



Ispitivanje osetljivosti gljiva na antimikotike – značaj standardnih metoda dijagnoze gljivičnih infekcija

Sanja Mitrović

Insitut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet, Beograd

Zašto su gljivične infekcije u centru pažnje poslednjih decenija?

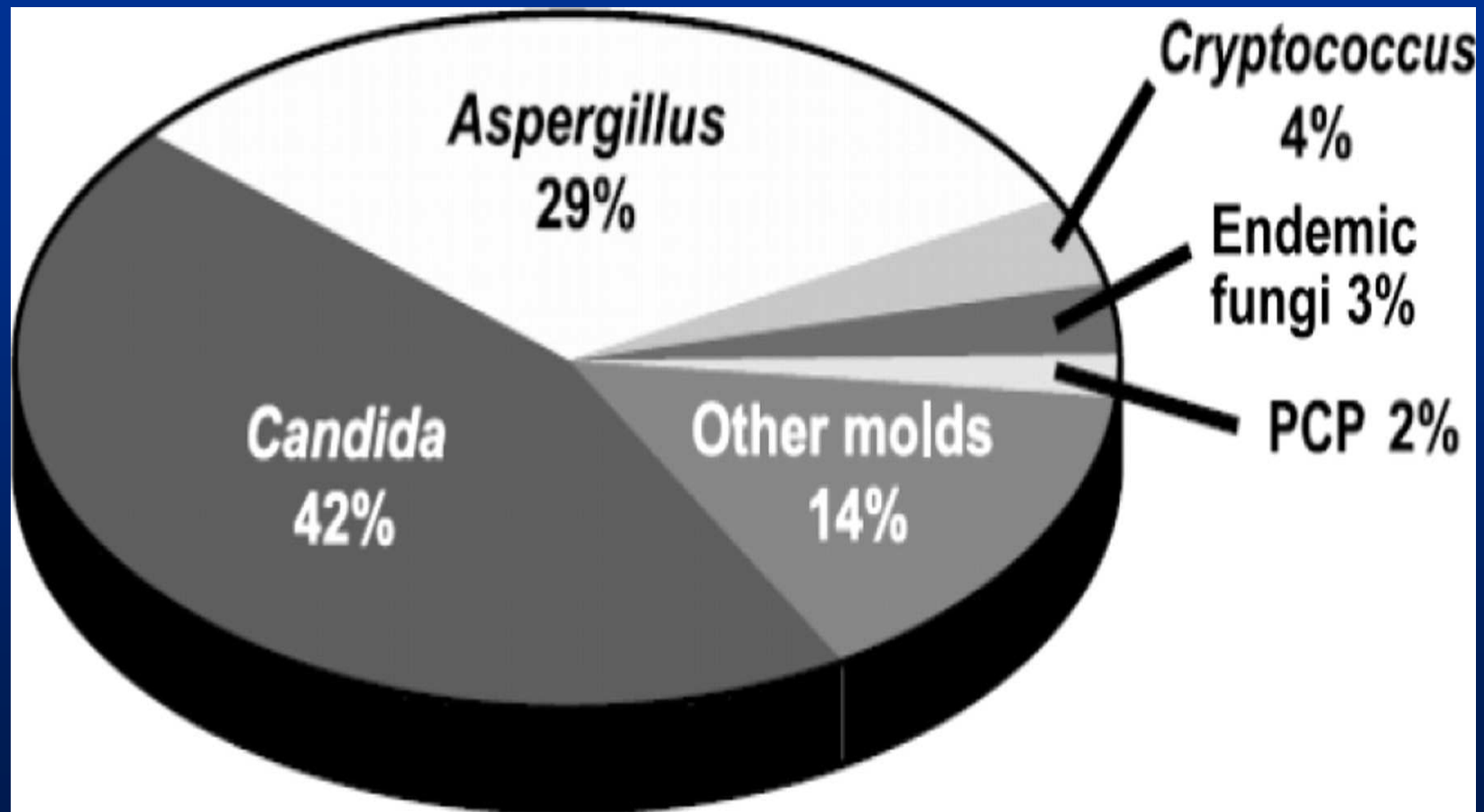
- Značajni stalni porast učestalosti gljivičnih infekcija, a posebno invazivnih fungalnih infekcija (IFI)
- Visoka smrtnost of IFI i pored primene antimikotika
- Porast broja visoko rizične (imunodeficientne) populacije za razvoj IFI
- Sve veći značaj non-*C. albicans* vrsta
- Porast učestalosti infekcija izazvanih “retkim” vrstama gljiva
- Porast učestalosti rezistentnih sojeva
- Bolje terapijske mogućnosti (mnogo veći izbor antimikotika)

Incidenција *Candida* fungemija (na 10,000 hospitalizovanih pacijenata)



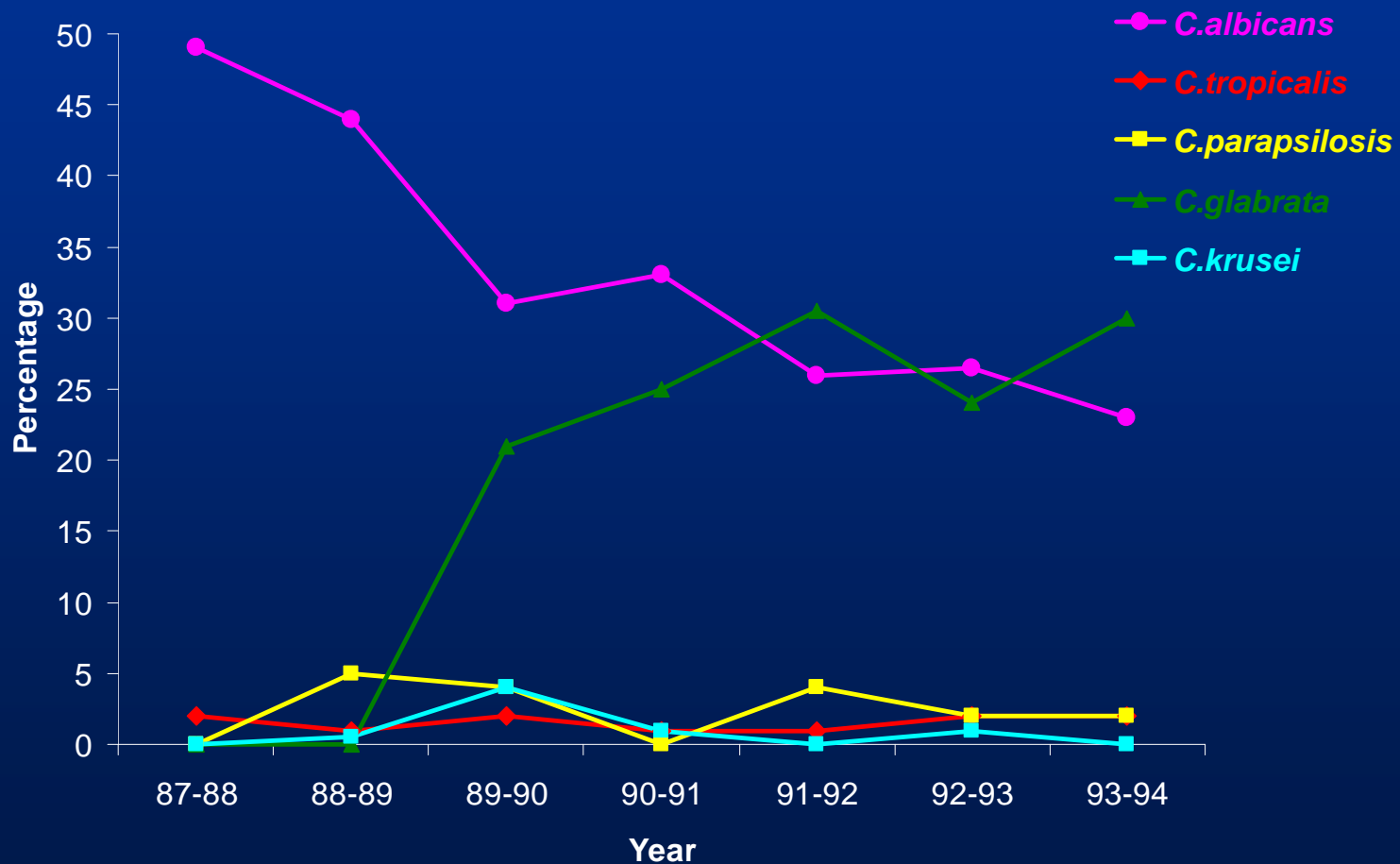
Almirante et al. 2005; Colombo et al. 2005; Chen et al. 2006; Hajjeh et al. 2004; Laupland et al. 2005; Tortorano et al. 2004;

Gljive izazivači invazivnih gljivičnih infekcija kod osoba sa transplantiranim solidnim organima i matičnim ćelijama hematopoeze

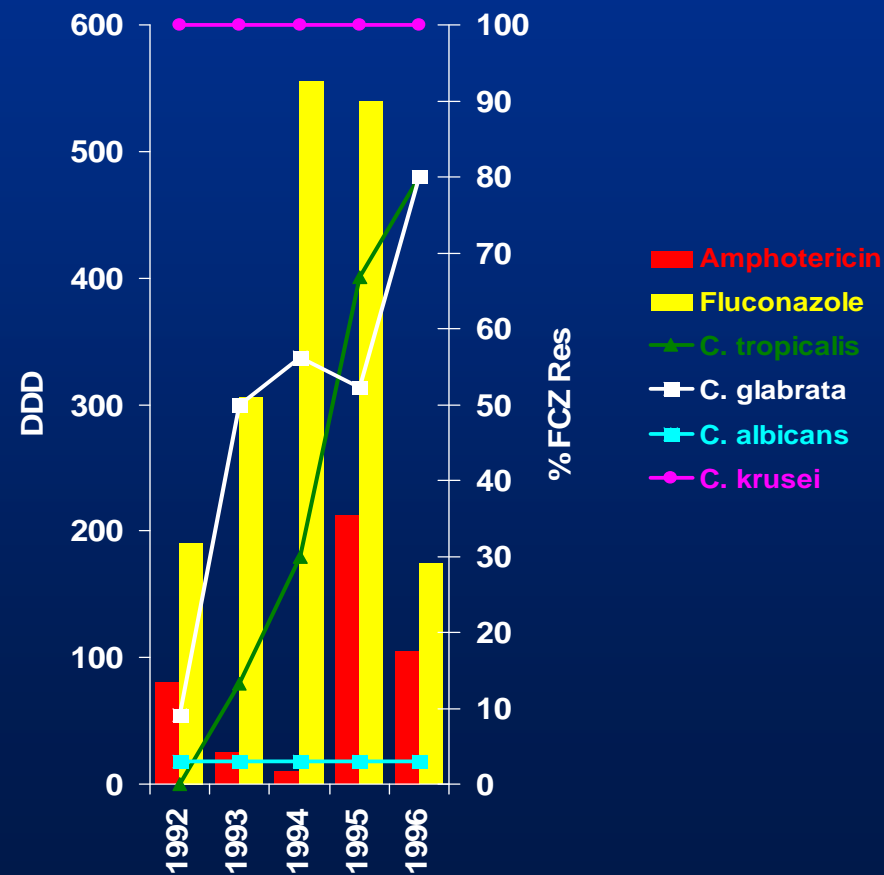


Pfaller M A et al. Clin Infect Dis. 2006;43:S3-S14

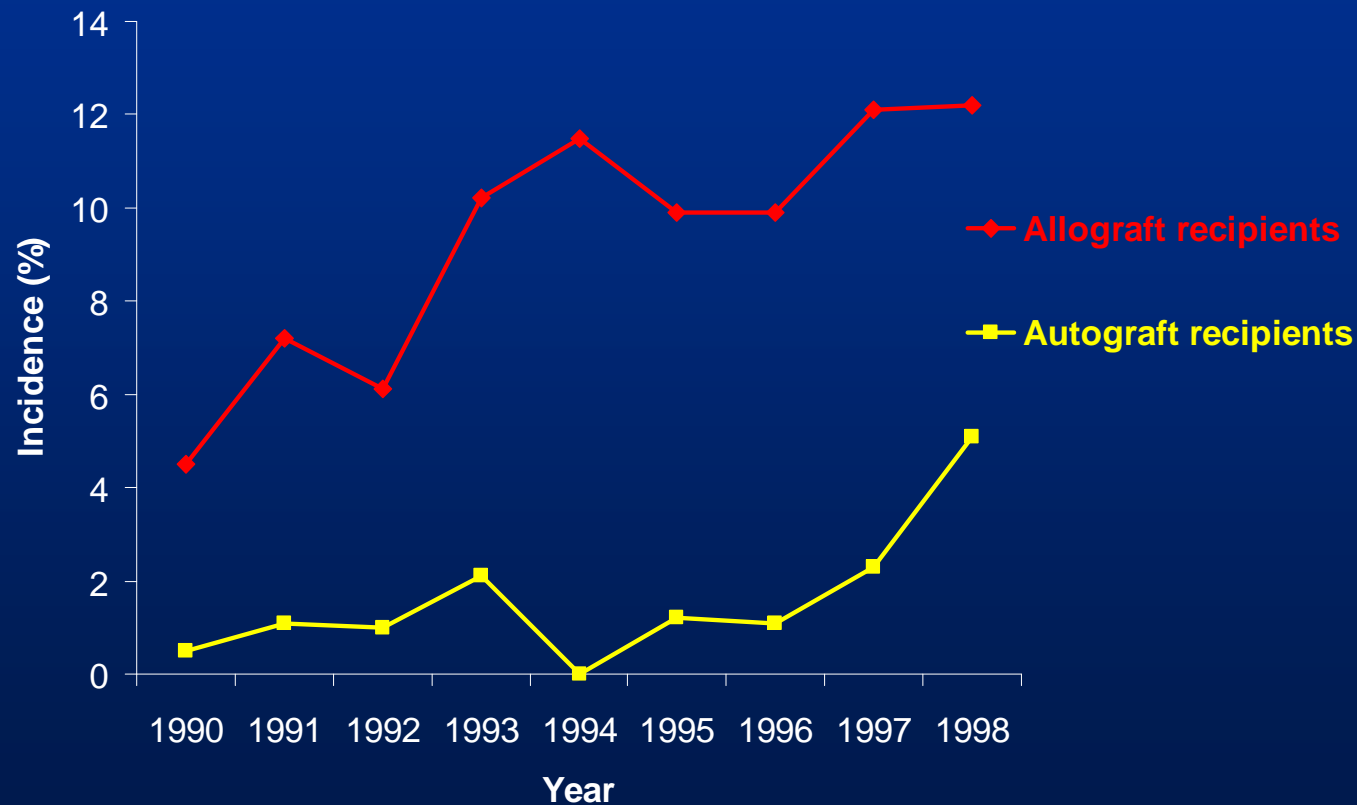
Intrahospitalne infekcije izazvane različitim vrstama *Candida*



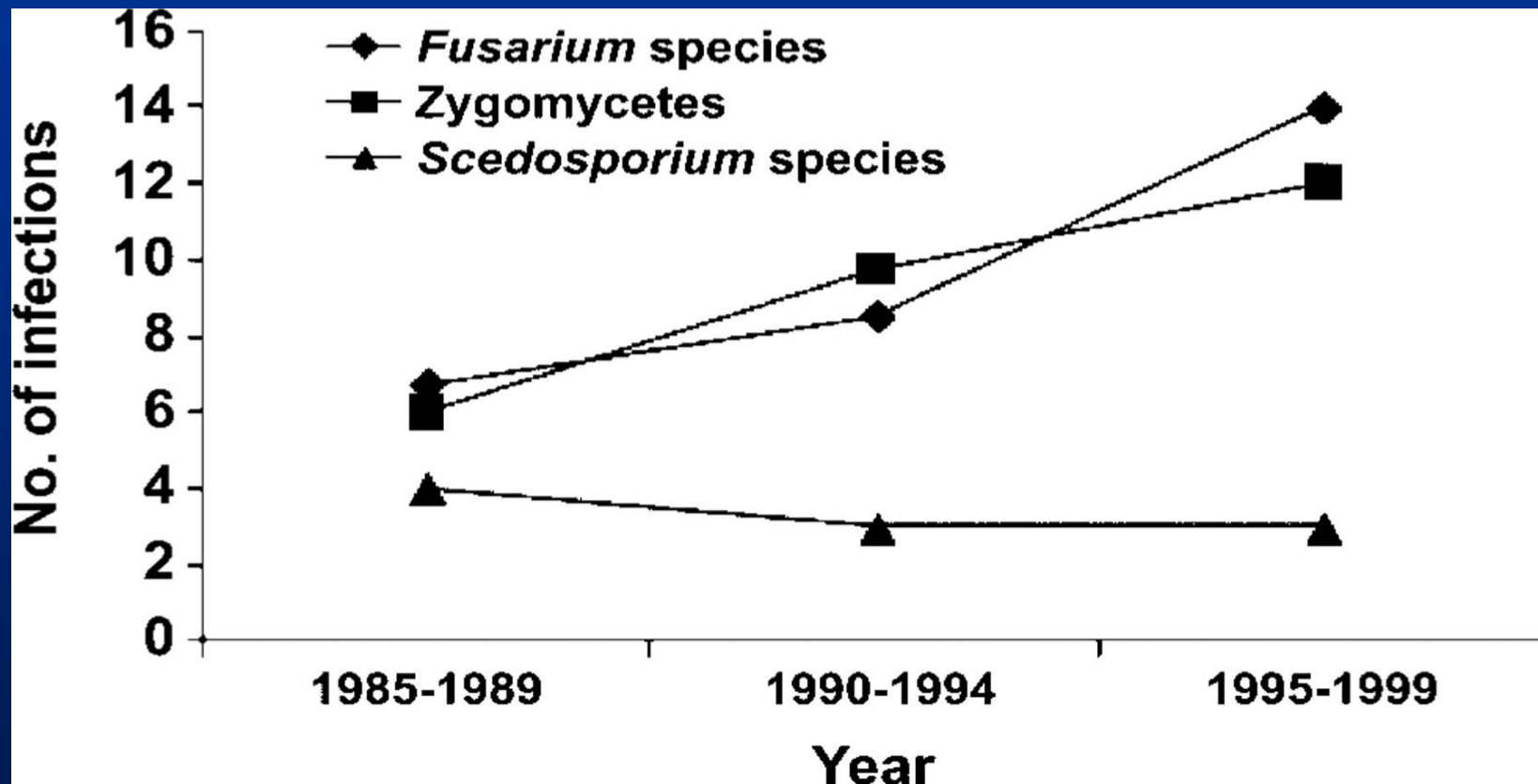
Porast rezistancije na flukonazol sojeva *Candida* sp. izolovanih u jedinicama intenzivne nege



Porast incidencije invazivne aspergiloze kod primalaca matičnih ćelija hematopoeze



Promena učestalosti non-Aspergillus plesni kod primalaca matičnih ćelija hematopoeze



Pfaller M A et al. Clin Infect Dis. 2006;43:S3-S14

OSNOVNI PRINCIPI LABORATORIJSKE DIJAGNOZE GLJIVIČNIH INFEKCIJA (GI)

STANDARDNE MIKOLOŠKE METODE DIJAGNOZE GI (KONVENCIONALNE METODE)

1. MIKROSKOPSKI PREGLED BOLESNICKOG MATERIJALA

- *direktni mikroskopski preparat (DMP)*
- *patohistologija (PH)*

2. IZOLACIJA GLJIVA IZ BOLESNICKOG MATERIJALA

- *mikološka kultura (MK)*
“zlatni standard”

DOKAZANA GI

IMUNOLOŠKE METODE

1. DOKAZIVANJE ANTITELA (At)
2. DOKAZIVANJE ANTIGENA (Ag)
3. DOKAZIVANJE DRUGIH BIOMARKERA

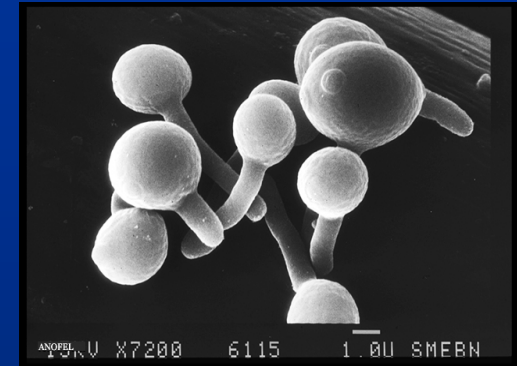
MOLEKULARNE METODE

1. DOKAZIVANJE DNK (PCR)

VEROVATNA GI

Invazivne mikoze–dijagnostički problemi

- Egzaktna laboratorijska dijagnoza podrazumeva karakterizaciju etiološkog agensa i odredjivanje in vitro osetljivosti izolovanih sojeva gljiva na antimikotike



- Izolacija gljiva iz kliničkih uzoraka i dalje “zlatni standard” u dijagnostici

❑ Osim što zahteva značajno vreme (2-3 dana i duže), kultivisanje često nije dovoljno osetljiv metod (pozitivan samo u svega oko 50% hemokultura kasnije potvrđenih sistemskih mikoza u obdukcionom materijalu)

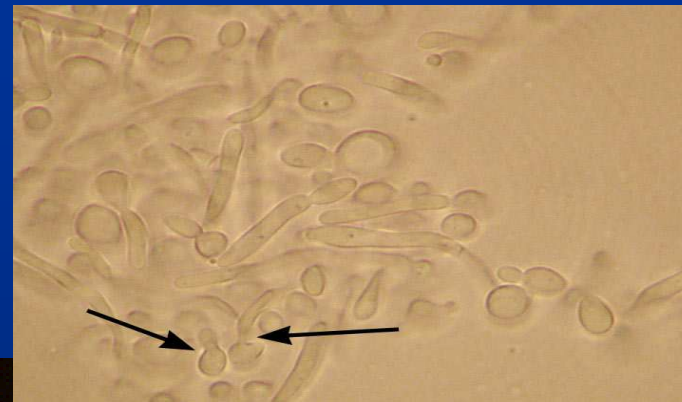
❑ Neophodno je unaprediti postojeće i razviti nove brze, osetljive i specifične metode za dijagnozu IFI

Značaj standardne mikoloških dijagnostičkih postupaka

- Izolacija gljiva iz kliničkih uzoraka i njihova identifikacija omogućava postavljanje **etiološke dijagnoze, odnosno dokazanu dijagnozu IFI** i terapijsku primenu antimikotika
- Poznavanje uzročnika omogućava primenu terapije na osnovu dosadašnjih iskustava (**obrasci očekivane osetljivosti**)
- **Izvodjenje antimikograma i izbor optimalne terapije (predvidljivost 90/60 Pfaller, Rex 2002)**
- In vitro ispitivanje efekata mogućih **kombinacija antimikotika**
- **Prepoznavanje da se radi o udruženim infekcijama (2 i više uzročnika) i izbor terapije na osnovu kompletnih rezultata antimikograma**
- **Praćenje toka infekcije praćenjem promena osetljivosti agensa in vitro i razvoja rezistencije**
- Razumevanje **mehanizama rezistencije** (eksperimentalne i studije sa kliničkim sojevima in vitro)

Kako identifikujemo kvasnice ?

- Mikroskopske karakteristike
- Kulturalne (makroskopske) karakteristike



Chromagar



Kako identifikujemo kvasnice ?

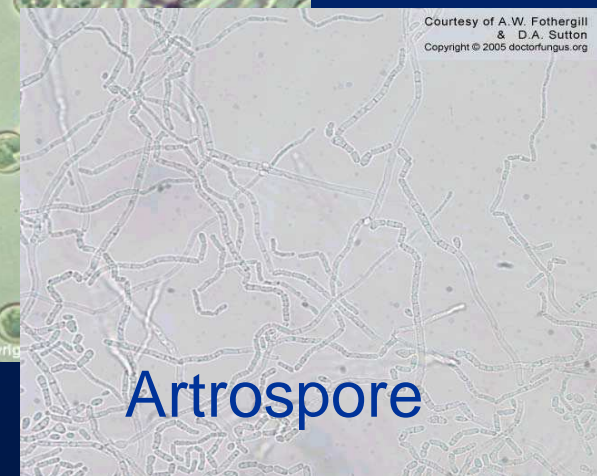
- Formiranje germinativnih tuba



- Mikroskopska morfolologija

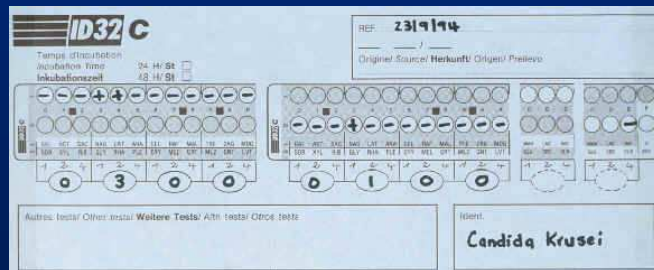


- Drugi testovi

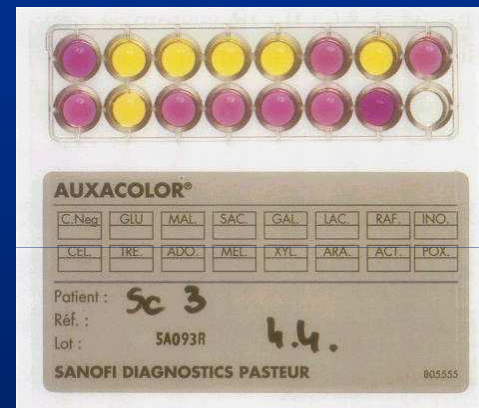


Kako identifikujemo kvasnice ?

- Biohemijska karakterizacija
- Komercijalni kitovi

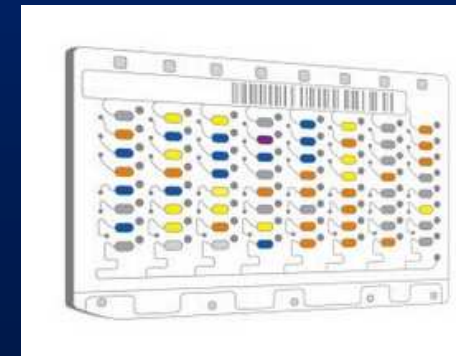


API ID 32C



Auxacolor

Vitek-2



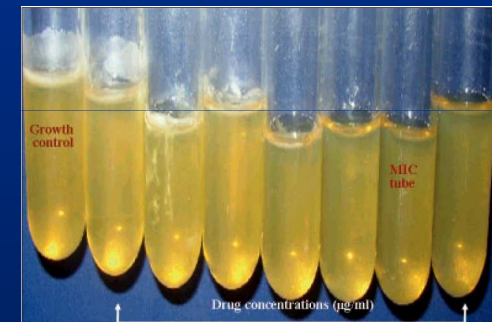
- Molekularne metode

Standardizacija antimikograma

- Standardizovani dilucioni metodi za kvasnice
- Američki nacioanlni komitet za kliničke i laboratorijske standarde (NCCLS) za ispitivanje osetljivosti roda Candida (Approved Standard M27, 1997; M27-A2, 2002)
- Podkomitet za ispitivanje osetljivosti na antimikotike Evropskog komiteta za ispitivanje osetljivosti na antimikrobna sredstva AFST-EUCAST (Clin Microbiol Infect 2003; 9:3359-61)

Kako ispitujemo osetljivost kvasnica na antimikotike?

- CLSI (NCCLS) M27-A3 metod
 - USA standard



- EUCAST document E-Def 7.1 metod
 - Evropski standard

**Zahteva ozbiljan rad na
ispitivanju kliničke korelacije**



Ispitivanje osetljivosti kvasnica na antimikotike

KARAKTERISTIKE

Metoda

Veličina inokuluma

Hranljiva podloga

Pufer

Temperatura inkubacije

Duzina inkubacije

Nacin ocitavanja

NCCLS M27 – A2

Makro i mikrodilucija

0.5×10^3 - 2.5×10^3 CFU/ml

RPMI 1640 (+ glutamin)

pH 7.0, 0.165 M MOPS

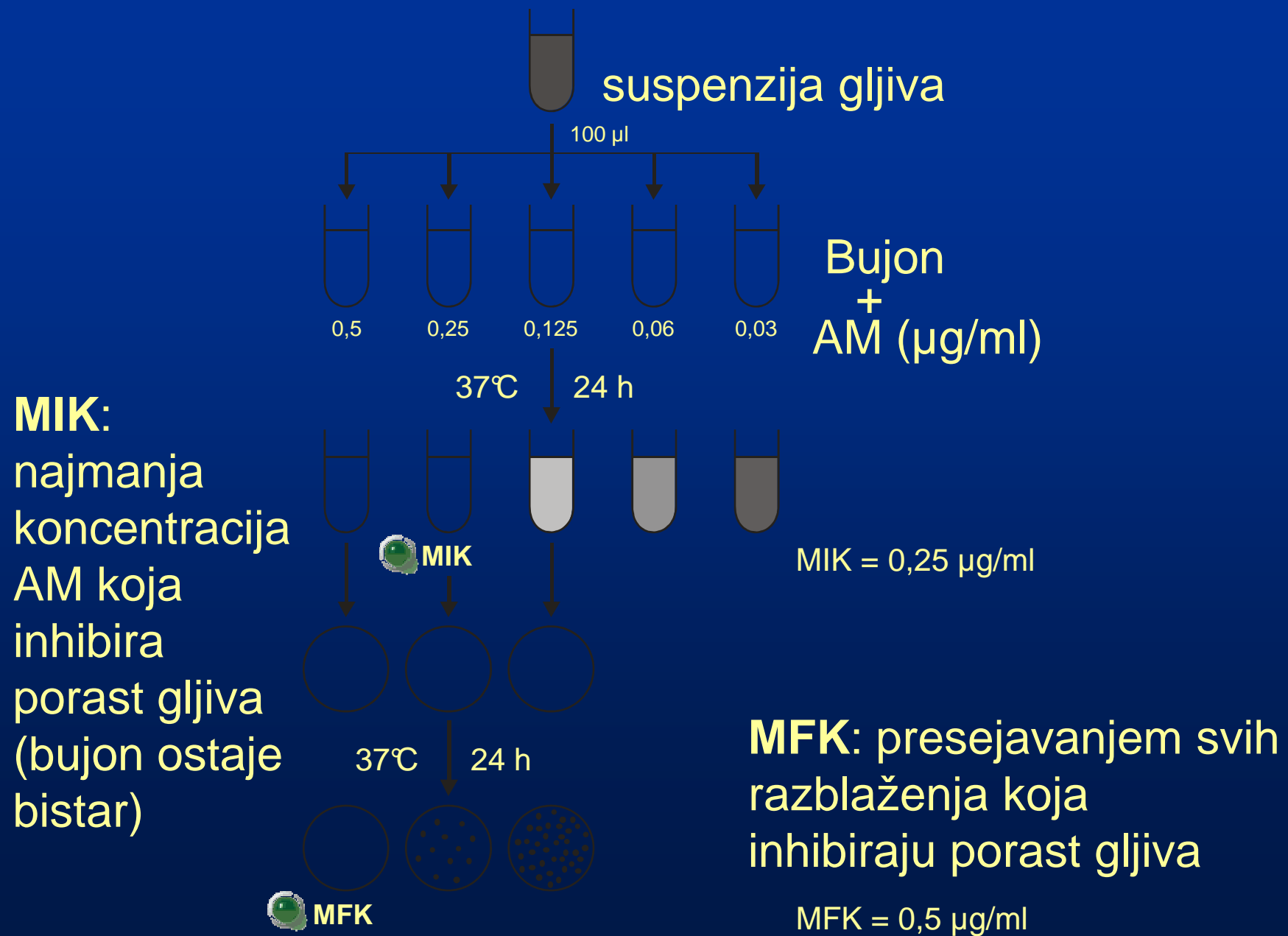
35°C

48h(Candida)72h

(Crypt)

bistro/ 80% redukcija

Bujon dilucioni metod antimikograma



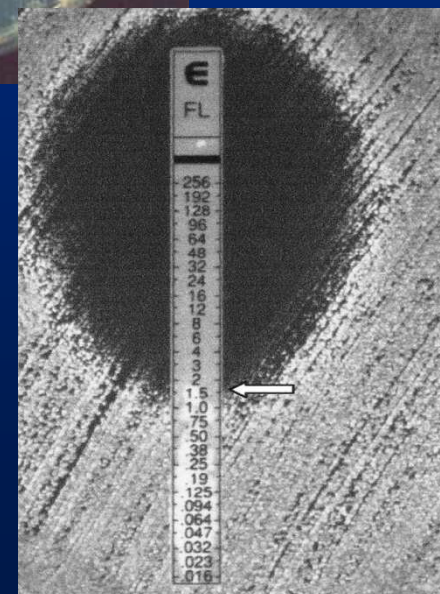
Kriterijumi za procenu ostljivosti in vitro

M27-A2

Antimikotik MIK µg/ml	S (osetljiv)	I / DDS	R (rezistent.)
Amfoter B	< 0.8		> 0.8
Flucitozin	≤ 4	8-16	> 16
Flukonazol	≤ 8	16-32	> 32
Itrakonazol	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1

Koje metode antimikograma treba koristiti u rutinskom radu za kvasnice ?

- Disk difuzija
 - ne dobija se vrednost MIC, već S,I,R
 - screening metod
- E-test
 - MIC vrednost
 - problematična granična vrednost



Ispitivanje osetljivosti *Candida* spp. disk difuzionom metodom

KARAKTERISTIKE

Metoda

Veličina inokuluma

Hranljiva podloga

Pufer

Temperatura inkubacije

Duzina inkubacije

Nacin očitavanja

NCCLS M44 – P

Disk difuzioni

0.5 MacFarland (denzitometar)

Mueller-Hinton+0.2%glukoze

7.2-7.4

35°C

24-48h(*Candida*)

prečnik zone inhibicije rasta,
interpretacija vršena u korelaciji sa

MIK vrednostima

Za sojeve rezistentne disk difuzionim metodom, ispitivanje dopuniti M27- A2

Odredjivanje MIC vrdnosti putem E-testa



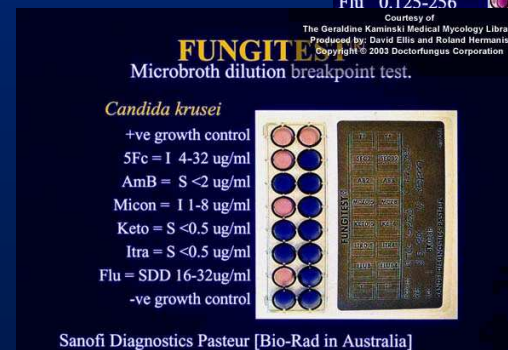
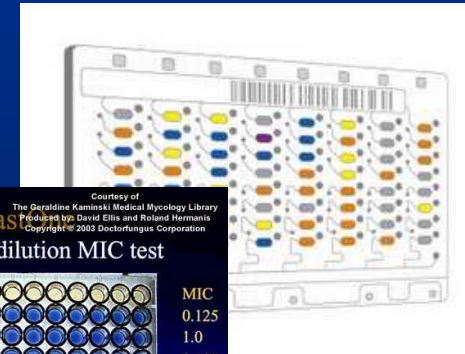
Rast gljiva

MIC= zona inhibicije

Testovi za ispitivanje osetljivosti kvasnica *in vitro*

- Komercijalni testovi

- Vitek-2
- YeastOne
- Fungifast
- Fungitest
- drugi



- Molekularne metode

CASPO

MADE IN U.S.A.

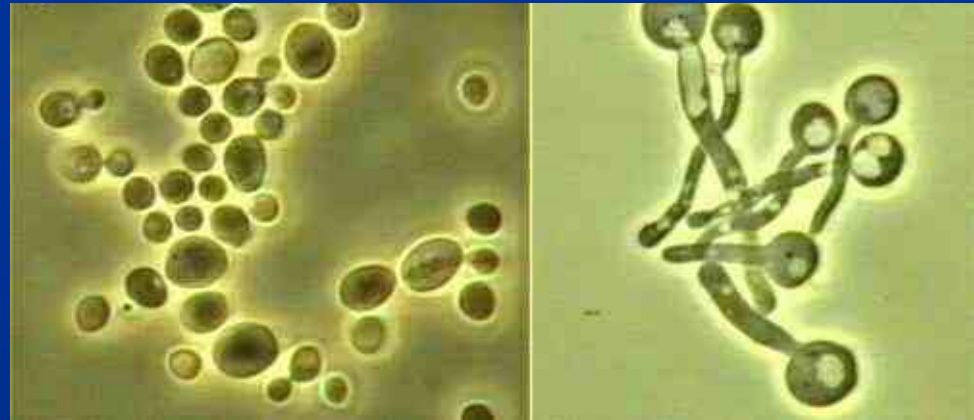
12

Antimikogram: Problemi (propusti)

- Poznavanje vrednosti MIC pomaže, ali je težko standardizovati metodologiju i interpretaciju MIC
- Korelacija in vitro i in vivo je moguća, ali treba da se bazira na individualnim izolatima. Korelacija u širem obimu treba da se bazira na velikom broju izolata, a za sada to nedostaje.
- U razumevanju dobijenih rezultata pomaže dosta kada se upoređuje ishod infekcije sa vrednostima MIC.
- Za sada nema pravila za korelaciju , tj. odsustvo korelacije in vivo i in vitro

Rex, 2005

Candida albicans

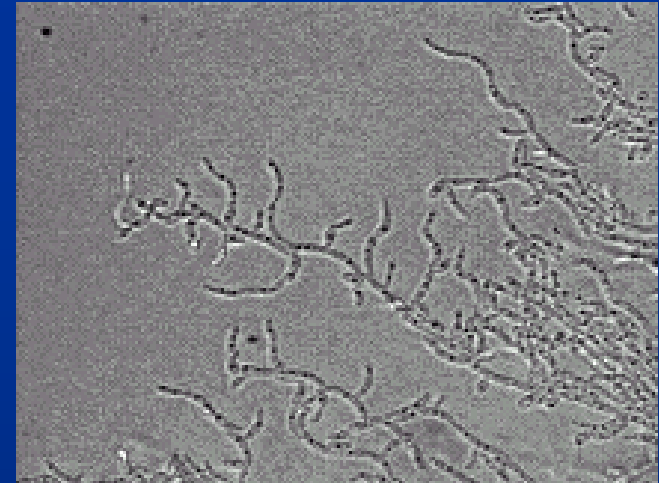


- Osetljivost na azole može da zavisi od HIV statusa (profilaktičke primene antimikotika)

	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>C.albicans</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>C.albicans</i> - FLU-resistant	-	+	++	+	++	++	++

5% sojeva *C. albicans* ima smanjenu osetljivost na antimikotike

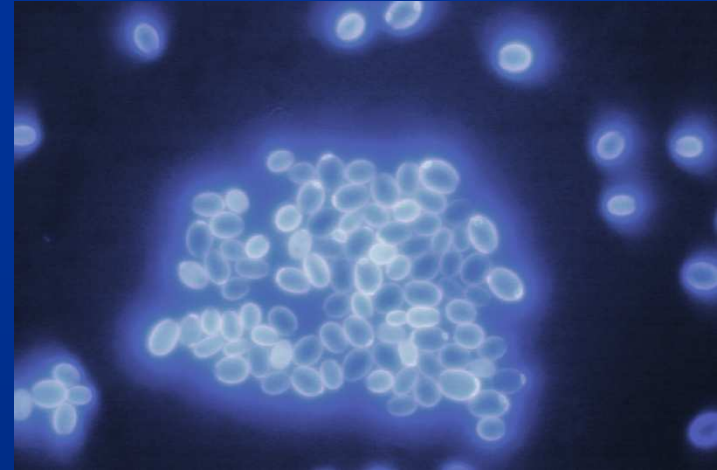
Candida parapsilosis



	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>C.parapsilosis</i>	++	++	++	++	++	+	-

Smanjena osetljivost (manje od 1%) se vezuje za profilaktičku primenu antimikotika

Candida glabrata

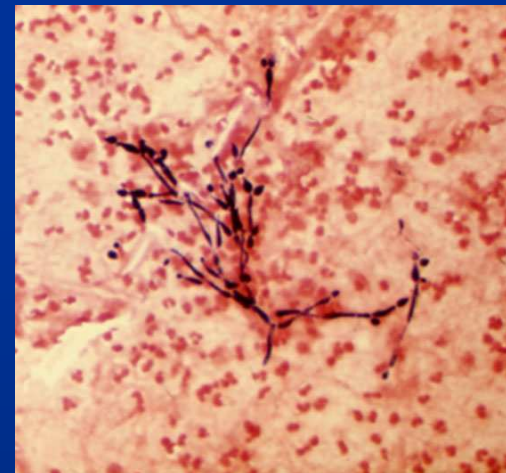


- Očno smanjena osetljivost na flukonazol
- Zapaža se i slab odgovor na amfotericin B

	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>C.glabrata</i>	+/-	+	+	+	+	++	++

**Rezistancija na
*flukonazol kereće se i do 53%***

Candida tropicalis

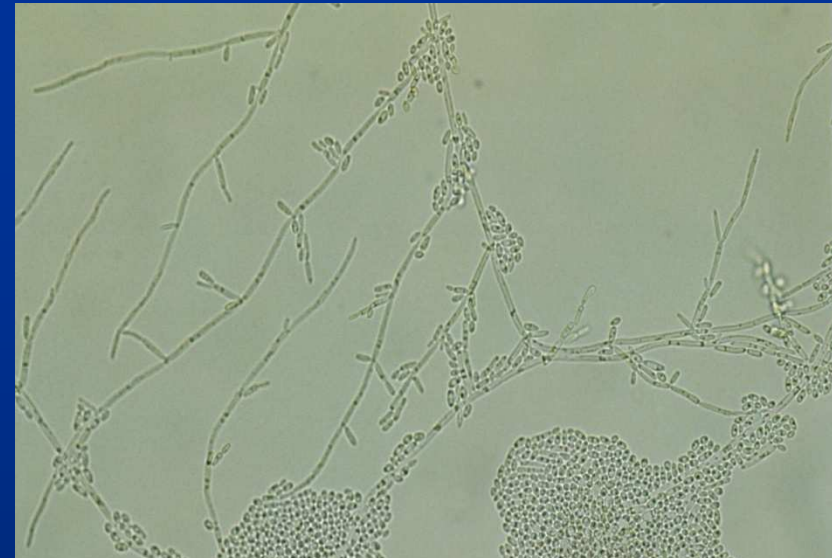


- Primoizolati su obično osetljivi na flukonazol , ali mogu brzo da razviju rezistanciju

	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>C.tropicalis</i>	+	++	++	++	++	+	++

**Rezistancija na
5-fluorocitozin kreće se i do 20%,
a na
flukonazol i do 46% sojeva**

Candida krusei



- Uvek je rezistentna na flukonazol i smanjene osetljivosti (intermedijerna) na amfotericin B

	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>C.krusei</i>	-	+	+	+	+	+	++

Antifungalna osetljivost *Candida* sp.

Antifungal agent	Percentage of strains susceptible to each agent ^a				
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsiopsis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Amphotericin B	100	75 ^b	97	99	8 ^b
Flucytosine	97	99	99	93	6 ^c
Fluconazole	99	54 ^d	96	99	0 ^e
Itraconazole	99	77 ^d	99	99	94
Posaconazole	99	86	100	100	99
Voriconazole	100	92	100	99	100
Caspofungin	100	100	97	99	99
Micafungin	99	100	100	100	100

NOTE. All organisms are susceptible unless otherwise noted. Data are from [26, 29, 44, 95–99].

^a Susceptibility is defined as an MIC of $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ for fluconazole, $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ for flucytosine, or $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ for all other agents.

^b Intermediately susceptible.

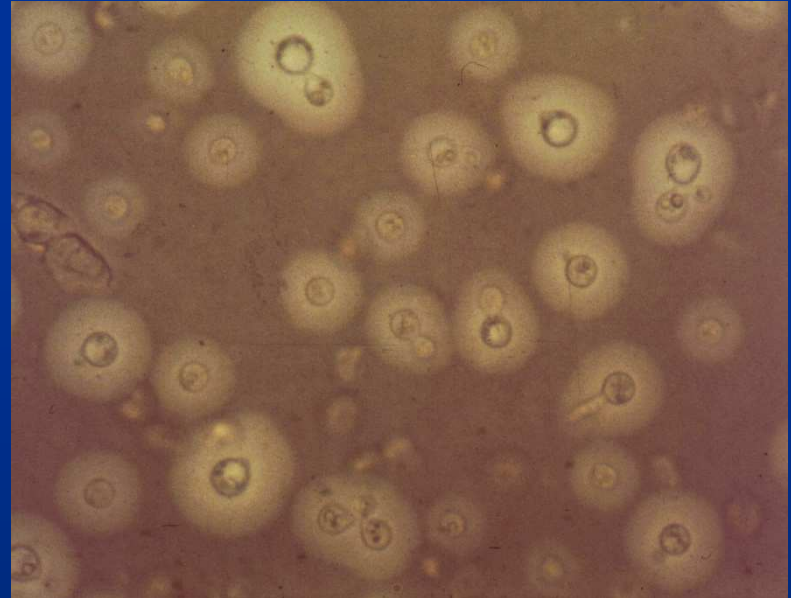
^c Intermediately resistant.

^d Susceptible in a dose-dependent fashion.

^e Resistant.

Pfaller M A et al. Clin Infect Dis. 2006;43:S3-S14

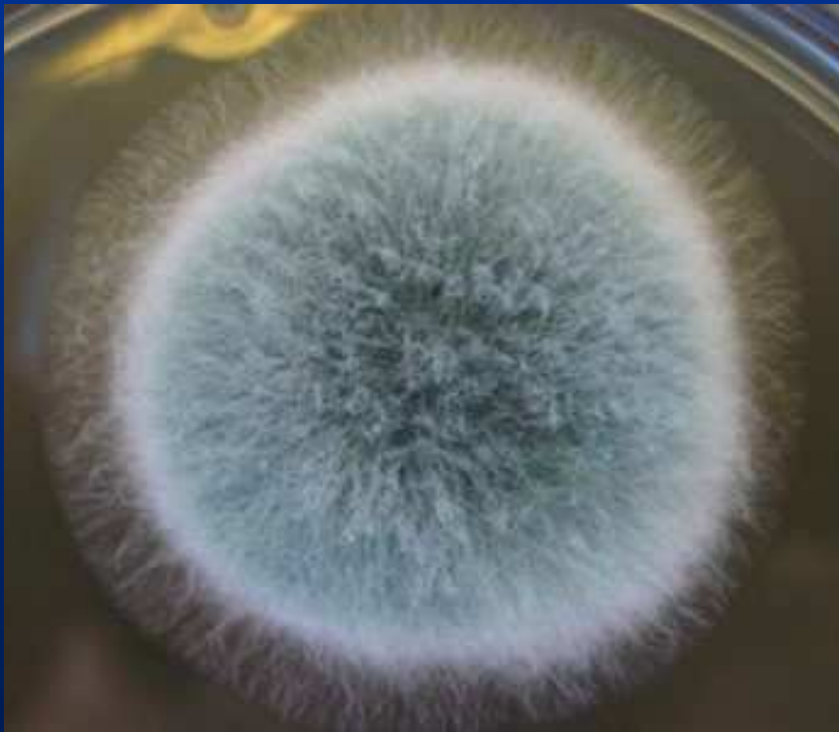
Cryptococcus neoformans



- Obično se koristi kombinacija amfotericina B i 5-fluorocitozina u terapiji

	FLU	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP
<i>Crypto. neoformans</i>	+	+	++	++	++	+/-	-

Kako identifikujemo plesni?



Aspergillus fumigatus
Najčešći uzročik aspergiloze
~90% slučajeva

Kako identifikujemo plesni?

- Morfologija (kultura)
- Mikroskopski
- Dodatni testovi
- Molekularne metode

Iskustvo!



Standardizacija antimikograma - plesni

- Standardizovani metod za ispitivanje plesni - bujon dilucioni (M- 38P)
- Standardizovani **difuzioni metodi**
 - **E-test** (J Clin Microbiol 2000; 28:3359-61)
 - **disk difuzioni metod** (Approved guideline M-44 A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004)

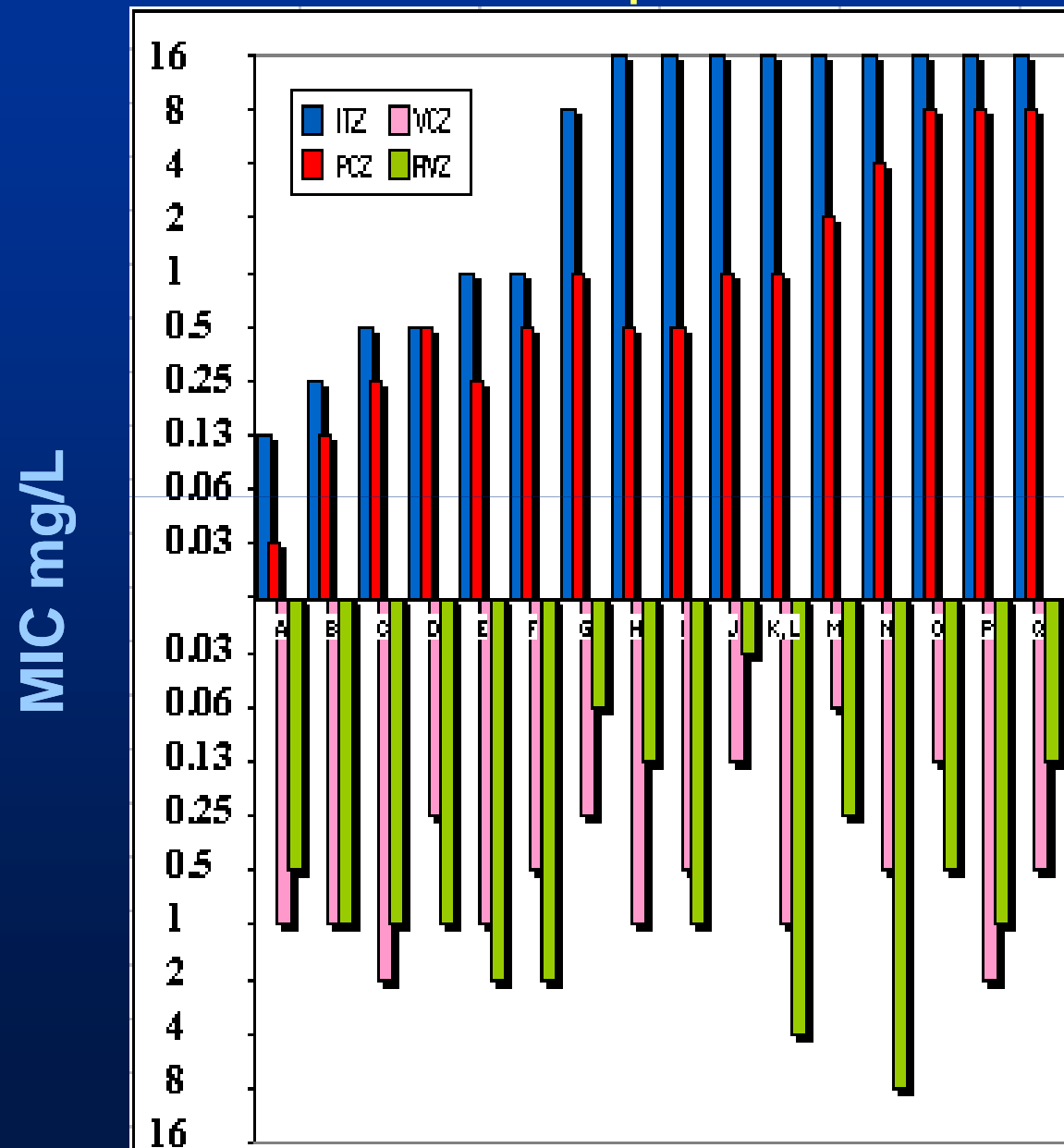
Ispitivanje osetljivosti plesni na antimikotike

Karakteristike	CLSI M38-A	EUCAST
Primenjuje se za	Plesni	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus</i> spp.
Inokulum	$0.4-5 \times 10^4$ CFU/ml	$1-2.5 \times 10^5$ CFU/ml
Inokulum standardizacija	Spectrofotometrijski	Hemocitometar
Test medium	RPMI 1640	RPMI 1640 G2%
Metod	Mikrodilucija	Mikrodilucija
Temperatura	35°C	35°C
Trajanje inkubacije	48h	48h
Očitavanje	Bez porasta	Bez porasta

In vitro osetljivost vrsta roda *Aspergillus* na antimikotike

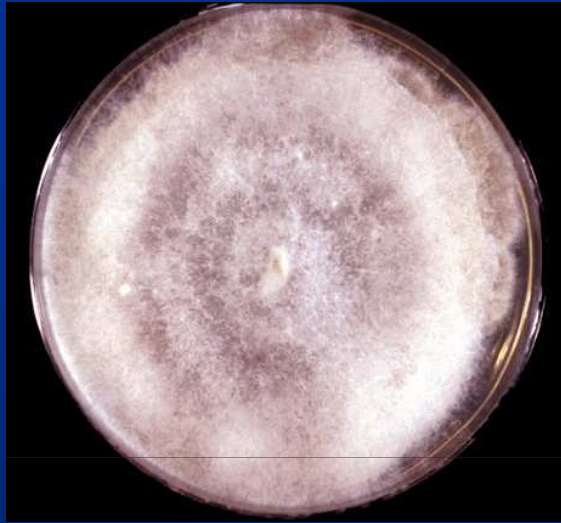
	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP	FLU
<i>Asp. fumigatus</i>	++	++	++	++	+/-	++	-
<i>Asp. niger</i>	++	++	++	++	-	++	-
<i>Asp. terreus</i>	++	++	++	-	-	++	-
<i>Asp. flavus</i>	++	++	++	++	-	++	-

Unakrsna rezistencija sojeva *A. fumigatus* kompleksa na azole

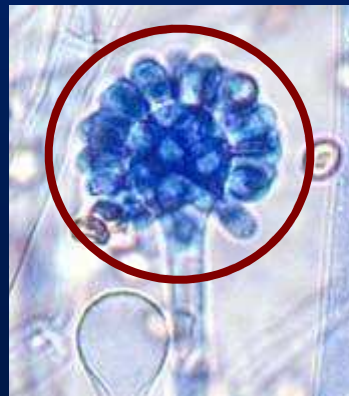


Mosquera & Denning.
Antimicrob Agents Chemother
2002; 46:556

Mucoraceae



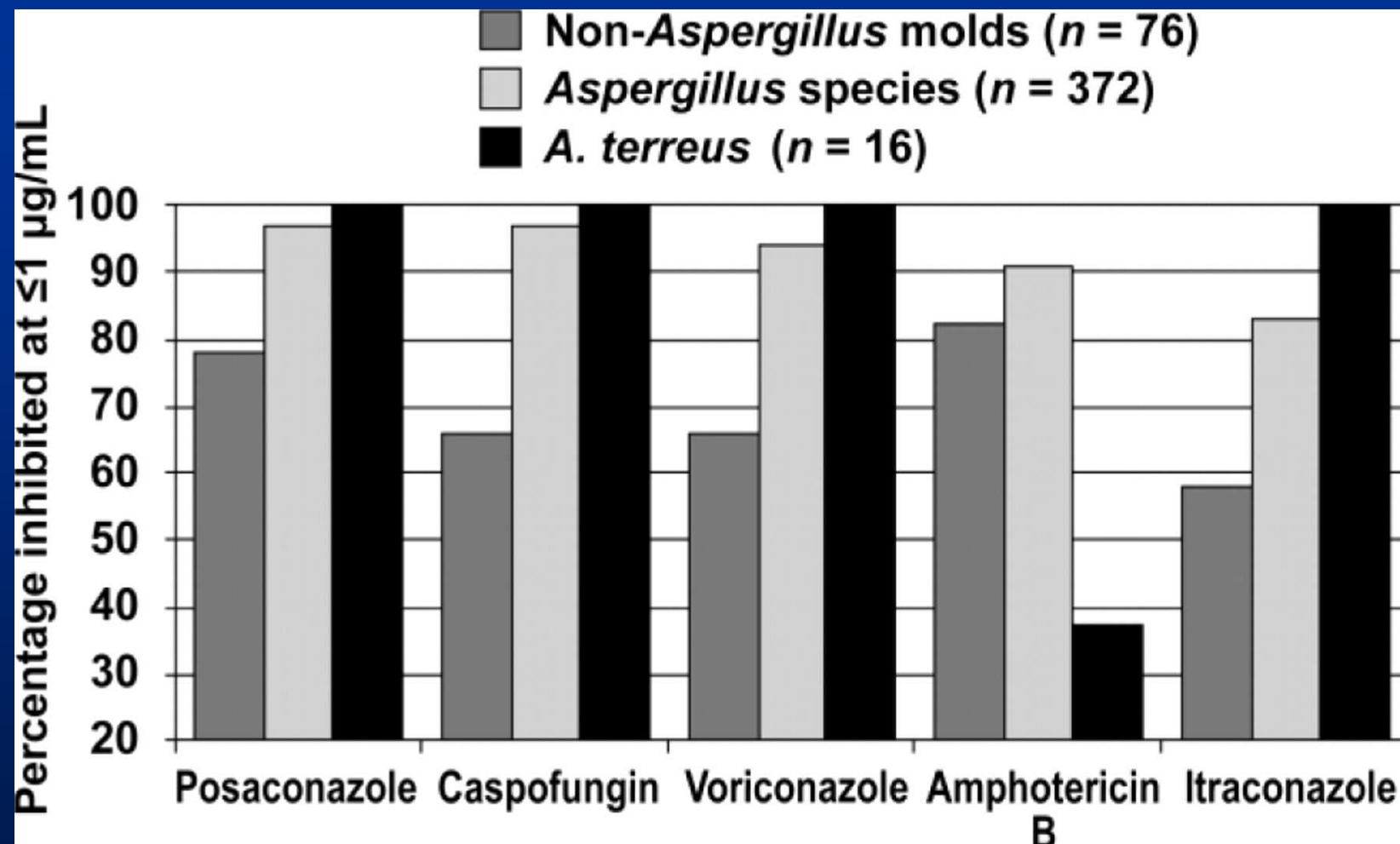
Mucor
Rhizopus
Absidia
Rhizomucor
idr...



In vitro osetljivost plesni na antimikotike

	ITR	VOR	POS	AMB	5FC	CASP	FLU
<i>Asp. fumigatus</i>	++	++	++	++	+/-	++	-
<i>Asp. niger</i>	++	++	++	++	-	++	-
<i>Asp. terreus</i>	++	++	++	-	-	++	-
<i>Asp. flavus</i>	++	++	++	++	-	++	-
<i>Fusarium</i>	-	+	+/-	+/-	-	-	-
<i>Scedosporium</i>	+/-	+	+/-	-	-	+/-	-
Mucoraceae	-	-	+	+	-	-	-

In vitro osetljivost kliničkih izolata plesni



Pfaller M A et al. Clin Infect Dis. 2006;43:S3-S14

Osetljivost na antimikotike i rezistencija gljiva

Species	MIC range, mg/mL (no. of isolates)				CAS, minimal effective concentration range in mg/mL (no. of isolates)
	ICZ	VCZ	PCZ	AMB	
<i>Aspergillus lentulus</i>	0.5–1 (8)	1–2 (8)	NA	1–2 (8)	2–16 (8)
<i>Aspergillus ustus</i>	1 to >8 (10)	4–8 (10)	2 (1)	0.25–8 (10)	2–8 (8)
<i>Aspergillus terreus</i>	0.03–8 (63)	0.25–4 (63)	0.06–0.25 (8)	0.12–16 (63)	0.06–0.5 (13)
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0.03–2 (30)	≤0.03 to 0.5 (30)	0.125–1 (13)	0.5 to >16 (30)	0.25–4 (11)
<i>Scedosporium prolificans</i>	2 to >32 (55)	0.5–8 (55)	2 to >8 (55)	1 to >16 (55)	4–8 (2)
<i>Fusarium solani</i>	≥8 (15)	1–4 (10)	>8 (6)	0.25–8 (15)	≥8 (29)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1 to >8 (3)	0.2–1 (3)	0.12–0.5 (3)	>8 (3)	3 to >100 (5)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	>8 (25)	>8 (25)	>8 (25)	8 to >16 (25)	4 to >16 (25)
Zygomycetes	0.03–32 (51)	2–64 (51)	0.06–2 (36)	0.03–2 (51)	>16 (15)
<i>Trichosporon asahii</i>	0.03–8 (15)	0.015–8 (15)	0.12–1 (5)	0.5–16 (15)	>16 (9)
<i>Geotrichum capitatum</i>	0.03–0.5 (23)	0.03–0.5 (23)	NA	0.06–0.25 (23)	0.5 (1)
<i>Cladophialophora bantiana</i>	≤0.03 to 0.25 (10)	≤0.03 to 1 (10)	<0.03 to 0.06 (5)	0.25–0.5 (10)	2–8 (5)

NOTE. Data are compiled from [4–24]. AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; ICZ, itraconazole; NA, not available; PCZ, posaconazole; VCZ, voriconazole.

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America

Kanafani Z A , Perfect J R Clin Infect Dis. 2008;46:120-128

Basics of Antifungals

Range of Activity of Echinocandins

Highly Active	Very Active	Some Activity	Inactive
<i>Candida spp.</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Blastomyces</i>	<i>Zygomycetes</i>
	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Coccidioides</i>	<i>Cryptococcus</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Histoplasma</i>	<i>Fusarium</i>
			<i>Trichosporon</i>

In Vitro / In Vivo nastanak rezistencije gljiva na antimikotike

<i>Aspergillus terreus</i>	Amphotericin B	Urodjena
<i>Candida glabrata</i>	Azoli	Urodjena ili stečena
<i>Candida krusei</i>	Azoli	Urodjena
<i>Candida lusitaniae</i>	Amphotericin B	Urodjena ili stečena
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Fluconazole	Stečena

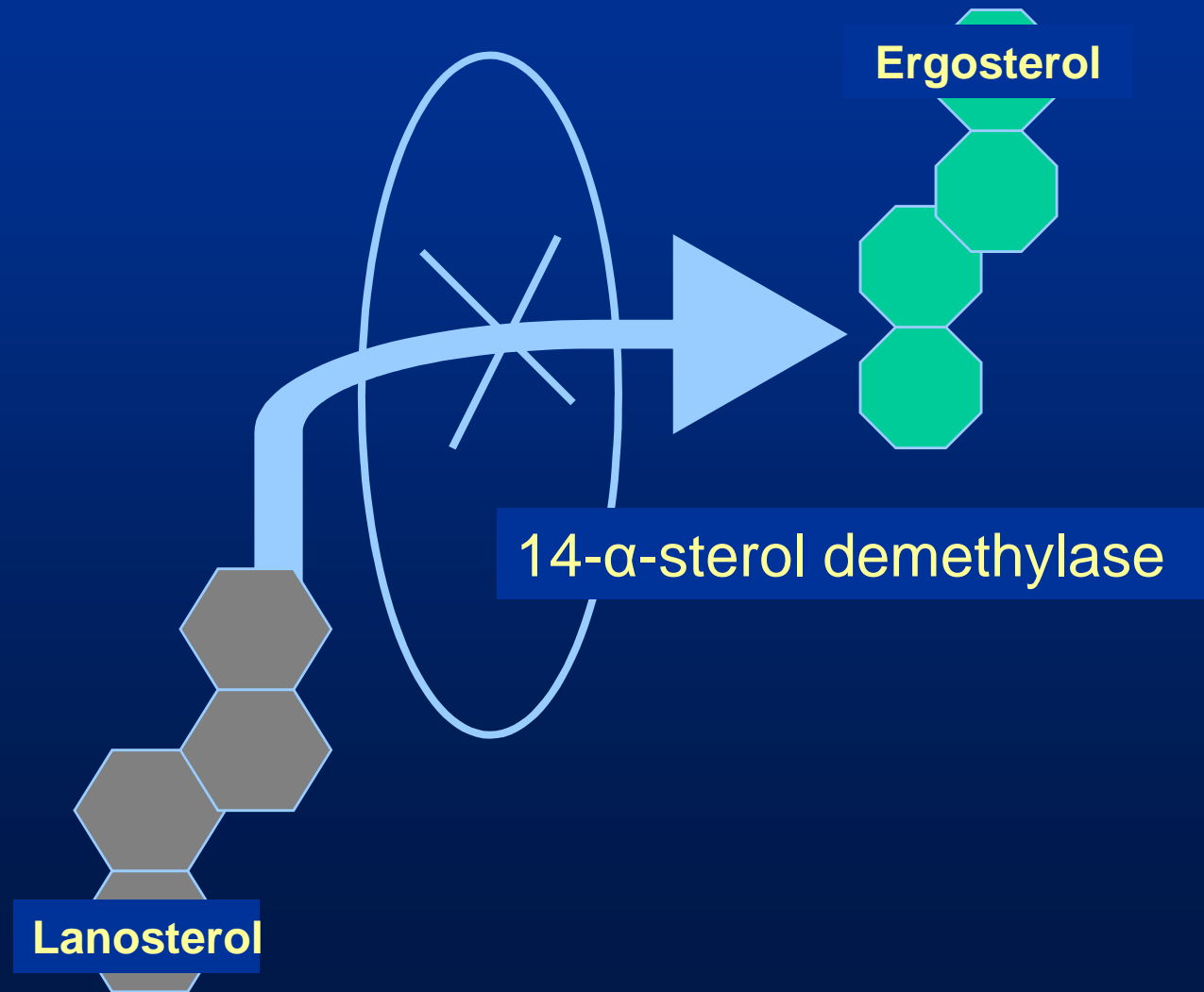
Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age?
Pfaller, Rex 2002



Multiple-triazole-resistant aspergillosis.

Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ
N Engl J Med. 2007 356 (14):1481-3.

Azoli: Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole



Definција rezistencije na azole

1. Azoli: rezistancija na jedan od njih (ITC and VOR $> 4\mu\text{g/ml}$, POS $> 2\mu\text{g/ml}$)
2. Multi rezistancija na azole: rezistentan na najmanje dva ili više lekova
3. Panazol rezistencija – ako je rezistentan na sve testirane azole

Unakrsna rezistencija

- Unakrsna rezistencija izmedju azola izgleda da postoji in vivo i in vitro i zavisi od specifičnih mutacija na Cyp51A
- Uglavnom se odnosi na ITC i POS
- Znatno redje se odnosi na ITC i VOR

Izolacija i karakterizacija flukonazol i amfotericin B-rezistentnih sojeva *Candida albicans* iz krvi dva pacijenta sa leukemijom

- Fungaemija
- Fluconazole profilaksa 400 mg/dan, 2 nedelje
- Empirijska amfotericin B 0.5 mg/kg/dan
- Fluconazole MICs >64 mg/l, bez podataka o prethodnoj izloženosti leku
- Isolati rezistentni na amfotericin B
- Uspešno lečenje postignuto kombinacijom amfotericin B 1-1.25 mg/kg/dan + 5FC 150 mg/kg/dan

Nolte et al. Antimicrob Agents Chemother 1997; 44: 196-199

Da li postoji veza izmedju razvoja rezistencije i virulencije?

- Razvojni oblici *C. albicans* razlikuju se u osetljivosti na azole
- Azoli interferiraju sa elongacijom hifa.

Da li rezistentni oblici formiraju hife?

- Virulentni sojevi *Candida albicans* su mnogo otporniji na fagocitozu i intracelularnu digestiju, kao i sojevi rezistentni na flukonazol
 - Da li postoji promena u komplement/opsonin receptorima u slučaju rezistencije

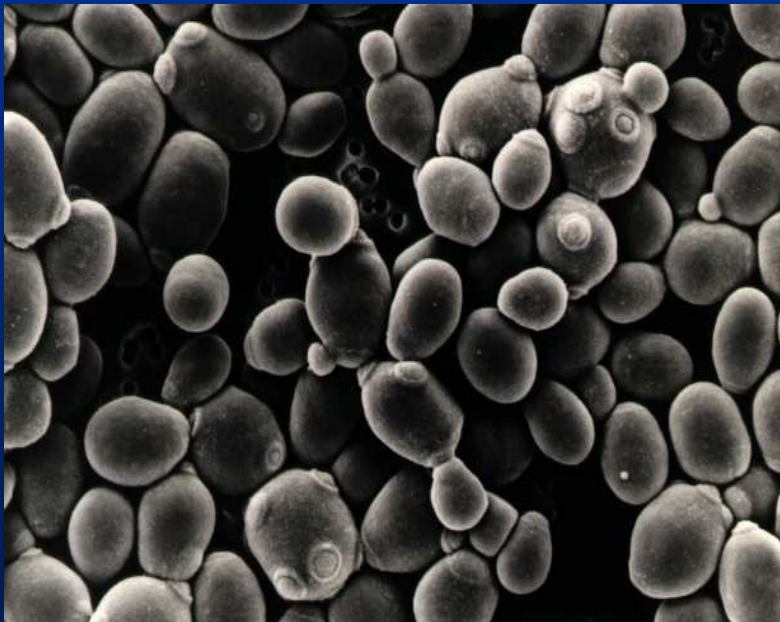
Sanglard. *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 255-265

Umesto zaključka

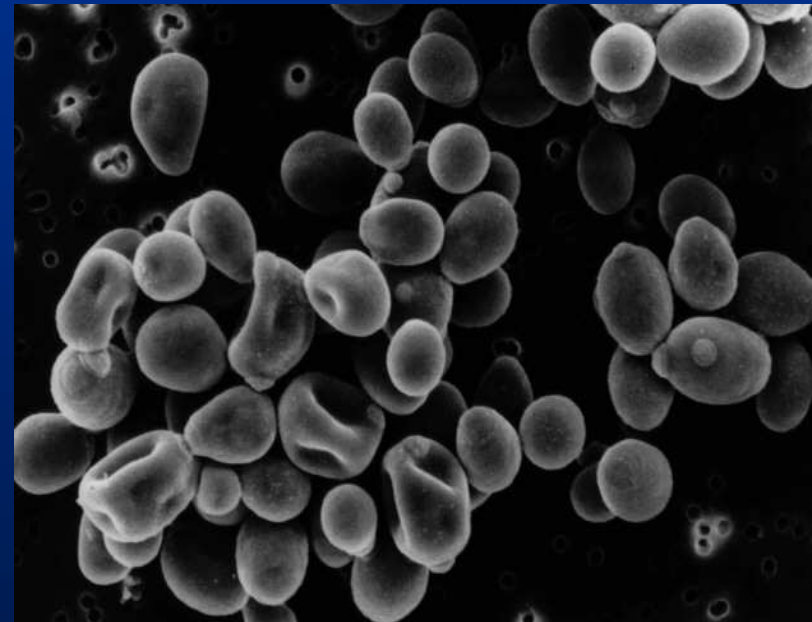
- Gljivične infekcije predstavljaju globalni zdravstveni problem
- Iako smo daleko od pronalaska idealnog antimikotika, potreban je stalni rad na unapredjenju terapije, kao i stalno izmalaženje novih, osetljivijih i specifičnijih metoda za postavljanje dijagnoze gljivičnih infekcija,
- a time i mogućnosti za pravovremenu, egzaktnu i uspešniju terapiju ovih infekcija.

Efekt azola na *C. albicans*

Pre izlaganja



Posle izlaganja



Hvala na pažnji!