



In vitro antifungal susceptibility

Professor Wei Liu

Professor, Department of Dermatology

Peking University First Hospital

Beijing, China



抗真菌药物敏感性试验

In vitro antifungal susceptibility testing

北京大学真菌和真菌病研究中心

Research Center for Medical Mycology

北京大学第一医院皮肤科

Department of Dermatology, Peking
University First Hospital

刘 伟 Wei Liu

抗真菌药物 -- 分类及作用机制

- 作用靶点为麦角固醇 (细胞膜)
- 多烯类 -- Drug-ergosterol interaction
 - Amphotericin B, nystatin
- 唑类 -- Inhibition of ergosterol synthesis
 - Imidazoles:
 - Triazoles:
- 丙烯胺类 -- Inhibition of ergosterol synthesis
 - Terbinafine, butenafine
- 吗啉类 -- Inhibition of ergosterol synthesis
 - Amorolfine
- 作用靶点为细胞壁
- 棘白霉素类 -- 抑制葡聚糖合成
 - Echinocandins
- 肽-核苷类 -- 抑制几丁质合成
 - Nikkomycin Z
- 嘧啶类 -- 干扰核酸合成
 - Flucytosine
- 其它类
 - Sordarins, azasordarins
 - Griseofulvin

Significance of Susceptibility Testing

- 抗真菌药物的体外敏感性试验指的是测定抗真菌药物对病原真菌的最低抑菌浓度 (MIC) -- 即可抑制致病真菌生长所需的最低药物浓度, 和最低杀菌浓度 (MFC) -- 杀死真菌所需的最低药物浓度, 的体外试验方法
- 监测临床病原真菌对不同抗真菌药物的体外敏感性指导临床用药的选择
- 发现新型耐药株
- 评价新型抗真菌药物的体外抗菌活性, 开发新药

Antifungal Susceptibility Testing

- 液基稀释法 Broth dilution

NCCLS M27: 致病性酵母菌, 即现在 CLSI

NCCLS M38: 产孢丝状真菌, 即现在 CLSI

- 琼脂稀释法 Agar dilution

- 纸片扩散法 Disk diffusion

- E-test 法

- 联合用药: Checkboard

- Caspofungin

CLSI M44-A

- Tested Drug: FLC, VRC,

- Media: Mueller-Hinton agar +
2% dextrose + 0.5ug/ml methylene
blue

- Quality control: *C.albicans* ATCC
90028

C.parapsilosis ATCC 22019

C.tropicalis ATCC 750

C.krusei ATCC 6258

CLSI M44-A

- Quality control: 以ATCC 22019为例

FLC: 25ug, 22-23mm

VRC: 1ug, 28-37mm

- Result: For FLC

	Sus	S-DD	Res
M27-A2	<8	16-32	>64
M44-A	>19	15-18	<14

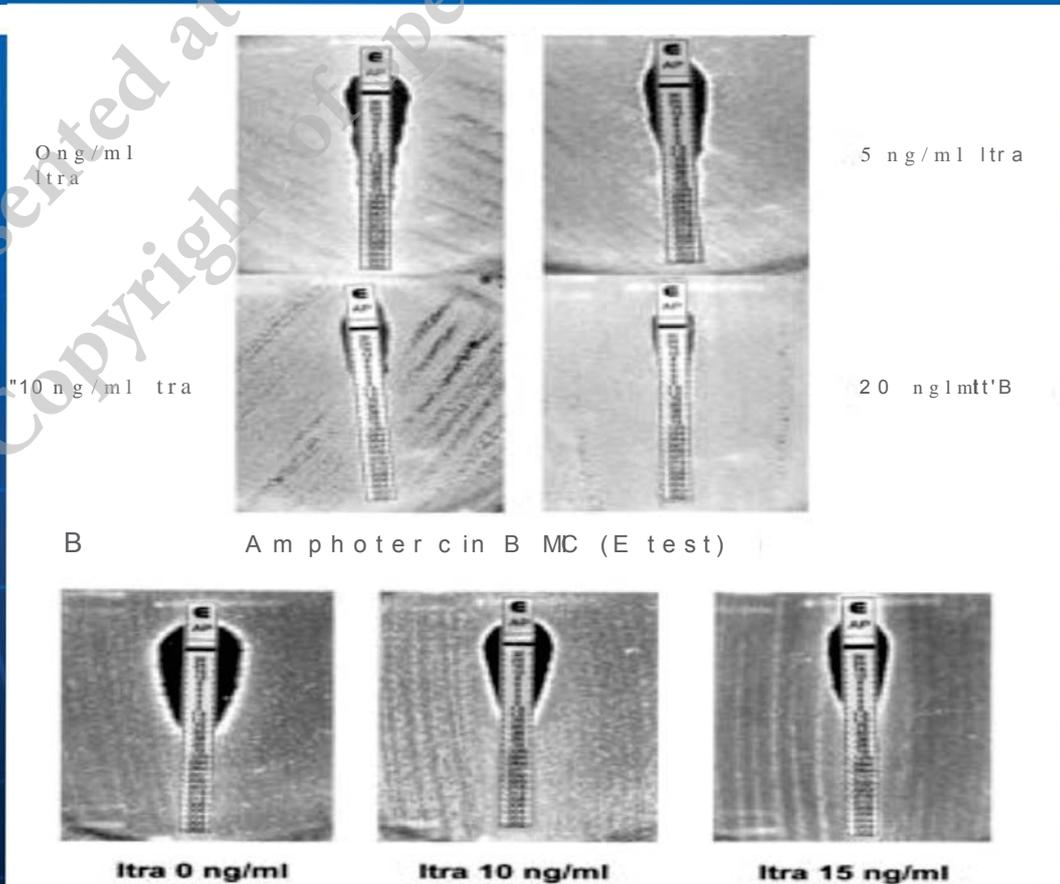
E-test法

- 是一种商品化的抗真菌药物敏感性方法
- 用将不同量的抗真菌药物包被在特殊试剂条上的, 受试药物包括氟康唑、伊曲康唑和二性霉素B等
- 该方法操作简单、直观, 与CLSI法有较好的一致性
- 但结果判定需有一定的经验, 价格昂贵

E-test法

- Quality Control: 以ATCC 22019为例, 48h

药物	MIC
AMB	0.25-1.0
FLC	1.0-8.0
5-FC	0.064-0.5
ITC	0.064-0.5
KTC	0.032-0.125
VRC	0.016-0.125



E-test检测曲霉的MIC



CLSI Method

- For Yeast, M27-P, T, A, A2

国内于1994年及时引进并推广应用，试管法和微量法，后者为主

- For filamentous fungi, M38-A

2002年问世，试管法和微量法，后者为主

- Medium, inoculation, incubation, 终点判读均统一规定

- Quality control: ATCC 22019等

意义：保证操作方法尽可能标准化

CLSI Method

- **Drug preparation:** **水溶性药物**：如 FLC，蒸馏水制备储存液，先称量，制备20倍于最高药敏试验浓度的药液（如1280）；然后以RPMI1640稀释，分别获得10倍于各个浓度的药液（640），进一步以RPMI1640分别稀释5倍后，接种于药敏板

非水溶性药物：如ITC等，DMSO制备储存液，浓度不超过1%

先称量，制备100倍于最高药敏试验浓度的药液（如1600）；然后以DMSO稀释，分别获得100倍于各个浓度的药液（800，400），进一步以RPMI1640分别稀释50倍后，接种于药敏板

倍比稀释 Two-fold dilution



CLSI 方案

- Inocula:

—— **Yeast**: 35度, PDA或SDA孵育24-48h

—— **Filamentous fungi**: 曲霉, 波氏, 孢子丝菌等, 35度, PDA孵育7天; 镰刀菌, 35度,

PDA孵育48-72h, 继续在25度孵育7天----以保证菌的纯度和活力

以生理盐水制备悬液, 到0.5McFarland或计数到1-5X10⁶CFU/ml; 进一步稀释100倍(丝状菌, 0.5-2.5X10⁴CFU/ml) 或1000倍(酵母菌, 0.5-2.5X10³CFU/ml)

CLSI Method

- Medium: RPMI 1640 液基 (含MOPS, pH7.0)

- Inocula: 0.5-2.5X10³CFU/ml--酵母菌
0.5-2.5X10⁴CFU/ml—丝状菌

- Incubation: 35度

念珠菌: 48小时

隐球菌: 72小时

曲霉: 48小时

镰刀菌: 48小时

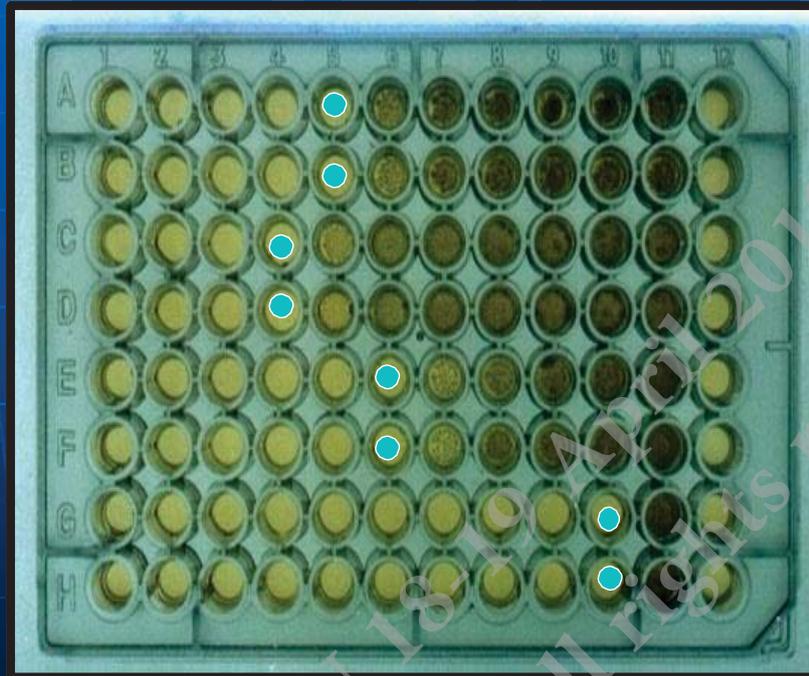
CLSI Method – result

- **MIC: The lowest drug concentration producing no growth** 与对照管比较，无任何可见生长一管的药物浓度即为MIC值
- **Note: compared with control**
- 不同的药物有不同的判读标准
 - **AmB:** 典型，容易判断，**100%**受抑为标准
 - **Azoles and 5-FC:** 终点常不清楚，以**50%** (M27-A2)，或**100%** (M38-A中ITC) 受抑为标准
- **MFC: Minimal fungicidal concentration**
- **MEC: minimal effective concentration**

MIC & MFC



Antifungal susceptibility Testing of Dematiaceous Fungi by Broth Microdilution Method



● :MIC

CLSI Method(M27-A3)

- FLC、ITC和VRC对念珠菌的MIC ($\mu\text{g/ml}$) 判读

	Sus	S-DD	Res
FLC	≤ 8	16-32	≥ 64
ITC	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
VRC	≤ 1	2	≥ 4

ITC: 对粘膜部位而言, 用于深部感染时主要看ITC的血药浓度应该大于 $0.5 \mu\text{g/ml}$; 棘白球素类药物 ≤ 2 时为敏感, >2 时为不敏感, 应该重复试验并在参比实验室进行确认, 其临床意义亦不确定

Breakpoint for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* in CLSI method: CLSI 稀释法测定白念珠菌, 热带念珠菌及近平滑念珠菌(24h)

	MC ($\mu\text{g/ml}$)			
	敏感 S	剂量依赖性敏感 SDD	中介 I	耐药 R
FLC	≤ 2	4	-	≥ 8
ITC*	≤ 0.12	0.25-0.5	-	≥ 1
VRC	≤ 0.12	-	0.25-0.5	≥ 1
CAS	≤ 0.25	-	0.5	≥ 1
MCFG	≤ 0.25	-	0.5	≥ 1
ANDFG	≤ 0.25	-	0.5	≥ 1

近平滑念珠菌的棘白菌素类药物判读折点: ≤ 2 S · 4 Intermediate · ≥ 8 resistant

Proposed breakpoint for *A. fumigatus* based on eucast method 建议烟曲霉对已批准的唑类药物的判读折点

	MC ($\mu\text{g/ml}$)			
	敏感 S	剂量依赖性敏感 SDD	中介 I	耐药 R
ITC	≤ 2	-	2	≥ 2
VRC	≤ 2	-	2	≥ 2
POS	≤ 0.5	-	0.5	≥ 0.5

Assaying the tissue level of antifungal drug(组织浓度)

■ Linking susceptibility and clinical treatment

■ 以FLC为例：

剂量	组织浓度
100mg/d	6 μ g/ml
400mg/d	20-30 μ g/ml
800mg/d	40-60 μ g/ml

Rex JH, Clin Microb Rev 1993, 6: 367-381

CLSI Method - quality control CLSI 方案 - 质控

■ 目的

■ 重复性

■ 标准株：ATCC 22019等

■ 频度

■ 生长对照

■ 纯度对照

■ 终点解释对照

CLSI 方案 - 质控

- 以ATCC22019为例($\mu\text{g/ml}$)

Drug	24h	48h
AMB	0.25-2.0	0.5-4.0
5-FC	0.06-0.25	0.12-0.5
FLC	0.5-4.0	1.0-4.0
ITC	0.12-0.5	0.12-0.5
VRC	0.016-0.12	0.03-0.25
KTC	0.03-0.25	0.06-0.5
PSC	0.06-0.25	0.06-0.25
RVC	0.016-0.12	0.03-0.25

Combined antifungal susceptibility

A 药

B 药

A8 B8	A7 B8	A6 B8	A5 B8	A4 B8	A3 B8	A2 B8	A1 B8	AS	BS	GC	MC
A8 B7	A7 B7	A6 B7									
A8 B6	A7 B6	A6 B6									
A8 B5			A5 B5								
A8 B4				A4 B4							
A8 B3					A3 B3						
A8 B2						A2 B2					
A8 B1							A1 B1				

■ Results interpretation:

以抑菌浓度分数指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 评估各药物间的相互作用:

$$FICI = \frac{MIC_{A \text{ 联合}}}{MIC_{A \text{ 单独}}} + \frac{MIC_{B \text{ 联合}}}{MIC_{B \text{ 单独}}}$$

其界限为:

$FICI < 1$; ≤ 0.5 , 为协同作用

$1 \leq FICI < 2$ 为相加作用

$FICI > 2$; > 4 , 为拮抗作用

$FICI = 2$; $0.5 < FICI \leq 4$ 为无相互作用

Significance of susceptibility 抗真菌药 敏试验的意义

- 监测临床病原真菌对不同抗真菌药物的体外敏感性
指导临床用药的选择
发现新型耐药株
- 评价新型抗真菌药物的体外抗菌活性, 开发新药

Correlation of antifungal susceptibility with clinical outcome

体外药敏试验与临床疗效的相关性



Correlation of antifungal susceptibility with clinical outcome

(一致性)

■ CLSI M27-A

FLC对600余株念珠菌MIC值: 分离自150余例
AIDS的食管念珠菌病, 一致性好; 治疗失败者, MIC
值大于64 $\mu\text{g/ml}$

Mahmoud A.G, JCM 1996, 34:489-495;

The basis for clinical treatment

- 以FLC为例

<u>MIC</u>	<u>dose</u>
<4 μ g/ml	100mg/d
4-8 μ g/ml	200mg/d
8-16 μ g/ml	400mg/d
16-32 μ g/ml	800mg/d

Hopenthal et al, Diagn Microb Infect Dis, 2004,
48:153-160

Assaying the tissue level of antifungal drug(组织浓度)

- Linking susceptibility and clinical treatment 联系药敏试验和临床用药的桥梁

- 以FLC为例：

<u>剂量</u>	<u>组织浓度</u>
100mg/d	6 μ g/ml
400mg/d	20-30 μ g/ml
800mg/d	40-60 μ g/ml

Keep in mind

■ 90-60 rule—MIC vs clinical outcome

临床疗效

susceptible: 90% response to therapy

对治疗有效

resistant: 60% response to therapy

对治疗有效

Rex J, CID 2002, 35: 982-989

Application of antifungal susceptibility

■ suggestions

疾病

建议

孤立的粘膜念珠菌病

经验性治疗，不做药敏

复发的粘膜念珠菌病

菌种鉴定，如果治疗失

败应该考虑到药敏

高危患者中念珠菌定植

菌种鉴定，建立当地药

应该经验性治疗

敏试验流行病学资料

念珠菌血症及深部感染

菌种鉴定，应用唑类药

物时应该考虑药敏试

验，并定期掌握当地

药敏试验流行病学资料

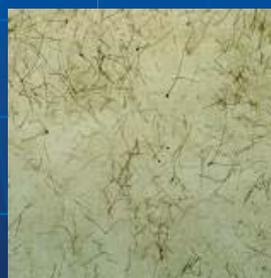
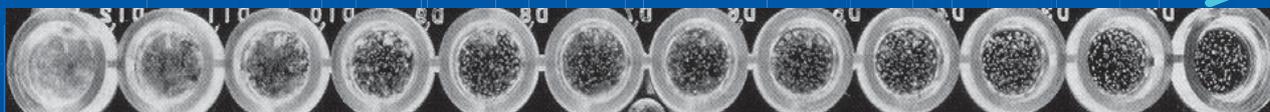
深部感染需要延长治疗时

对所有菌株都测药敏

Hopenthal et al, Diagn Microb Infect Dis, 2004, 48:153-160

Antifungal activity of echinocandins 棘白球素的体外抗真菌活性: 对曲霉

Growth Control Increasing Concentration of Echinocandin



Healthy
Happy

Point of Transition:
MEC, or
Minimum Effective
Concentration



Stubby
Aberrant
Sick



Photomicrographs and definition of MEC: Kurtz et al., AAC 38:1480, 1994

Clinical breakpoints for antifungal agents and *Candida* spp. determined by 24h CLSI broth microdilution methods (M27-A3)

Antifungal agents	Species	MIC Range ($\mu\text{g/mL}$)		
		S	SDD/I	R
Fluconazole	<i>C. albican/C. parapsilosis/C. tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. glabrata</i>		≤ 32	≥ 64
Voriconazole	<i>C. albican/C. parapsilosis/C. tropicalis</i>	≤ 0.12	0.25-0.5	≥ 1
	<i>C. krusei</i>	≤ 0.5	1	≥ 2
Caspofungin	<i>C. albican/C. tropicalis/C. krusei</i>	≤ 0.25	0.5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5
	<i>C. Parapsilosi/C. guilliermondii</i>	≤ 2	4	≥ 8
Micafungin	<i>C. albican/C. tropicalis/C. krusei</i>	≤ 0.25	0.5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0.06	0.12	≥ 0.25
	<i>C. Parapsilosi/C. guilliermondii</i>	≤ 2	4	≥ 8
Anidulafungin	<i>C. albican/C. tropicalis/C. krusei</i>	≤ 0.25	0.5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5
	<i>C. Parapsilosi/C. guilliermondii</i>	≤ 2	4	≥ 8

Epidemiological cutoff values for antifungal agents and *Aspergillus* spp. determined by 48 h CLSI broth microdilution methods (M38-A2)

Antifungal agents	Species	ECV($\mu\text{g/mL}$)
Itraconazole ^a	<i>A. fumigatus/A. flavus/ A. terreus/ A. nidulans</i>	1
	<i>A. niger/A. versicolor</i>	2
Voriconazole ^a	<i>A. fumigatus/A. flavus/ A. terreus</i>	1
	<i>A. niger/A. nidulans/A. versicolor</i>	2
Posaconazole ^a	<i>A. fumigatus/A. terreus/ A. niger</i>	0.5
	<i>A. flavus</i>	0.25
	<i>A. nidulans/A. versicolor</i>	1
Amphotericin B ^b	<i>A. fumigatus/A. flavus/ A. niger/ A. versicolor</i>	2
Caspofungin ^c	<i>A. nidulans/A. terreus</i>	4
	<i>A. fumigatus/A. nidulans</i>	0.5
	<i>A. flavus/ A. niger/A. terreus/A. versicolor</i>	0.25

aJCM, 2010,48: 3251; bAAC, 2011,55: 5150; cAAC, 2011,55: 2855

THANKS!