

Perché la MIC conta? Il microbiologo vs il clinico

Why MIC matters? Microbiologists vs. clinicians

Corrado Girmenia ¹

¹ Dipartimento di Ematologia, Oncologia, Anatomia Patologica e Medicina Rigenerativa, Azienda Policlinico Umberto I, Roma

Abstract

Several mechanisms of resistance may interfere with the patients' healing from a fungal infection. However, in premature children fungi are generally susceptible to antifungal agents, except in case of vertical transmission from the mother. *In vitro* sensitivity tests have been recently harmonized between American and European standards, after years of unhomogeneity: to date, the interpretation of epidemiological cut-off of wild-type population and clinical cut-off are common, and are often updated. Sensitivity tests are difficult to perform, but luckily new commercial tests approved by FDA are available. Sometimes, knowing the intrinsic sensitivities and resistances of every fungal species and subspecies may be enough in the clinical practice, since few resistances are acquired.

Keywords

Fungal infections; Resistance; Sensitivity; Clinical cut-off; Epidemiological cut-off

Corresponding author

Corrado Girmenia
girmenia@bce.uniroma1.it

Disclosure

Il presente Congress Report è stato supportato da Astellas Pharma SpA

Antimicrobici e resistenze

Il fenomeno della resistenza agli antibatterici è noto fin dall'inizio dell'era degli antimicrobici. Quando è stata scoperta la penicillina ed è iniziato il suo impiego negli anni '40 vi erano già microrganismi resistenti alla penicillina, in quanto tutti gli antimicrobici, inclusi gli antifungini, essendo molecole di derivazione naturale, sono ben conosciuti dai microrganismi da milioni di anni. Non ci si deve, perciò, meravigliare che il problema della resistenza agli antimicrobici interessi anche gli antifungini. Non esiste infatti antifungino a spettro talmente esteso da non essere interessato da qualche fenomeno di resistenza, come illustrato nella Tabella I.

Per ogni classe di antifungini sono noti vari meccanismi di potenziale resistenza da parte dei microrganismi fungini.

I **polieni** si legano all'ergosterolo, che fa parte della membrana cellulare. Tale legame fa sì che si creino dei canali porinici che determinano un innaturale scambio di ioni nel contesto della cellula a seguito del quale la cellula muore: questo è il motivo per cui i polieni in genere sono fungicidi.

Sono noti alcuni meccanismi di resistenza ai polieni, determinati da un difetto del gene che codifica l'ergosterolo, che comporta la sintesi di un ergosterolo diverso da quello *wild type* (WT) oppure di

altri steroli che si accumulano nella membrana cellulare, per cui amfotericina B può presentare ridotta attività. Un altro meccanismo di resistenza ai polieni è rappresentato dalla iperproduzione di catalasi, enzimi che riparano rapidamente il danno ossidativo determinato dalla formazione di questi pori.

Tale problema è molto più frequente nelle muffe che nei lieviti. In linea generale i polieni sono gli antimicrobici che danno meno resistenze di tutti; in particolare nei lieviti le resistenze ai polieni sono eccezionali.

Gli **azoli**, invece, sono ben diversi. L'azolo agisce sempre sull'ergosterolo, ma non direttamente, bensì su uno degli enzimi che lo producono, la C14- α -lanosterolo demetilasi. Per questa classe di antifungini sono conosciuti vari meccanismi di resistenza: alcuni derivano da mutazioni puntiformi, per cui il target è modificato. In effetti è sufficiente la modifica di un aminoacido per far sì che l'azolo non riconosca più il target intracellulare.

Vi è poi anche la possibilità di una *up-regulation* del gene, mediante la quale l'azione inibitoria dell'antifungino viene contrastata da un'iperproduzione del target. La mutazione più frequente è l'aumentata attività delle pompe di efflusso in grado di espellere i triazoli dalla cellula antifungina, analogamente a quanto succede con i batteri resistenti a molti antibiotici e con le cellule neoplastiche multi-resistenti ai chemioterapici.

Farmaco antifungino	Funghi potenzialmente resistenti
Amfotericina B	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. terreus</i> • <i>A. versicolor</i> • <i>A. flavus</i> (alcuni) • <i>Scedosporium</i> • <i>C. lusitaniae</i>
Caspofungina, micafungina, anidulafungina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zygomycetes</i> • <i>Cryptococcus</i> • <i>Trichosporon</i> • <i>Fusarium</i> • <i>Scedosporium</i> • (<i>C. guilliermondii</i>) • (<i>C. parapsilosis</i>)
Itraconazolo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zygomycetes</i> • <i>A. fumigatus</i> • <i>Fusarium</i> • <i>C. krusei</i> • <i>C. glabrata</i> • Altre specie di <i>Candida</i>
Fluconazolo	<ul style="list-style-type: none"> • Tutti i funghi filamentosi • <i>C. krusei</i> • <i>C. glabrata</i> • Altre specie di <i>Candida</i>
Voriconazolo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Zygomycetes</i> • <i>A. fumigatus</i> • <i>C. glabrata</i> • <i>C. tropicalis</i>
Posaconazolo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. fumigatus</i> • <i>C. glabrata</i> • <i>C. tropicalis</i>

Tabella I. Elenco dei funghi potenzialmente resistenti ai farmaci antifungini

Le **echinocandine** sono gli unici antifungini che agiscono sulla parete cellulare, paragonabile al peptidoglicano dei batteri, tanto che le echinocandine sono chiamate le penicilline degli antifungini. Le echinocandine agiscono sulla β -(1-3)-D glucano sintetasi, che è un enzima che produce il β -(1-3)-D-glucano, costituente importante della parete cellulare. I meccanismi di resistenza sono essenzialmente rappresentati dalle alterazioni del gene che produce questo enzima e sono stati descritti principalmente nei lieviti.

Un dato parzialmente tranquillizzante è che in una popolazione generale il rischio di trovare un microrganismo resistente è molto basso nei bambini [1]: è molto più facile trovare una *Candida* resistente in un ragazzo o un adulto piuttosto che in un bambino.

Tuttavia in alcuni neonati possono essere isolati ceppi di *Candida* multi-resistenti in seguito a una trasmissione verticale a partenza del canale del parto della madre che ha sofferto di infezioni recidivanti ed è stata sottoposta a trattamenti multipli. Oppure ci possono essere delle trasmissioni orizzontali in un reparto in cui si è diffusa una *Candida* resistente. Normalmente i funghi che colonizzano i bambini sono sensibili agli antimicotici, pertanto fluconazolo continua a essere un farmaco molto importante e estesamente usato in questa popolazione.

Gestione delle resistenze e test di sensibilità *in vitro*

La difficoltà nella gestione della resistenza agli antifungini nasce proprio dai test di sensibilità *in vitro*, per la cui standardizzazione ci sono voluti decenni di ricerca di laboratorio e validazione clinica. Le metodiche standardizzate attualmente disponibili sono state prodotte dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) americano e dall'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) europeo. Ci sono voluti molti anni prima di arrivare a metodiche di

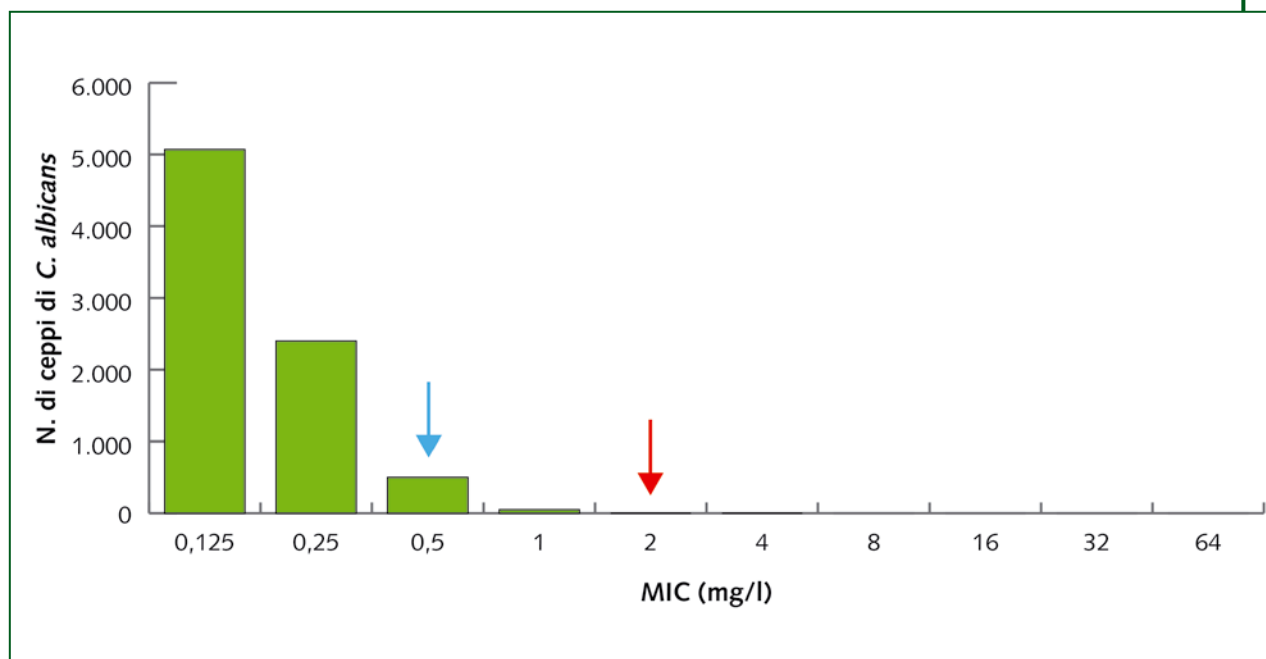


Figura 1. Cut-off epidemiologico (freccia azzura) e cut-off clinico (freccia rossa) per fluconazolo secondo EUCAST

MIC = minima concentrazione inibente

microdiluzione che venissero considerate valide e riproducibili a livello internazionale, ed è stato necessario molto lavoro per armonizzare le metodiche americane ed europee [2]. Un aspetto che negli ultimi anni ha reso ancora più complessa l'interpretazione dei test di sensibilità *in vitro* è rappresentato dalla duplice interpretazione di *breakpoint* di sensibilità in base al **cut-off epidemiologico della popolazione wild type** e in base al **cut-off clinico** [3]. Questi due criteri di interpretazione possono anche coincidere, ma spesso il cut-off epidemiologico è inferiore rispetto al cut-off clinico. Il cut-off epidemiologico, infatti, indica un valore al di sotto del quale si collocano ceppi WT che non hanno sviluppato alcun meccanismo di resistenza e al di sopra del quale si collocano ceppi che hanno subito mutazioni genetiche associate a una minore sensibilità all'antifungino in questione. Non è comunque detto che un ceppo con una sensibilità al di sopra del cut-off epidemiologico sia clinicamente non sensibile all'antifungino se impiegato ai dosaggi standard. Questa nuova "filosofia" di interpretazione dei dati di sensibilità *in vitro* con definizione del cut-off epidemiologico e del cut-off clinico è comune anche ai batteri in base alle più recenti indicazioni del CLSI e dell'EUCAST.

A titolo di esempio, nella Figura 1 è indicato con la freccia azzurra il cut-off epidemiologico di *C. albicans* (0,5 mg/l), mentre con la freccia rossa il cut-off clinico (2 mg/l). Un ceppo di *C. albicans* con una MIC pari a 1 mg/l è clinicamente sensibile a fluconazolo, ma probabilmente ha sviluppato un meccanismo molecolare che ne ha ridotto la sensibilità naturale al farmaco.

I valori di MIC tra 0,5 e 2 per *C. albicans* costituiscono quindi una zona grigia che definisce ceppi inizialmente sensibili al trattamento con fluconazolo a dosi standard ma che, durante il trattamento, potrebbero esplicare in maniera più decisa il meccanismo di resistenza già presente, determinando quindi un fallimento clinico tardivo. EUCAST e CLSI aggiornano continuamente il dato dei cut-off epidemiologici e clinici dei singoli microrganismi alla luce di nuove evidenze epidemiologiche e nuovi studi clinici. Per quanto riguarda EUCAST, è possibile reperire i due cut-off per i funghi sul sito web http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_4.1.pdf (ultimo accesso gennaio 2013).

Un ulteriore problema relativo ai test di sensibilità agli antifungini è rappresentato dalla difficile esecuzione del metodo della microdiluzione in brodo, considerato lo standard internazionale. L'esecuzione dei test di microdiluzione in brodo non è alla portata di tutti i laboratori di microbiologia. Sono tuttavia in commercio altri test molto più facili da effettuare che presentano un'adeguata affidabilità nella routine clinica. In particolare, i test approvati dall'FDA sono: E-test[®], Disk-diffusion test, Sensititre Yeast One[®] e Vitek[®] 2.

Quando un laboratorio non è in grado di fornire la sensibilità *in vitro* agli antifungini, può essere sufficiente considerare nella pratica clinica lo spettro di sensibilità specifico delle singole specie fungine. Infatti gran parte delle resistenze che si documentano negli isolati clinici sono intrinseche, cioè sono già innate nel fungo, ragion per cui basta conoscere e ricordare quali sono le sensibilità e le resistenze intrinseche dei vari microrganismi. A titolo di esempio:

- *Candida glabrata* è resistente in genere a fluconazolo e a tutti gli altri triazoli, quindi i triazoli non dovrebbero mai essere usati;
- *Candida krusei* è resistente a fluconazolo, ma è sensibile a posaconazolo e voriconazolo;
- *Candida parapsilosis* è solitamente sensibile a tutti i triazoli, ma potrebbe essere resistente o poco sensibile alle echinocandine;
- *Geotrichum* spp. è intrinsecamente resistente alle echinocandine.

Il problema delle resistenze acquisite è tuttavia un fenomeno in crescita e può capitare di incontrare ceppi normalmente resistenti a una molecola antifungina che si sono selezionati per una ridotta sensibilità fino a una franca resistenza. Per tale motivo, i laboratori di microbiologia che servono reparti a rischio come la neonatologia, l'ematologia o i trapianti di organo dovrebbero essere in grado di monitorare la sensibilità *in vitro* degli isolati clinici fungini.

Bibliografia

1. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, et al. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 278-83; <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.015>
2. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125(1 Suppl): S3-S13; <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
3. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, et al; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; 13: 180-95; <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2010.09.002>