

Quand faut il demander test de sensibilité *in vitro* aux antifongiques?

Olivier Lortholary M.D.; Ph.D

Centre National de Référence Mycoses Invasives & Antifongiques

Unité de Mycologie Moléculaire, CNRS URA3012

Institut Pasteur,

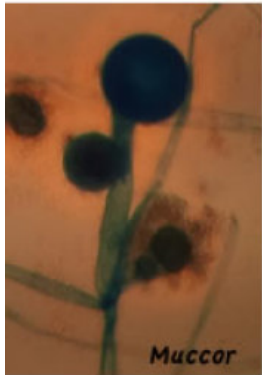
& Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur

Université Paris Descartes, Hôpital Necker Enfants malades,

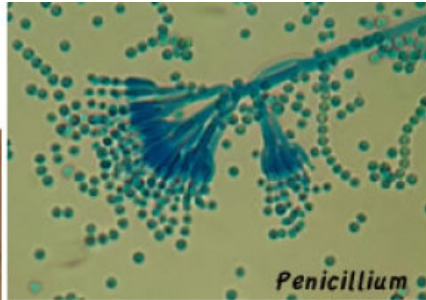
IHU Imagine Paris, France.



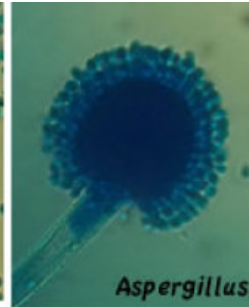
Microplaque FUNGITEST™



Mucor



Penicillium



Aspergillus



Levures



Geotrichum

Etest®



Polling Question

For which of the following situations do you want an *in vitro* susceptibility testing to be done at your institution ?
Select all that apply.

1. Invasive aspergillosis in an AML patient
2. *Fusarium* spp. keratitis
3. Histoplasmosis in a HIV + patient
4. Candidemia due to *C. albicans* in an ATF naive ICU patient
5. Mucormycosis in a diabetic patient
6. *C. glabrata* fungemia failing echinocandin therapy
7. Chronic pulmonary aspergillosis before changing ATF therapy
8. Incident episode of cryptococcal meningitis in an azole naïve patient
9. Cerebral phaeohyphomycosis in an apparently immunocompetent patient
10. Relapsing *C. albicans* trush in a patient with chronic muco-cutaneous candidiasis

Résistance primaire ou naturelle aux antifongiques

- Observée chez **champignons n'ayant jamais été exposés** aux antifongiques
- Variations moléculaires intrinsèques de la cible présentes chez tous ou presque tous les individus d'une même espèce pour un ATF donné «spectre d'activité d'un antifongique»
- Concerne +++ azolés et moins échinocandines et polyènes.
- Identification du genre et de l'espèce prédit profil de résistance naturelle
- Espèce est résistante si CMI de la majorité des individus $>$ celles des autres espèces du même genre.
- **CMI50** = plus petite concentration ATF inhibant croissance de 50% des souches de la population d'isolats de même espèce: marqueur de résistance naturelle de l'espèce /ATF

Résistance secondaire ou acquise

- Apparaît **uniquement après exposition du champignon aux antifongiques (médicament ou environnement)**
- Mécanismes bien connus: *C. albicans* et candidose muqueuse; *A. fumigatus* et aspergillose chronique
- Ne concerne que quelques isolats minoritaires au sein d'une même espèce naturellement sensible à l'antifongique
- Souche = résistante quand CMI > celles de la majorité des souches de son espèce, testées dans les mêmes conditions
- **CMI90**: plus petite concentration d'antifongiques inhibant la croissance de 90% des souches de la population, est un marqueur de résistance acquise.

Modification de l'écologie microbienne

1. Pré-exposition au fluconazole ou à la caspofungine influence espèces secondairement responsables d'infections fongiques (flore endogène ou non)
Tendance à sélectionner les espèces naturellement moins sensibles à l'antifongique administré préalablement : *C. krusei* et fluconazole; *Candida parapsilosis* et caspofungine; levures émergentes et caspofungine
2. Pré-exposition au voriconazole et émergence des mucormycoses en hématologie et transplantation d'organes + majeure virulence de *Rhizopus arrhizus*

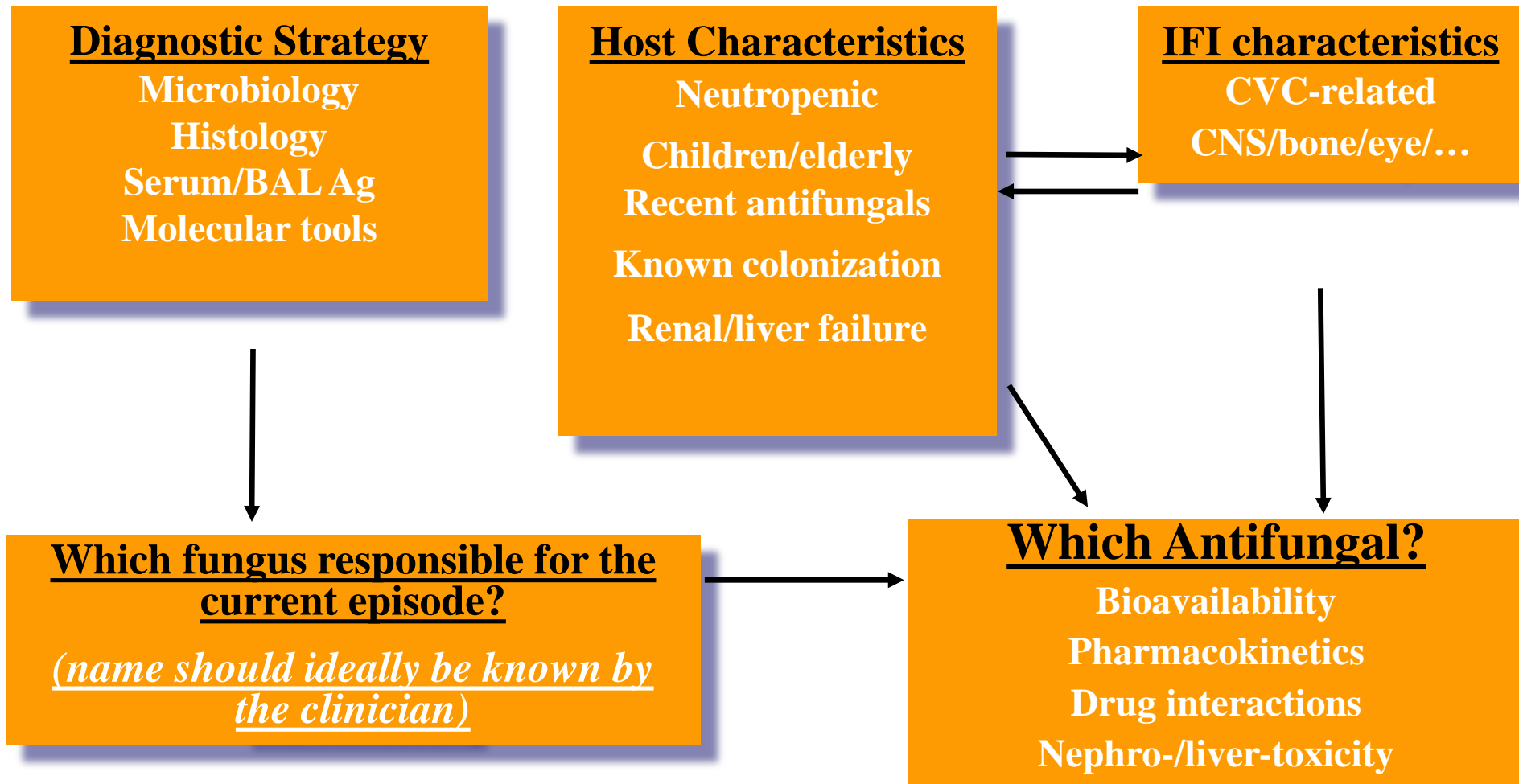
Quatre grands mécanismes de résistance ATF

1. Altération du transport des molécules antifongiques
2. Modification moléculaire de la cible des antifongiques
3. Utilisation de voie métaboliques compensatrices
4. Présence de structures multicellulaires complexes (biofilms)

Mécanismes de résistance aux antifongiques

Classe	Mécanisme de résistance	Candida	Aspergillus	Cryptococcus
Polyènes	Déplétion en ergostérol	X	X	X
	Augmentation de la proportion des glucanes de la paroi fongique	X	X	
	Augmentation de l'activité catalasique	X	X	
	Formation de biofilm	X	X	
Azolés	Modification de la cible (CYP51A)	X	X	X
	Surexpression de la cible	X	X	
	Altération des transporteurs	X	X	X
	Augmentation des voies impliquées dans la réponse au stress	X	X	
	Modification des enzymes responsable de la formation des métabolites toxiques	X		
	Modification de gènes activateurs transcriptionnels des gènes de résistances	X		
	Formation de biofilm	X	X	
	Réarrangements chromosomiques	X		X
Echinocandines	Modification de la cible (FSK1)	X	X	RN
	Surexpression de la cible (FSK1)		X	RN
	Modification de la composition de la paroi cellulaire		X	RN
	Augmentation des voies impliquées dans la réponse au stress	X	X	RN
Analogues pyrimidiques	Modification des enzymes responsable de la formation des métabolites toxiques	X	X	X

What clinicians should have in mind upon diagnosis of IFD ?



Méthodes d'étude sensibilité *in vitro* (1)

- Nécessitent toujours pour l'instant l'isolement préalable du champignon responsable
- Plupart des tests de sensibilités définissent CMI de l'isolat clinique
- Deux techniques de référence actuellement basées sur des méthodes de microdilution :

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing—Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST)

- ✓ Bien standardisées et définissent seuils de sensibilité aux antifongiques
- ✓ Bonne corrélation entre les seuils EUCAST et CLSI
- ✓ Difficiles à mettre en œuvre en pratique hospitalière

Méthodes d'étude sensibilité *in vitro* (2)

Techniques actuellement commercialisées :

Etest® (ABiomerieux)

ATB fungus® (Biomerieux)

Micronaut® (Merlin)

Sensititre YeastOne® (Trek Diagnostic Systems)

Vitek 2 antifungal susceptibility system (Biomerieux)

Souvent validées / méthodes de références

Aucune d'entre elles validée pour la définition d'un seuil de sensibilité aux ATF

MALDI-TOF détermine concentration minimale induisant le changement de spectre protéique du champignon sous l'effet de l'antifongique. Bien corrélé à CMI.

Interprétation des tests de sensibilité in vitro (1)

Pour une espèce donnée et vis à vis d'un antifongique donné; deux seuils

1. Seuil clinique ou clinical breakpoint (CBP)

prend en compte caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de chaque antifongique, et des études mettant en évidence un lien entre CMI et succès thérapeutique chez l'homme et l'animal

catégorie sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R)

Interprétation des tests de sensibilité in vitro (2)

Pour une espèce donnée et vis à vis d'un antifongique donné; deux seuils

2. Seuil épidémiologique ou epidemiological cut-off value (ECV)

- défini pour une espèce donnée par l'étude de la distribution des CMI de populations d'isolats sauvages (absence de résistance acquise ou de mutation) par rapport à celle des isolats ayant une mutation ou un autre mécanisme acquis conférant une résistance à un antifongique.
- limite supérieure des CMI de la population sauvage définit l'ECV.
- permet de classer un isolat en catégorie sauvage (WT) ou non sauvage (NWT)
- particulièrement utile quand CBP non défini

Definition : EUCAST clinical breakpoints

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)														
	<i>C. albicans</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 >	
Amphotericin B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.03	0.03	0.08	0.08	0.08	0.08	0.002	4	0.08	0.08	IE ²	IE ²	IE	IE	
Caspofungin	Note ³	Note ³	Note ³	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	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	2	4	
Itraconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.12	0.12	0.12	0.12	IE ²	IE ²	IE	IE	
Micafungin	0.018	0.016	0.03	0.03	IE ⁴	IE ⁴	0.002	2	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE	IE	
Posaconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.06	0.06	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE	IE	
Voriconazole	0.12 ⁵	0.12 ⁵	IE	IE	IE	IE	0.12 ⁵	0.12 ⁵	0.12 ⁵	0.12 ⁵	IE ²	IE ²	IE	IE	

Indications étude sensibilité de *Candida* spp. (1)

- Testing for azole susceptibility is recommended for all bloodstream and other clinically relevant *Candida* isolates.
- **Comments (OL):**
 - ✓ Rare acquired resistance for *C. albicans*
 - ✓ Predictable susceptibility for *C. krusei*
 - ✓ Few percent acquired azole resistance for *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*
 - ✓ Test fluconazole and ideally voriconazole for *C. glabrata*

Indications étude sensibilité de *Candida* spp. (2)

- Testing for echinocandin susceptibility should be considered :
 - ✓ in patients who have had prior treatment with an echinocandin &
 - ✓ among those who have infection with *C. glabrata* or *C. parapsi*

(strong recommendation; low-quality evidence)

- **Comments (OL):** prevalence of echinocandin resistant *C.*

Indications étude sensibilité de *Cryptococcus neoformans*

- Pas d'indication pour isolats incidents en l'absence d'exposition aux azolés; valeurs « hautes » des CMI fluco souches WT
- Comme toutes levures CMI vori < CMI fluco mais pas indic vori
- Résistance naturelle aux échinocandines
- Résistance primaire possible à 5FC < 10%

Indications étude sensibilité des autres levures

- Pas d'indication pour isolats incidents en l'absence d'exposition aux antifongiques
- Résistances naturelles dépendantes de genre :
 - *Trichosporon* spp.
 - *Geotrichum* spp.
 - *Rhodotorula* spp.
 - *Saccharomyces* spp. (idem *C. glabrata*)
 - *Malassezia* spp.

Indications étude sensibilité des *Aspergillus* spp.

- +++ *A. fumigatus* (section) avec espèces intrinsèquement résistantes [si responsable d'infection et non colonisation)
- Pas nécessaire de tester isavuconazole si vori R
- En fonction mutations, résistance variable aux triazolés
- *A. terreus* R AmB; *A. flavus* moins sensibles

Indications étude sensibilité des Mucorales/Scedosporium spp./Fusarium spp.

- Pas d'indication pour *Mucorales*
(posa/isavu?)
- *Scedosporium apiospermum*
 - Vorico/posaco et échinocandines pour ttt
- *Talaromyces prolificans* et *Fusarium* spp.
 - Intrinsèquement x R

Indications étude sensibilité des dimorphiques/phaeohyphomycetes

- Beaucoup d'entre eux : manipulation en P3
- Rares résistances acquises fluco ± vorico chez *H. capsulatum*
- Sensibilité variable des phaeohyphomycetes en fonction de espèce : +++ identification précise

Conclusion

- Intérêt des tests de sensibilité sur plan **épidémiologique**
- Atout majeur d'une base données nationale en France grâce au **CNR**
 - 25 laboratoires HU participant
 - Identifications moléculaires avec base séquences
 - Participation à EUCAST
- Bien connaître **data sensibilité locaux**
- **Pour décision thérapeutique individuelle**
 - Bien connaître résistances naturelles « spectre antifongique »
 - Considérer impact exposition aux ATF dans mois précédent(s)
 - Prendre en compte prévalence résistance environnement chez *A. fumigatus*
 - Sensibilité aux azolés des isolats de *Candida* spp. responsables d'infection invasive
 - Sensibilité aux échinocandines si exposition antérieure ou échec