

Resistensbestemmelse af gærsvampe på Sensititre YeastOne og E-test – en metodesammenligning

Resultat af bachelorprojekt har ændret testmetode på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Rigshospitalet

Introduktion

Der ses en stigende tendens i antallet af candidiasis-tilfælde i Danmark (1). I Danmark er tilfældet af candidæmi tre gange højere i forhold til andre skandinaviske lande (2). Resistens over for antimykotika har været anset som mindre problematisk ved *Candida* species end ved andre patogene slægter af gærsvampe. Der er dog en stigende tendens til resistensudvikling over for både azoler og echinocandiner, hvilket har ført til kliniske fejlbehandlinger og samtidig øget behovet for en præcis og hurtig resistensbestemmelse (3).

På baggrund af et stigende behov er der de seneste år præsenteret flere nye kommercielle testmetoder til resistensbestemmelse af gærsvampe, heriblandt Sensititre YeastOne (SYO). SYO er en semiautomatiseret metode, som in vitro kan MIC-bestemme for flere forskellige antimykotika ved samme analysekørsel. Det er en metode, som bygger på et kolorimetrisk mikroforyndingsprincip, og som på nuværende tidspunkt benyttes i flere kliniske laboratorier (4).

I projektet følges European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints (BP) til klassificering af de aflæste MIC-værdier. Disse BP indikerer, om en stamme er sensitiv (S), intermediær (I) eller resistent (R) over for et antimykotikum.

Formålet med projektet er at påvise, hvorvidt SYO kan erstatte E-test til MIC-bestemmelse.

E-test er den gyldne standard, og ved sammenligningen af de to metoder oversættes de opnåede MIC-værdier ift. de gældende EUCAST-standarder til hhv. S, I eller R.

Teori

Echinocandiner

Caspofungin, micafungin og anidulafungin er echinocandiner. Echinocandiner har en fungicid effekt over for de fleste *Candida* species og er det foretrukne antimykotika til behandling af invasiv candidiasis (5). Dette skyldes blandt andet, at echinocandinerne kun har få bivirkninger (5). Echinocandiner virker ved at hæmme enzymet (1,3)- β -D-glucansyntetase, hvilket bevirker, at gærsvampens cellevægsgdannelse blokeres (5).

Azoler

Fluconazole, itraconazole, voriconazole og posaconazole er de azoler, som er mest anvendt til behandling ved invasive gærsvampeinfektioner (3). Azoler har overvejende en fungistatisk effekt over for de fleste *Candida* species (6). Azoler virker ved selektivt at hæmme syntesen af ergosterol. Denne mekanisme fører til mangel eller udtømning af ergosterol hos den udsatte gærsvamp, hvilket vil svække stabiliteten af gærsvampens cellemembran, membranpermeabiliteten og transporten af næringsstoffer (7).

Materiale og metode:

54 gærstammer er benyttet til metodesammenligningen. 3 ATCC-stammer er benyttet til kvalitetssikring. De indsamlede stammer kommer fra patientprøver hos indlagte patienter på Rigshospitalet. For hver stamme skulle der laves E-test for 9 forskellige antimykotika; micafungin, 5-flucytosine, posaconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole, anidulafungin, caspofungin og amphotericin B. Der er udført et total antal E-



Af bioanalytiker //

Sandie N. Vu

Danilo F. Kalezic

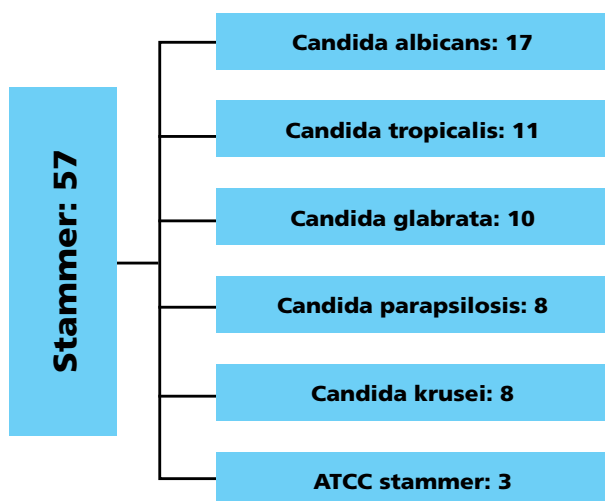
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Diagnostisk Center, Rigshospitalet.

Vejledere: Bioanalytikerunderviser Mette Jørgensen

Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Diagnostisk Center, Rigshospitalet

Lektor: Minna Fyhn Lykke Llado

PH Metropol.

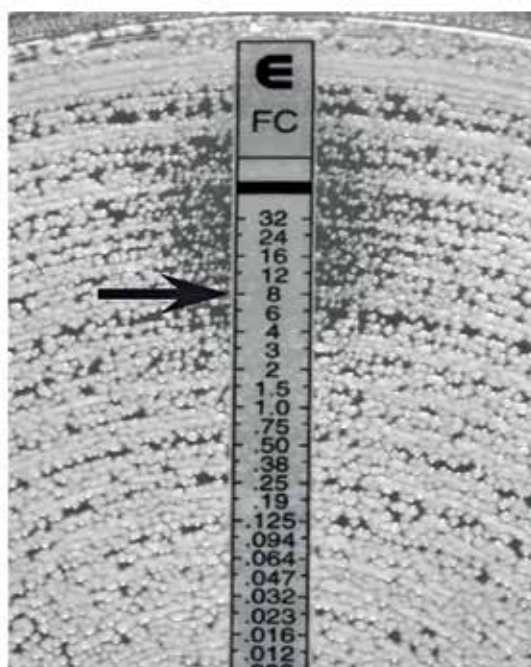
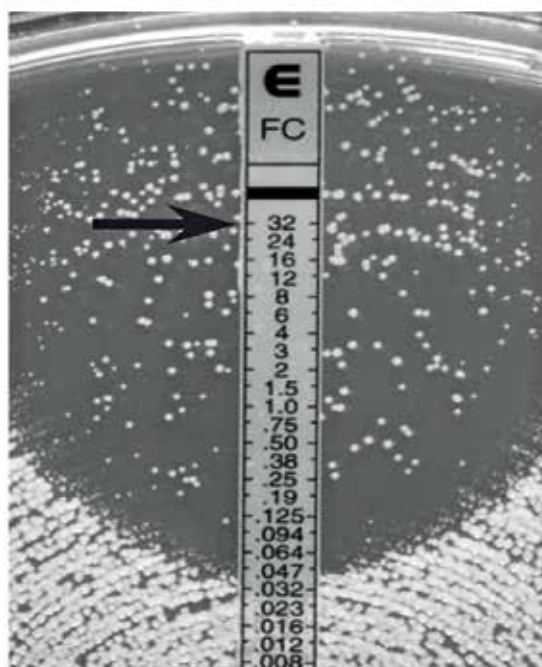


Tabel 1:
Oversigt over de benyttede gærstammer.

test på 513 stk. i forbindelse med projektet. På alle de benyttede stammer er der MIC-bestemt ved både SYO og E-test for alle ni antimykotika. Fordelingen af de 57 gærstammer er illustreret i tabel 1.

E-test

E-test er en agarbaseret gradientteknik til kvantitativ antifungal følsomhedstest. MIC kan bestemmes på baggrund af en prædefineret koncentrationsgradient af ét specifikt antimykotikum. E-test er opbygget som en tynd plaststrimmel. På den ene side af strimlen er angivet en MIC-aflæsningsskala, som angiver MIC i µg/ml. Den modsatte side af strimlen indeholder en specifik prædefineret eksponentiel antifungal gradient, som er immobiliseret på strimlen. Skæringspunktet ved aflæsning af E-test varierer for hvert antimykotikum. Eksempelvis skal 5-flucytosine aflæses ved ca. 90 % hæmning, som det vurderes med det blotte øje. Svagt slør og minutkolonier ignoreres. Se billede 1.



Billede 1:
Eksempel på aflæsning af 5-flucytosine E-test. Til venstre ses makrokolonier i ellipsen, MIC er bestemt til >32 µg /ml. Til højre ses forsinkede kolonier, hvor MIC er bestemt til 8 µg /ml.

KILDE: BIOMÉRIEUX PACKAGE INSERT 9395956D 2013/02.

Candidaemi skyldes forekomsten af gær af slægten *Candida* i blodet. Invasiv candidiasis er tæt forbundet med høj mortalitet og morbiditet (12). Selvom gær indgår som en del af normalfloraen hos mennesker, hænger den høje mortalitet i stor grad sammen med, at især immunsupprimerede patienter er udsatte over for candidiasis (13, 14). Kemoterapi ved kræftbehandling medfører immunsuppression, hvilket

gør patienterne udsatte over for candidiasis (16). Også patienter på intensivafdeling er udsatte, da der i mange tilfælde behandles med bredspektrede antibiotika, hvilket giver en forøget risiko for invasiv candidiasis (13). De hyppigst forekomne *Candida* species ved patogene tilfælde hos mennesker er *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* og *Candida parapsilosis* (13, 15).

Sensititre YeastOne

Sensititre YeastOne er en mikrotiter bouillon-metode baseret på målingen af MIC på en fortyndingsrække bestående af brønde coatede med antimykotika. Resultatet aflæses manuelt ved et kolorimetrisk farveskift fra blå til rød ved vækst.

MIC bestemmes ud fra den brønd med den laveste koncentration af antimykotika, som forhindrer vækst. Se billede 2



Billede 2: MIC bestemmes ud fra den første brønd uden vækst (blå). Den sorte firkant angiver MIC. Kilde: Thermo Fisher Scientific, procedurevejledning , Sensititre YeastOne august 2012.

For azolerne ved *Candida albicans*, *Candida glabrata* og *Candida tropicalis* gælder en undtagelse. MIC bør bestemmes ud fra den første brønd, som viser en mindre farveintensitet ift. den positive kontrolbrønd. Se billede 3.



Billede 3: MIC bestemmes ud fra den første brønd med en mindre farveintensitet end den positive kontrolbrønd. Den sorte firkant angiver, hvor MIC bør fastsættes.

KILDE:
THERMO FISHER SCIENTIFIC, PROCEDURE VEJLEDNING, SENSITITRE YEASTONE AUGUST 2012.

Resultater

Både E-test og SYO angiver resultatet som en MIC-værdi.

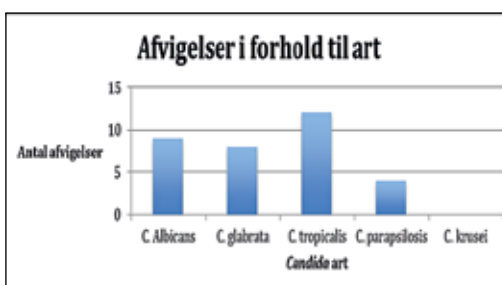
Antimykotika	Procentmæssig kategorisk overensstemmelse
Posaconazole	83,3 %
Voriconazole	97,2 %
Itraconazole	88,9 %
Fluconazole	96,3 %
Micafungin	94,3 %
Anidulafungin	79,6 %
Caspofungin	80 %
Amphotericin B	100 %
5-flucytosine	–
Alle antimykotika	90,3 %

Tabel 2: Oversigt over de procentmæssige kategoriske overensstemmelser mellem E-test og Sensititre YeastOne, både overensstemmelsen for de enkelte antimykotika og samlet for alle antimykotika vises. "–" 5-flucytosine kan ikke inddeles i breakpoint, og overensstemmelsen kan derfor ikke beregnes.

De opnåede resultater for amphotericin B, voriconazole og fluconazole var alle >95 %.

Reproducerbarhed: 100 % undersøgt over for benyttede ATCC-stammer.

Tabel 3: Oversigt over antal afvigelser ved de enkelte *Candida* species.



Diskussion

Aflæsningen af E-test er en subjektiv vurdering (10). Der vil dermed forekomme variationer mellem MIC-bestemmelse, alt efter hvilken person der aflæser E-test. Producenten oplyser, at E-test kun bør aflæses af erfarent personale, som har modtaget undervisning i mykologi og antifungal følsomhedstest.

SYO er i mindre grad en subjektiv vurdering og er nemmere at aflæse end E-test (10). Hvilket betyder, at det er en metode, som vil kunne benyttes af en større del af personalet samtidig med at kunne bringe mindre variation ved MIC-bestemmelse.

Posaconazole havde den laveste overensstemmelse for azolerne. Den fungistatiske effekt, som azolerne har, kan vanskeliggøre aflæsningen af E-test, da det kan medføre dannelsen af minutkolonier i hæmningsellipsen. Se billede 1.

Dette ses typisk ved *Candida tropicalis* og er tidligere lagt til grund for lave overensstemmelser ved sammenligning af E-test og mikro-bouillon-fortyndingsmetoder som SYO (8). Som det kan ses ud fra tabel 3, er det også ved *Candida tropicalis*, der ses flest afvigelser ved sammenligningen af de to metoder.

Den fungistatiske effekt kommer også til udtryk ved mikro-bouillon-fortyndingsmetoder og kan være en plausibel forklaring på misklassifikationerne. Fænomenet kaldes "trailing endpoints". Se billede 3. Det kan medføre en for høj bestemmelse af MIC, som dermed kan give anledning til misklassifikation (9).

Candida glabrata kan i mange tilfælde være problematisk at aflæse ved E-test, da vækst tit er begrænset, og aflæsningen foretages efter 24-48 timer (11). Alle *Candida glabrata* (E-test) blev aflæst efter 48 timer, da der ikke fandtes nok vækst til en aflæsning efter 24 timer. For en patient kan det betyde, at en optimal behandling først kan påbegyndes efter 48 timer. Ved brug af SYO kunne MIC i alle tilfælde aflæses efter 24 timer. SYO er en automatiseret metode, der er tidsbesparende for personalet og samtidig en metode, som er nemmere at aflæse end E-test, da der forekommer mindre variationer ved aflæsningsreglerne for de enkelte antimykotika. Det at der ved Sensititre YeastOne MIC bestemmes for flere antimykotika på én gang, og at MIC-værdierne automatisk gemmes i en elektronisk database, kan i nogle situationer betyde, at en optimal behandling hurtigere kan påbegyndes end ved brug af E-test.

SYO kan MIC-bestemme for et større antal antimykotika ad gangen, og de opnåede MIC-værdier lagres automatisk i softwaren. Det betyder, at såfremt den ansvarlige læge, efter frigivelse af de bestilte MIC-værdier, senere vil have MIC for andre antimykotika, kan disse nemt fremskaffes. Dette kræver hverken dyrkning af den pågældende gærsvamp eller fremstilling af inokulum og er dermed tidsbesparende for personalet og kan samtidig optimere behandlingen af patienten.

At MIC-bestemme ved brug af E-test kan være tidskrævende, da der er en del forberedende arbejde. Vækstegenskaberne for de enkelte stammer er varierende, hvilket kan besværliggøre aflæsningen. Yderligere er der varierende aflæsningsregler for de enkelte antimykotika.

Ved MIC-bestemmelse på SYO vurderes resultatet ud fra en farveindikator på panelet. Her kan dog opstå tvivl ved aflæsningen pga. farveintensiteten i panelet. Forarbejdet er væsentligt mindre ved brug af SYO end ved E-test.