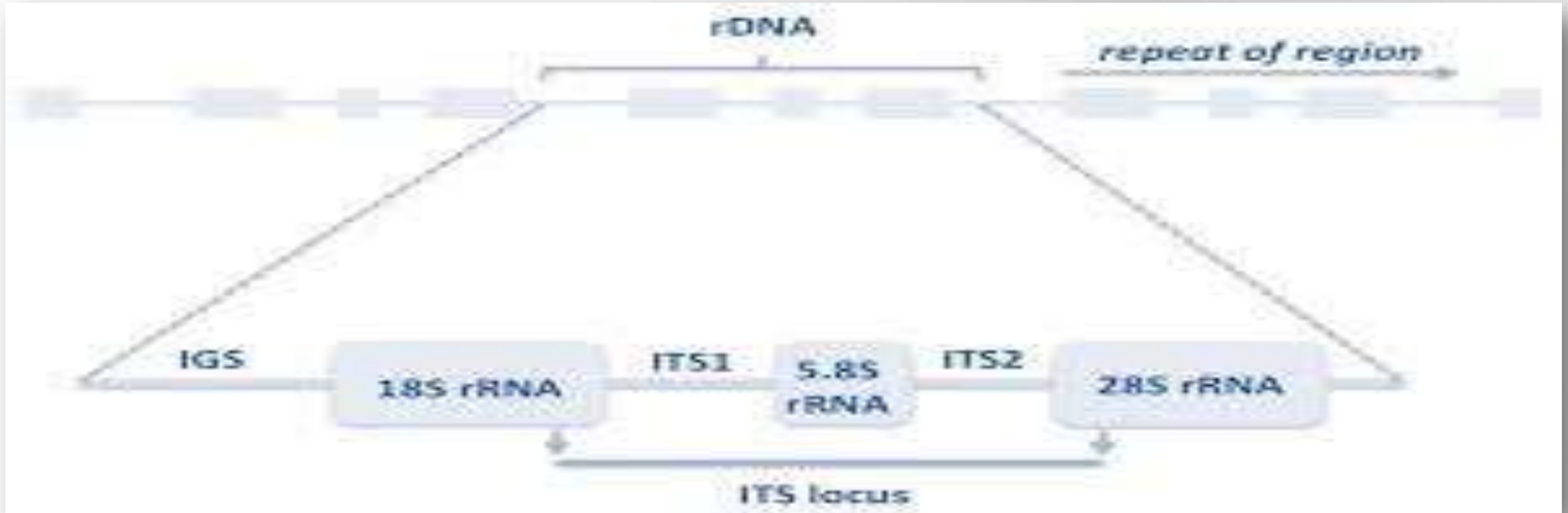
## Doğru tanımlama



- Tür düzeyinde tanımlama az
  - *Aspergillus* tür kompleksi düzeyinde
  - Mucorales takım düzeyinde
  - *Fusarium*, *Scedosporium* vb cins düzeyinde

# Tür Düzeyinde Tanımlama

## 1. Moleküler tanımlama



## 2. MALDI-TOF-MS ???

# In Vitro Antifungal Duyarlılıkta Hangi Yöntem

- ✓ Yeterli örnek gönderilmesi önemli
- ✓ Doğru örneklerdeki üremelerin bilinmesi önemli
- ✓ Tür düzeyinde tanımlama önemli
  - ✓ *A. terreus*, *A. flavus* üredi. AmB X, Vor v
  - ✓ *A. lentulus* üredi
  - ✓ *Scedosporium* üredi
  - ✓ *Mucorales* üredi. Vor X, AmB v
- ✓ Antifungal duyarlılık çalışılmaya karar verildi. Hangi yöntem?
  - ✓ CLSI M38
  - ✓ EUCAST E.DEF 9.4



# In Vitro Antifungal Duyarlılıkta Kılavuzlar ? *Aspergillus* Kılavuzu



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)



Original article

Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline

Please cite this article in press as: Ullmann AJ, et al., Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline, Clinical Microbiology and Infection (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002>

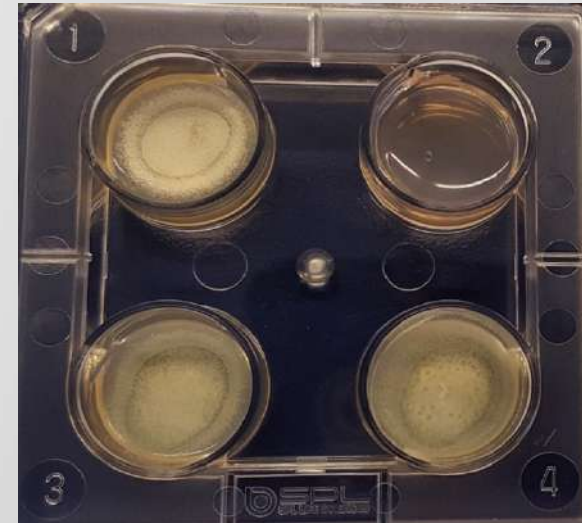
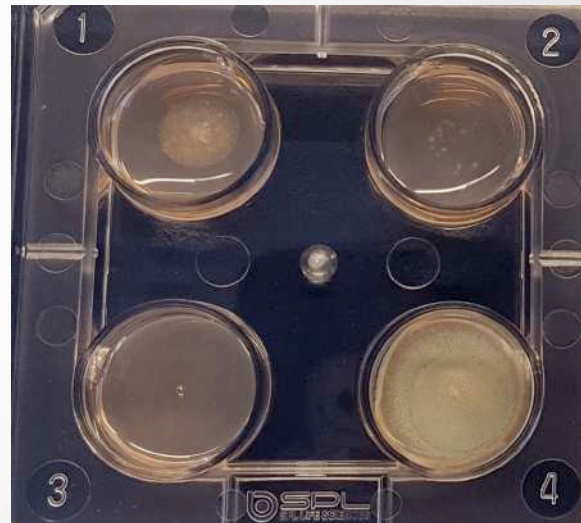
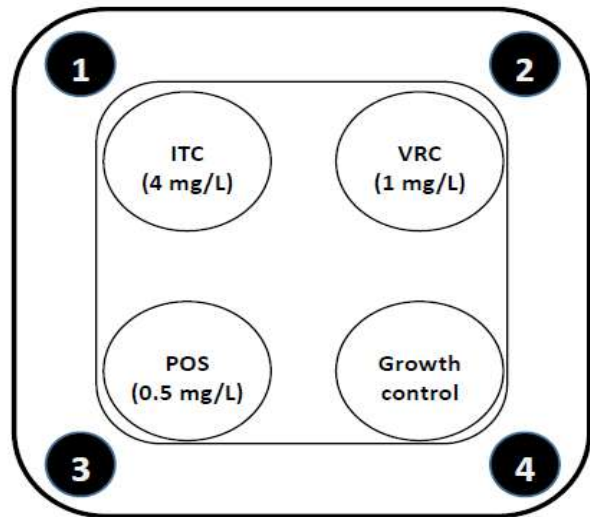
Original article

Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline

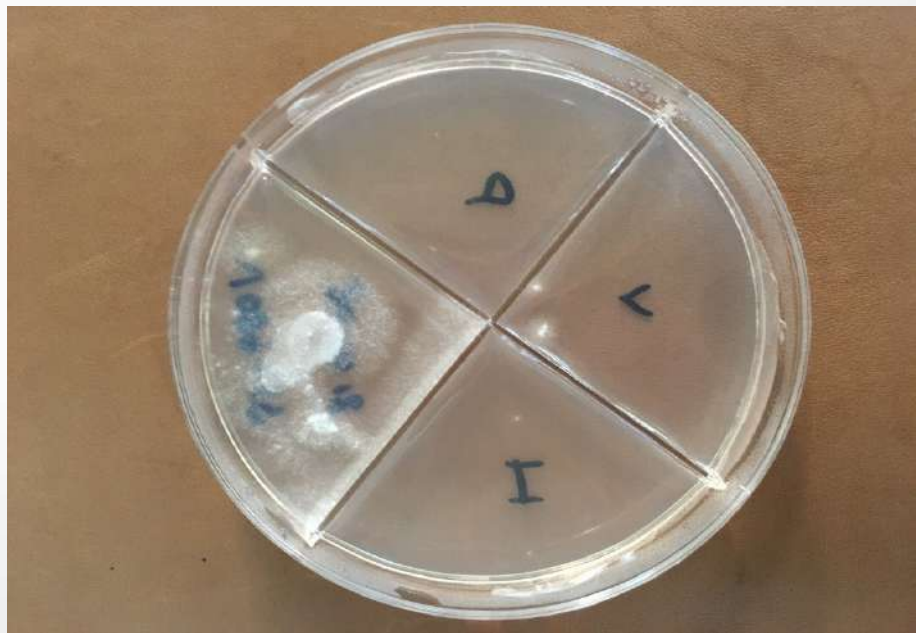
- *A. fumigatus*'da azol direnci global problem
- Kriptik suşlarda direnç problem
- Öncelikle
  - Epidemiyolojik veri oluşturmak (>100 suş) (All)
  - Tür düzeyinde tanımlama için çaba sarf etmek (All)
- Azol direnci olan bir bölge (izolatların %10'unda fazlasında direnç)
  - Klinik olarak anlamlı izolatlara duyarlılık bakılmalı (Referans yöntem) (All)
  - Referans yöntem çalışılmıyorsa tarama yapılması (All). Direnç bulunursa referans yöntemle doğrulanması



# 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>.



# Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

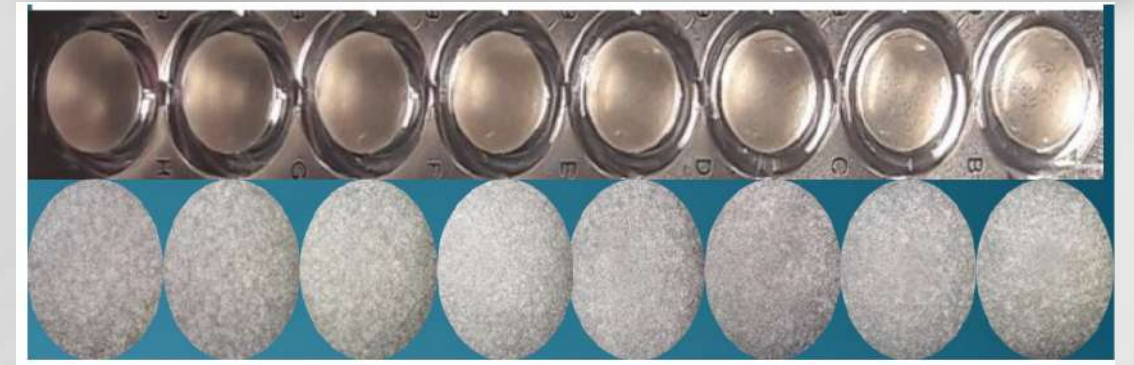
[www.thelancet.com/infection](http://www.thelancet.com/infection) Published online November 4, 2019 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3)

- Rutin kullanımı önerilmiyor
- Epidemiyolojik açıdan tür tanımlaması ve antifungal patern öneriliyor
  - Tür tanımlamasında altın standart ITS bölgesi, MALDI-TOF ??
  - Antifungal duyarlılık referans yöntemler (CLSI, EUCAST)

# Referans Antifungal Duyarlılık Testleri

## CLSI veya EUCAST

- Broth mikrodilüsyon yöntemi
- Ticari bulunmuyor, merkezlerde dökülmesi gerekiyor
- Sonuçlar
  - Amfoterisin B ve azollerde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak ifade ediliyor
  - Ekinokandinlerde minimum efektif konsantrasyon (MEK) olarak ifade ediliyor.
  - MEK belirlemek teknik olarak zor. Deneyim gerektirir





Species	Drug	ECOFF (mg/L) WT ≤	Clinical Breakpoints (mg/L)				Recommendation for area of technical uncertainty (ATU) results
			S ≤	I	R >	ATU	
<i>A. flavus</i>	Amphotericin B	4	-		-		
	Anidulafungin	ND	ND		ND		
	Micafungin	ND	ND		ND		
	Fluconazole	ND	ND		ND		
	Itraconazole	1	1		1	2	Report as R with the comment that in some clinical situations (non-invasive infections) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured.
	Posaconazole	0.5	ND		ND		
	Voriconazole	2	ND		ND		
	Isavuconazole	2	1	#	2	2	If voriconazole wild-type (voriconazole MIC ≤ 2 mg/L) report as isavuconazole S and add the following comment: The MIC of 2 mg/L is one dilution above the S breakpoint but within the wild-type isavuconazole MIC range for <i>A. flavus</i> . Clinically documented isavuconazole resistance in absence of voriconazole resistance is extremely rare and mechanisms conferring isavuconazole monoresistance have not been described. See rationale documents for more information. If voriconazole non wild-type report as isavuconazole R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs <sup>3</sup>
<i>A. fumigatus</i>	Amphotericin B	1	1		1		
	Anidulafungin	ND	ND		ND		
	Micafungin	ND	ND		ND		
	Fluconazole	ND	ND		ND		
	Itraconazole	1	1		1	2	Report as R with the comment that in some clinical situations (non-invasive infections) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured.
	Posaconazole	0.25	0.125	#	0.25	0.25	If S to itraconazole, report as S and add the following comment: The MIC is 0.25 mg/L and thus one dilution above the S breakpoint due to overlapping wt and non-wt populations. If not S to itraconazole, report as R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs.

(A)



Sampling of Clinical Specimen



Diagnosis & Identification



- Patient suspected to suffer from an IFI

- Blood
- Biopsy Tissue Specimen
- Sputum

- Blood Culture
- Histopathology
- Glactomannan assays
- Chromogenic agar
- PCR

(B)



1-3 days

1-3 days

≥ 1 day



# Kültür Dışı Yöntemlerle Antifungal Direnç Belirleme

- Özellikle invaziv aspergilloz olgularının önemli bir kısmı kültür dışı yöntemlerle belirleniyor
  - Galaktomannan antijen testi
  - PCR ile özgül nükleik asitlerin belirlenmesi

Aspergenius<sup>®</sup> multiplex real-time PCR detects *Aspergillus* TR<sub>34</sub>/L98H; TR<sub>46</sub>/T289A; TR<sub>46</sub>/Y121F gene mutations in *cyp51A*

Aspergenius<sup>®</sup> multiplex real-time PCR detects G54 and M220 RUO in *cyp51A* of *A. fumigatus*

MycoGENIE<sup>®</sup> detects *A. fumigatus* TR<sub>34</sub>/L98H gene mutations<sup>35-38</sup>

FungiplexR<sup>®</sup> *Aspergillus* Azole-R IVD real-time PCR detects *A. fumigatus* TR<sub>34</sub> and TR<sub>46</sub><sup>24,38</sup>



# SONUÇ

- Ülkemizde en büyük eksiklik epidemiyolojik verinin olmaması
- Her merkezin kendi epidemiyolojik verisini oluşturması gerekir
- Global bir sorun olan *A. fumigatus*'da azol direnci ülkemiz için çok sıkıntılı değil (%3,3)
- Küfler için antifungal duyarlılık testleri zaman alıcı (7-10 gün)
- Tarama yapmak daha kolay ve hızlı
- Etken olduğu düşünülen nadir bir mantarlarla karşılaşıldığın doğru tür tanımları ve referans yöntemlerle antifungal duyarlılık paterni gerekli