

İnvazif Fungal İnfeksiyonların Tanısı: Kültür ve Antifungal Duyarlılık Testleri

Diagnosis of Invasive Fungal Infections: Culture and Antifungal Susceptibility Tests

Özlem Doğan 

Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Özet

Tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki son gelişmelere ve artan seçeneklere rağmen bağımsızlığı baskılanmış hasta sayısındaki artışla birlikte invazif fungal infeksiyonların sıklığı da giderek artmaktadır. Mantar infeksiyonlarının tanısında kültür, altın standard olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda, moleküler ve serolojik yöntemlerdeki hızlı gelişmelere rağmen kültür, antifungal duyarlılık testlerine olanak vermesi nedeniyle halen son derece önemlidir. Antifungal ilaçlara direnç, bazı mantar türlerinde doğal olarak görülebileceği gibi klinik uygulamada ya da tarımda antifungallerin yoğun kullanımı sonucunda da kazanılabilir. Ayrıca, antifungal duyarlılık testlerinin sonuçlarının doğru şekilde yorumlanabilmesi açısından etkenin tür ya da kompleks düzeyinde tanımlanması son derece önemlidir. Rutin laboratuvarlarda antifungal duyarlılık testleri, izolasyon, kan ve beyin-omurilik sıvısı gibi steril vücut bölgesinden olduğunda; izole edilen türle ilgili daha önceden bildirilmiş direnç beklendiğinde ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda kazanılmış direnç şüphesi olduğunda uygulanmalıdır. Sonuç olarak, mantar hastalıklarının geleneksel kültür yöntemleriyle tanımlanması, zaman alıcı olmasına ve sonuçların yorumlanması için deneyimli personel gerektirmesine rağmen, tür düzeyinde tanımlamaya ve antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak vermesi açısından vazgeçilmezdir.

Klimik Dergisi 2019; 32(Özel Sayı 2): 128-30.

Anahtar Sözcükler: Kültür, antifungal duyarlılık testleri, tanımlama, antifungal direnci.

Abstract

Despite recent advances in diagnostic and therapeutic approaches and increasing options, the incidence of invasive fungal infections is rising with the increase in the number of immunosuppressed patients. Culture is accepted as the gold standard for diagnosis of fungal infections. Despite rapid advances in molecular and serological methods in recent years, culture is still extremely important because it allows for antifungal susceptibility testing. Resistance to antifungal drugs can be seen naturally in some species of fungi or can be acquired as a result of extensive usage of antifungals in clinical practice or agriculture. Furthermore, it is very important to identify the agent at the species or complex level in order to interpret the results of the antifungal susceptibility tests correctly. Antifungal susceptibility tests should be performed in the routine laboratories, when the fungus is isolated from a sterile body site such as blood and cerebrospinal fluid, when a reported resistance to the isolated species is expected, and when there is a risk of acquired resistance in patients who do not respond to treatment. In conclusion, the identification of fungal diseases by conventional culture methods is indispensable as it permits a species-level identification and antifungal susceptibility testing, despite being time-consuming and requirement of an experienced staff to interpret the results.

Klimik Dergisi 2019; 32(Suppl. 2): 128-30.

Key Words: Culture, antifungal susceptibility tests, identification, antifungal resistance.

Giriş

Son yıllarda bağımsızlığı baskılanmış, hematolojik ve solid organ malignitesi olan, kanser tedavisi alan hasta sayısındaki artışla birlikte invazif fungal infeksiyon (İFİ) sıklığı da giderek artmaktadır. Kazanılmış bağımsızlık yet-

mezliği olan, yoğun bakım ünitesinde takip edilen, geniş spektrumlu antibiyotik alan ve özellikle karın cerrahisi geçirmiş olan hastalar da mantar infeksiyonları açısından risk altındadır. Doğada bulunan hemen her mantar türü duyarlı konakta İFİ'ye neden olabilmektedir. Klinik-

ORCID ID of the author: Ö.D. 0000-0002-6505-4582

Cite this article as: Doğan Ö. [Diagnosis of invasive fungal infections: culture and antifungal susceptibility tests]. *Klimik Derg.* 2019; 32(Suppl. 2): 128-30. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Özlem Doğan, Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rumelifeneri, Sarıyer, İstanbul, Türkiye

E-posta/E-mail: ozldogan@ku.edu.tr

(Geliş / Received: 17 Mayıs / May 2019; Kabul / Accepted: 20 Haziran / June 2019)

DOI: 10.5152/kd.2019.55

lerde sıkça karşılaştığımız İFİ etkenleri, *Candida* ve *Cryptococcus* türleri gibi mayalar ve *Mucorales* takımı, *Aspergillus*, *Scedosporium* ve *Fusarium* türleri gibi küflerdir (1).

Mantar infeksiyonlarının tanısında etkenin kültürde üretilmesi ve tanımlanması altın standard yöntem olarak kabul edilmektedir. Tıbbi önemi olan mantarların kültürde üretilmesi için bakterilerle karşılaştırıldığında daha uzun inkübasyon süresine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu süre, mayalar için biraz daha kısa olmakla birlikte küfler için haftalar alabilmektedir. Mantar infeksiyonlarının tanısı konulurken etkenin kültürde üretilmesi için geçen süre özellikle kan dolaşımı infeksiyonlarında ya da nötropenik hastalar gibi özelleşmiş konaklarda sağkalımı olumsuz etkilemektedir (2). Bu nedenle İFİ'lerin tanısında kullanılabilecek kültür dışı yöntemler günlük hasta pratiğinde önemli ölçüde yer bulmuştur (3). Ancak, etkenin kültürde üretilmesinin hasta takibine en önemli katkısı, antifungal duyarlılık testlerine olanak vermesidir. Antifungal ilaçlara direnç, bazı mantar türlerinde doğal olarak görülebileceği gibi klinikte ya da tarımda antifungallerin yoğun kullanımına bağlı olarak kazanılmış direnç olarak da karşımıza çıkmaktadır. İFİ tanısında kültür dışı yöntemlerinin doğru kullanımı büyük bir öneme sahipken, kültüre dayalı geleneksel yöntemlerin kullanımı bugün için de vazgeçilmezdir (4).

Kan kültürü, İFİ tanısında altın standard yöntem olup, kılavuzlarda yüksek öneri düzeyiyle yer bulmaktadır. Kandidemilerde, kan kültürü pozitifliğini takiben doğru antifungal tedavinin erken başlanması mortalite üzerine etkilidir (5). Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Fungal İnfeksiyonlar Çalışma Grubu (ESCMID-EFISG) *Candida* infeksiyonları tanı ve tedavi kılavuzunda *Candida* türlerinin yüksek duyarlılıkla izolasyonu için kan kültürünün üç set (her set bir aerop bir anaerop şişe olmak üzere) ve ardışık üç gün alınması, otomatize kan kültürü sistemleriyle inkübasyon süresinin en az beş gün sürdürülmesi önerilmektedir. Fungal kan kültürü şişelerinin kullanılması, özellikle *Candida glabrata* infeksiyonlarında erken pozitif sonuçların yüksek duyarlılıkla elde edilmesini sağlamaktadır (6). Kan kültüründe küflerin üremesi, genellikle kontaminasyon olarak kabul edilmektedir; öte yandan antifungal ilaçlara son derece dirençli olan *Fusarium* ve *Scedosporium* türlerinin fungemi etkeni olabileceği ve bu mantarların etken olduğu fungemilerde etkenin kan kültüründen izolasyon oranının yüksek olduğu akılda tutulmalıdır (7).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarına kriptokokoz şüpheli hastalardan genellikle beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve kan kültürü örnekleri yollanmaktadır. Geleneksel kültür ve tanımlama yöntemlerine dayalı olmayan serolojik ve moleküler testler, *Cryptococcus* türlerinin etken olduğu invazif infeksiyonlarda yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (8). Bu testlerin uygulanmadığı laboratuvarlarda ise *Cryptococcus* türlerinin ayrıştırılması için geleneksel boyama ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Çini mürekkebi boyama yöntemiyle etkenin direkt bakıyla doğrudan BOS'ta görülmesi tanıda önemli yer tutmaktadır. Kültürde üreyen *Cryptococcus* türlerinin geleneksel yöntemlerle ayrıştırılması için bu türlerin fenoloksidaz enzimi aktivitesine dayanan özel besiyerleri ve testler kullanılmaktadır (9).

Aspergillus türlerinin doğada yaygın olarak bulunması tıbbi laboratuvarlarda invazif pulmoner aspergiloz (IPA) şüp-

heli hastaların solunum yolu örneklerinin kültür plaklarında kontaminasyona ve bu plakların değerlendirilmesinde zorluklara neden olmaktadır. IPA hastalarında etkenin izolasyonunun duyarlılığı solunum yolu örneğinin türüyle yakından ilişkilidir. Bronşiyal yıkama sıvısı örneklerinde üretilmiş küfler genellikle infeksiyon etkeni olarak kabul edilirken, balgam örneğinde kontaminasyonun dışlanabilmesi için ardışık en az iki kültürde üremenin gözlenmesi gerekmektedir. Laboratuvarında küf kontaminasyonunun yalancı pozitifliğe neden olmaması için birden fazla kültür plağına, farklı yöntemler kullanılarak ekim yapılması, kültür plaklarının farklı sıcaklıklarda inkübasyonu önerilmektedir (10).

Derin doku mikozlarının tanısında uzun inkübasyon süresi ve birden fazla sıcaklıkta (25°C, 30°C ve 37°C) inkübasyon önemlidir. Derin doku mikozlarında en önemli etkenlerden olan *Mucorales* takımından küfler kültür plaklarında 24-48 saat içinde pamuk şekeri benzeri koloniler oluştururlar (11). Diğer hyalen küf mantarları da (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.) derin organ tutulumuna neden olabilirler (12). Ülkemizde sistemik (endemik, gerçek) mikoz etkenlerine rastlanmamakla birlikte, özellikle endemik bölgelere seyahat öyküsü olan hastalarda bu etkenlerin infeksiyonlara neden olabileceği akılda tutulmalıdır (1).

Rutin laboratuvarlarda maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanması amacıyla otomatize ve yarı-otomatize tanımlama yöntemleri ile daha güncel olarak "matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight" gibi kütle spektrofotometrisi yöntemleri kullanılmaktadır. Öte yandan, küfler için bu yöntemler henüz rutin laboratuvarlarda kullanılamamakta, tanımlama daha çok mantarın morfolojik özelliklerinin makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Tıbbi önemi olan birçok küf, benzer morfolojik özellikleri göz önüne alınarak komplekslere ayrılarak gruplandırılmıştır. Ancak aynı kompleks içinde yer alıp, morfolojik olarak tamamen benzer özelliklere sahip küfler antifungal ilaçlara karşı duyarlılık profilleri açısından değişiklik gösterebilmektedir. Birçok küf rutin laboratuvarlarında kompleks düzeyinde ayrıştırılmakta, tür düzeyinde tanımlama ise ileri moleküler tekniklere gereksinim duyulması nedeniyle yapılamamaktadır. Bu nedenle klinikte antifungal tedavi başarısızlığıyla karşılaşılan hastalarda aynı kompleks içindeki kriptik türlerin varlığı sorgulanmalı ve etken tür düzeyinde tanımlama amacıyla referans laboratuvarına gönderilmelidir (13).

Rutin laboratuvarlarında antifungal duyarlılık testleri, izolasyon, kan ve BOS gibi steril vücut bölgesinden olduğunda; izole edilen türle ilgili daha önceden bildirilmiş direnç beklendiği durumlarda ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda sekonder direnç şüphesi durumunda, nadir ve yeni ortaya çıkan bir türle infeksiyon geliştiğinde uygulanmalıdır. Literatürde azol grubu antifungal ilaçlara karşı *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. guilliermondii* olmak üzere birçok *Candida* türünde sekonder direnç bildirilmiştir (14). Yakın zamanda hastanelerde salgın yapabilmemesi nedeniyle gündeme gelen *C.auris* izolatlarında azol, ekinokandin ve amfoterisin B olmak üzere hemen her antifungal ilaca karşı toplu ya da izole direnç saptanmaktadır (15). Güncel yayınlarda flukonazole dirençli klonal *C.parapsilosis* izolatlarının da hastanelerde salgınlar yaptığı

gösterilmiştir (16). Kandidemi etkenleri izolasyon sıklığı açısından değerlendirildiğinde, *C. parapsilosis* ülkemizde birçok merkezde, *C. albicans*'ı takiben en sık izole edilen ikinci tür olarak bildirilmektedir (17). Azole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının hastanelerde salgınlar oluşturması, ülkemiz gibi *C. parapsilosis*'in sık görüldüğü ülkeler için risk oluşturmaktadır.

Son yıllarda *Aspergillus fumigatus* kompleksindeki izolatlarda görülen kazanılmış azol direnci, küflerin antifungal ilaçlara karşı direnciyle ilgili olarak giderek önem kazanan bir konudur. Direnç, azol grubu fungusidlerin tarım alanlarında yoğun olarak kullanıma bağlı olarak çevresel kaynaklı ya da klinikte uzun süre azol tedavisine bağlı olarak gelişmektedir. *A. fumigatus* izolatlarında direnç, bir azol grubu antifungale karşı görülebileceği gibi, pan-azol direnci olarak da izlenebilmektedir. *A. fumigatus* izolatlarında azol direnci, ülkeden ülkeye ve merkezden merkeze değişkenlik göstermektedir (18). ESCMID-EFISG, *Aspergillus* infeksiyonları tanı ve tedavi rehberinde, daha önceden azol direncinin saptandığı ülkelerde klinikle ilişkili *Aspergillus* izolatlarına rutin antifungal duyarlılık testlerinin yapılması, yüksek kanıt düzeyiyle önerilmektedir. Aynı rehberde *Aspergillus* izolatlarında azol direncinin saptanmasında ön tanı testi olarak azol tarama plaklarının kullanımı da önerilmektedir (19).

Sonuç olarak, mantar hastalıklarının geleneksel kültür yöntemleriyle tanımlanması zaman alıcı olması ve sonuçların yorumlanması için deneyimli personel gerektirmesi gibi dezavantajlarına rağmen tür düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerine olanak vermesi açısından vazgeçilmezdir. Tüm dünyada ve ülkemizde mantar hastalıklarının epidemiyolojisi ve antifungal ilaçlara direnç oranları bölgesel olarak değişmektedir. Bu nedenle özellikle profilaktik ve etkene yönelik tedaviye yön verebilmek için merkezlerin kendi direnç epidemiyolojilerini ortaya çıkarmak amacıyla aralıklı olarak antifungal duyarlılık profillerini analiz etmeleri son derece önemlidir.

Çıkar Çatışması

Yazar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(4). pii: E57. [CrossRef]
- Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018; 9(1): 5135. [CrossRef]
- Patterson TF, Donnelly JP. New concepts in diagnostics for invasive mycoses: non-culture-based methodologies. *J Fungi (Basel)*. 2019; 5(1). pii: E9. [CrossRef]
- Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(12): e383-92. [CrossRef]
- Patel GP, Simon D, Scheetz M, Crank CW, Lodise T, Patel N. The effect of time to antifungal therapy on mortality in candidemia associated septic shock. *Am J Ther*. 2009; 16(6): 508-11. [CrossRef]
- Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(Suppl. 7): 19-37. [CrossRef]
- McCarthy MW, Katragkou A, Iosifidis E, Roilides E, Walsh TJ. Recent advances in the treatment of scedosporiosis and fusariosis. *J Fungi (Basel)*. 2018; 4(2). pii: E73. [CrossRef]
- Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol*. 2015; 78: 49-54. [CrossRef]
- Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016; 30(1): 179-206. [CrossRef]
- Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*. 1996; 100(2): 171-8. [CrossRef]
- Cornely OA, Arıkan-Akdaglı S, Dannaoui E, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(Suppl. 3): 5-26. [CrossRef]
- Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(Suppl. 3): 27-46. [CrossRef]
- Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia*. 2014; 178(5-6): 435-9. [CrossRef]
- Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 85(2): 200-4. [CrossRef]
- Cortegiani A, Misseri G, Fasciana T, Giammanco A, Giarratano A, Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J Intensive Care*. 2018; 6: 69. [CrossRef]
- Singh A, Singh PK, de Groot T, et al. Emergence of clonal fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74(5): 1260-8. [CrossRef]
- Arıkan-Akdaglı S, Gulmez D, Dogan O, et al. First multicenter report of in vitro resistance rates in candidemia isolates in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 18: 230-4. [CrossRef]
- Resendiz Sharpe A, Lagrou K, Meis JF, Chowdhary A, Lockhart SR, Verweij PE; ISHAM/ECMM *Aspergillus* Resistance Surveillance working group. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 2018; 56(Suppl. 1): 83-92. [CrossRef]
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arıkan-Akdaglı S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24(Suppl. 1): e1-38. [CrossRef]