

Испитивање осетљивости дерматофита на антимикотике

Валентина Арсић-Арсенијевић¹, Милена Бранковић², Ивана Чоловић¹, Александар Џамић¹, Сања Митровић¹, Елеонора Ратков¹

¹Референтна лабораторија за узрочнике микоза, Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Србија;

²Микробиолошка лабораторија, Општа болница, Ужице, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Дерматофити су плесни које изазивају инфекцију коже, длака и ноктију људи и животиња. Најчешћи клинички облици су онихомикоза и тинеа педис, које се бележе код око 20% светске популације. Инфекције су хроничног тока, дуго се лече, а лечење је често неефикасно због резистенције гљивица на антимикотике, па је удео трошкова лечења дерматофитоза код нас и у свету висок. За примену одговарајуће терапије неопходно је инфекцију доказати изолацијом узрочника и испитати његову осетљивост на антимикотике (антимикограм). Испитивање осетљивости је значајно и због праћења резистенције, за епидемиолошка истраживања и за поређење активности *in vitro* нових антимикотика. У примени су дифузионе и дилуционе методе антимикограма, а техничка питања важна за њихово правилно извођење и тумачење налаза објављена су у документима *E.DEF 9.1 (EUCAST)* и *M38-A2 (CLSI)*. У овом раду дати су подаци о достигнућима у овој области и новој организација лабораторија за медицинску микологију код нас. Формирање мреже лабораторија у координацији Националне референтне лабораторије за узрочнике микоза треба да омогући међулабораторијске студије и даљу стандардизацију метода за испитивање осетљивости дерматофита на антимикотике, репродукцибилност налаза и праћење клиничке корелације (вредности минималне инхибиторне концентрације и клиничког исхода дерматофитоза). Од нове организације се очекују побољшање ефикасности лечења дерматофитоза код нас, бољи квалитет живота оболелих особа и смањење трошкова лечења.

Кључне речи: дерматофити; испитивање осетљивости; документа *E.DEF 9.1* и *M38-A2*

УВОД

Дерматофити су стриктно патогене плесни које изазивају инфекције коже, длака и ноктију људи и животиња и обично су ограничене на површне слојеве коже и њене аднексе. Могу да захвате и дубље структуре коже и поткожног ткива изазивајући грануломе или псеудомицетоме [1]. Учесталост дерматофитних инфекција је у порасту, посебно код особа с трансплантатима, сидом, туморима, шећерном болешћу и оних који примају антибиотике или цитостатике [2]. Због хроничног тока, значајно утичу на квалитет живота, а посебно облици као што су онихомикоза и тинеа педис, код којих лечење траје дуго. Лечење антимикотицима (АМ) зависи од локализације инфекције и клиничке слике обољења, а избор АМ од његове ефикасности, токсичности, фармакокинетице и цене [3]. Међутим, често недовољна ефикасност терапије намеће потребу да се клиничка дијагноза потврди изолацијом и испитивањем осетљивости гљива на АМ. Због тога се развијају процедуре за испитивање осетљивости филаментозних гљива (плесни) *in vitro*, а стандардизација се врши у оквиру Америчког националног комитета за клиничке и лабораторијске стандарде (*NCCLS/CLSI*) и Европског комитета за испитива-

ње осетљивости на антимикробна средства (*AFST-EUCAST*), који су објавили референтне методе: *M27-A2* за испитивање осетљивости *Candida*, *M38-A* за испитивање осетљивости плесни [4], *M38-A2* за дерматофите (*CLSI*) [5], стандардизовану дилуциону методу за кваснице *E.DEF 7.1* [6] и бујон-дилуциону методу за плесни *E.DEF 9.1 (AFST-EUCAST)* [7]. За дерматофите се врши испитивање осетљивости бујон-дилуционом методом, диск-дифузионом методом и Е-тестом, али је стандардизована само микродилуциона метода.

У овом раду дат је преглед литературе о испитивању осетљивости дерматофита на АМ *in vitro*. Указано је на њен значај, а такође су дате смернице лабораторијама за медицинску микологију за практичну примену.

УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ ФАКТОРА НА ИСПИТИВАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ ДЕРМАТОФИТА

Инокулум гљива, начин његове припреме, припрема раствора АМ, избор подлоге за испитивање осетљивости, услови у којима се врши испитивање (температура, време) и контролни сојеви утичу на резултате испитивања осетљивости дерматофита на АМ *in vitro*.

Correspondence to:

Valentina ARSIĆ-ARSENIJEVIĆ
Institut za mikrobiologiju i
imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Srbija
arsicval@eunet.rs

Припрема инокулума

Вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) зависе од: старости културе, врсте подлоге, структуре гљивичних елемената и начина одређивања инокулума. Стварање конидија је веома важно, а за то се користе кромпиров декстрозни агар (енгл. *potato dextrose agar* – *PDA*), агар овсеног брашна (енгл. *oat-meal agar*) [8] или агар пшеничног брашна и крављег млека са додатком меда (енгл. *wheat flour-cow milk agar*) [9]. Стварање хифа се постиже на Саборо декстрозном агару (енгл. *Sabouraud dextrose agar* – *SDA*). Температура од 28°C стимулише раст конидија, а од 37°C хифа [9]. Инкубација траје 3-15 дана, а према *M38-A2* протоколу 4-5 дана или док се не постигне добра продукција конидија, подлога *PDA* (осим *Trichophyton rubrum* на *oat-meal* агару) и температура од 30°C [5]. Протоколом *E.DEF 9.1* препоручени су *PDA*, инкубација на 35°C и време 2-5 дана [7].

Суспензија гљива се припрема у физиолошком раствору [5] или дестилованој води [7], којима може да се дода и раствор *Tween 20* (због хидрофобности гљива) [7], а гљиве се суспендују са површине културе помоћу бриса, езе или пипете. Потребно је да суспензија одстоји 5-10 минута, како би се вишећелијски елементи наталожили. Затим се супернатант пренесе у нову епрувету и одређује густина гљива на три начина:

1. спектрофотометријски, где су таласна дужина (ТД) 520 nm и трансмисија (Т) 70-72% [10, 11, 12], 520 nm и 65-70% [13], 530 nm и 65-70% [3, 14, 15], односно 530 nm и 80-85% [3, 8];
 2. дензитометријски, са Мекфарландовим (*McFarland*) стандардима 0,5, 1 или 2 [16];
 3. бројањем гљива у комори хемоцитометра [5, 7, 9, 11].
- Величина инокулума гљива (енгл. *colony forming units* – *CFU*) је у распону од 10³ до 10⁶ *CFU/ml*, али је увек двоструко већа од коначне концентрације и проверава се засејавањем 10 μ l суспензије на чврсту подлогу [5]. Коначна густина инокулума се добија током самог испитивања, када се додаје *RPMI-1640*, који садржи различите концентрације растворених АМ и који је двоструко концентрован у односу на коначну концентрацију [7]. Двоструко концентровани *RPMI-1640* се користи за прављење разблажења АМ према протоколу *E.DEF 9.1*, јер се инокулум гљива прави у стерилној дестилованој води, док се према протоколу *M38-A2* инокулум гљива прави у *RPMI-1640*, те приликом прављења разблажења АМ нема потребе за двоструком концентрацијом овог медијума [5, 7] (Табела 1). Према стандарду *M38-A2*, коначни инокулум дерматофита је од 10³ до 3×10³ *CFU/ml*, а недерматофитних плесни од 0,4×10⁴ до 5×10⁴ *CFU/ml* [5], док је према стандарду *E.DEF 9.1* он за плесни од 2×10⁵ до 5×10⁵ *CFU/ml* [7].

Табела 1. Особине метода за испитивање осетљивости дерматофита на антимиотике
Table 1. Characteristics of methods used for antifungal susceptibility testing of dermatophytes

Метода Method	Чување културе Culture maintaining	Инокулум Inoculum		Подлога Medium	Инкубација Incubation		Референца (документ) Reference (document)
		Припрема Preparation	Величина (CFU/ml) Size (CFU/ml)		Дужина (дан) Time (day)	Температура (°C) Temperature (°C)	
Микро- дилуција Micro- dilution		1S, H	1-3×10 ³	<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> , - <i>NaHCO</i> ₃	4	35	[5] (<i>M38-A2</i>)
		2S, H	1-2.5×10 ⁵	<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> , - <i>NaHCO</i> ₃ , +2% <i>glucosa</i>	2	35	[7] (<i>E.DEF 9.1</i>)
	0,9% <i>NaCl</i> , 4°C	1F, S	2-4×10 ⁴	<i>RPMI-1640</i> ; <i>SDB</i> , <i>MVM</i>	4, 7, 10	28, 35	[11]
	0,9% <i>NaCl</i> , 4°C	3F, S; T, S		<i>RPMI-1640</i>	7	28	[12]
	<i>SDA-CCG</i>	T, S	2-5×10 ³	<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> , - <i>NaHCO</i> ₃	4, 5	30, 35	[8]
	<i>SDW</i> , 4°C	3F, S	0.5-5×10 ⁴ 0.5-5×10 ⁵	<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> , - <i>NaHCO</i> ₃ <i>RPMI-1640</i> + 2% <i>glucosa</i>	7	28	[10]
		4F, H	5×10 ⁶	<i>RPMI-1640</i>	4	28, 37	[14]
	<i>SDW</i> , 25°C	3T, V, S	2-6.8×10 ³ 1.2-6×10 ⁴	<i>RPMI-1640</i>	3, 7, 14	28 37	[3]
	<i>BB</i> + 5% <i>G</i> , -70°C	1T, S	0.4-5×10 ⁴	<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> , - <i>NaHCO</i> ₃	10-15	28	[18]
<i>SDW</i> , 25°C	T, S	0.4-5×10 ⁴	<i>RPMI-1640</i>	4-5	28	[15]	
Диск- дифузија Disk diffusion		5T, S	1.8×10 ⁴ -6×10 ⁶	<i>SHDM</i>	2, 7	28	[14]
	<i>BB</i> + 5% <i>G</i> , -70°C	1T, S	10 ⁶	<i>RPMI-1640</i> + 2% <i>glucosa</i> , + 1.5% <i>Bacto Agar</i>	10	28	[18]
		T, S	10 ⁴	<i>RPMI-1640</i> + 1.5% <i>Bacto Agar</i>	5	28	[17]
Е-тест E-test		T, S		<i>RPMI-1640</i> + <i>L-glutamin</i> + <i>SDA</i>	3	25	[2]
			10 ³ -10 ⁴ 0.5; 1; 2 MF	<i>RPMI-1640</i> + 2% <i>glucosa</i> ; + 1.5% <i>Bacto Agar</i>	7	30, 35	[16]

SDA – Саборо декстрозни агар; *SDW* – стерилна дестилована вода; *BB* – *Brucella* бујон; *G* – глицерин; *S* – спектрофотометријски; *H* – бројање у хемоцитометру; *F* – филтрација; *T* – таложење; *V* – мешање; *MF* – Мекфарланд; *SDB* – Саборо декстрозни бујон; *MVM* – Меквеј-Мортон; *SHDM* – Шедомијев медијум

За добијање суспензије гљива користи се 5-10 ml: ¹стерилан физиолошки раствор; ²0,1% раствора *Tween 20* у стерилној дестилованој води; ³стерилна дестилована вода; ⁴0,05% раствора *Tween 80* у стерилној дестилованој води; ⁵стерилан 0,85% *NaCl* са *Tween 80*

SDA – Saboraud dextrose agar; *SDW* – steril destilated water; *BB* – *Brucella* broth; *G* – glycerine; *S* – spectrophotometric; *H* – counting in hemacytometer; *F* – filtration; *T* – sedimentation; *V* – vortex; *MF* – McFarland; *SDB* – Saboraud dextrose broth; *MVM* – McVeigh - Morton; *SHDM* – Shadomy medium
For inoculum preparation is used 5-10 ml: ¹sterile 0.85% saline; ²solution of 0.1% Tween 20 in sterile destilated water; ³sterile destilated water; ⁴solution of 0.05% Tween 80 in sterile destilated water; ⁵sterile 0.85% saline supplemented with Tween 80

Припрема антимикотика

Према документу *M38-A2*, за испитивање осетљивости дерматофита дилуционом методом се за АМ растворљиве у води (флуконазол, флуцитозин, каспофунгин) препоручује концентрација основног раствора од најмање 1280 $\mu\text{g/ml}$ или 10 пута већа од највеће испитане концентрације [5]. Већина АМ (амфотерицин Б, итраконазол, кетоконазол, посаконазол, равуконазол, тербинафин) није растворљива у води, па се растварају у етил-алкохолу, полиетиленгликолу, карбоксиметил-целулози, а најчешће у стопроцентном диметилсулфоксиду (*DMSO*). Основни раствор АМ нерастворљивих у води се прави у концентрацији већој стотину или више пута од највеће концентрације АМ која ће се користити на тесту [5], а према документу *E.DEF 9.1*, основни (енгл. *stock*) раствори се праве у 200 пута већој концентрацији [7]. Цео поступак се обавља у асептичним условима [5, 7], а основни раствори АМ се чувају у стерилним полиетиленским или полипропиленским бочицама на -60°C или нижој температури (најдуже шест месеци) [5].

Према протоколу *M38-A2*, ако се радни раствори праве од АМ растворљивих у води, разблажења се могу правити директно у течном *RPMI-1640*. За нерастворљиве у води (већина АМ) радни раствори се добијају тако што се од основног раствора АМ прави серија двоструких разблажења у *DMSO*, до 100 пута веће концентрације од оне која се испитује, а онда се даље разблажује у *RPMI-1640* у односу 1:50, да би се добила концентрација АМ која је двоструко већа од оне која ће се испитати (Табела 2). Коначна концентрација АМ се постиже током извођења теста додавањем истог волумена инокулума гљива [3, 5, 11]. Коначни волумен је 200 μl , а коначна концентрација растварача 1% [5].

Табела 2. Концентрације антимикотика за испитивање осетљивости дерматофита (*M38-A2*) и плесни (*E.DEF 9.1*)

Table 2. Antimycotic concentrations for antifungal susceptibility testing of dermatophytes (*M38-A2*) and molds (*E.DEF 9.1*)

Антимикотик Antimycotic	Концентрација ($\mu\text{l/ml}$) Concentration ($\mu\text{l/ml}$)	
	<i>M38-A2</i>	<i>E.DEF 9.1</i>
Итраконазол Itraconazole	0.001-0.5	0.0156-8
Посаконазол Posaconazole	0.004-8	0.0156-8
Вориконазол Voriconazole	0.001-0.5	0.0156-8
Флуконазол Fluconazole	0.125-64	-
Тербинафин Terbinafin	0.001-0.5	-
Гризеофулвин Griseofulvin	0.125-64	-
Циклопироксоламин Ciclopiroxolamine	0.06-32	-
Амфотерицин Б Amphotericin B	-	0.0312-16
Каспофунгин Caspofungin	-	0.0312-16
Микафунгин Micafungin	-	0.0312-16

Према протоколу *E.DEF 9.1*, радни раствори се добијају од основног раствора АМ прављењем серија двоструких разблажења у води или *DMSO* до 200 пута веће концентрације од коначне. Даље разблажење до 1:2 се врши у двоструко концентрованом *RPMI-1640* са додатком двоцентне гликозе (*RPMI 2%G*). Додавањем гљива у дестилованој води постиже се коначна концентрација АМ и *RPMI 2%G* [7], а зависи од врсте гљива и АМ, као и очекиваног МИК за контролне сојеве.

Дифузиона метода се изводи са дисковима импрегнираним АМ раствореним у *DMSO*. Тзв. празни папирни дискови (6 *mm*) се импрегнирају са 20 μl раствора АМ (коначна концентрација 2 μg по диску) и чувају на -70°C [17] или се користе комерцијално доступни дискови [18].

Подлоге за антимикограм

Ако се примењује дилуциона метода, стандардна подлога је *RPMI-1640* са глутамином, без натријум-бикарбоната, са фенол-црвеним као *pH* индикатором (*M38-A2*) пуферисана са 0,165 *mol/l* морфолинопропансумпорном киселином (*MOPS*) од *pH* 7,0 \pm 0,1 на 25°C [4, 5], а додаток двоцентне гликозе је предвиђен протоколом *E.DEF 9.1* (Табела 1) [7].

Уколико се примењују дифузиона метода и Е-тест, најчешће се изводе на Милер-Хинтоновом (*Mueller-Hinton*) агра (0,2% гликозе и 0,5 $\mu\text{g/ml}$ метиленско плаве боје уз *pH* подлоге од 7,2-7,4, *CLSI M44-P*) [4] или *RPMI-1640* агра. Чешће се користи *RPMI-1640* са 1,5% агра пуферисаним са *MOPS*, а додавање двоцентне гликозе поспешује раст гљива (Табела 1). Подлоге које служе за изолацију гљива (*SDA*) се не користите за испитивање осетљивости.

Препоруке за извођење антимикограма

Испитивање осетљивости дерматофита започело је према протоколима *M38-A*, *M44-P* и *EUCAST* за испитивање осетљивости квасница. Нови документ *M38-A2* се односи на дерматофите, а *E.DEF 9.1* на све плесни [5, 7]. Кључне разлике су у температури и дужини инкубације (Табела 1).

Дилуциона метода

У испитивању осетљивости дерматофита примењују се две врсте дилуционе методе: микродилуциона и макродилуциона. Микродилуциона метода је једноставнија и изводи се у микротитрационим плочама: са заобљеним дном (*M38-A2*) или равним дном (*E.DEF 9.1*), укупне запремине АМ и гљива од 200 μl [5, 7]. У сваку коморицу се уноси по 100 μl сваке концентрације АМ у *RPMI-1640* добијене серијом двоструких разблажења АМ. Плоче се користите одмах или се чувају на

-70°C или -20°C (месец дана) [7]. Коначне концентрације АМ и коначни волумен постижу се додавањем 100 µl суспензије гљива. Према документу M38-A2, користи се позитивна контрола, а према E.DEF 9.1, и позитивна и негативна [5, 7]. Негативна контрола је чист медијум, а позитивна контрола су гљиве у медијуму и једнопроцентни растварач за АМ.

Након инкубације на 28-37°C од четири до петнаест дана или на 35°C током четири дана (M38-A2) читавају се вредности МИК визуелно (помоћу огледала) [5]. Резултати испитивања осетљивости дерматофита на АМ *in vitro* се изражавају као вредности МИК: МИК за азоле и гризеофулвин је најнижа концентрација АМ која смањује раст дерматофита за 80%, а за тербинафин 100% [10, 11, 15] или смањује раст гљива за 50% (азоли), 80% (тербинафин и гризеофулвин) [18] или 100% (независно од АМ) [3,17], односно 80% или више према стандарду M38-A2 [5] у односу на позитивну контролу (Слике 1 и 2). Занимљиво је да се тумачење резултата за ехинокандине, уместо МИК, одређује минимална ефективна концентрација (МЕК), најнижа концентрација АМ која доводи до стварања малих, округлих компактних форми са необичним кратким, разгранатим хифама [5, 7]. У документу E.DEF 9.1

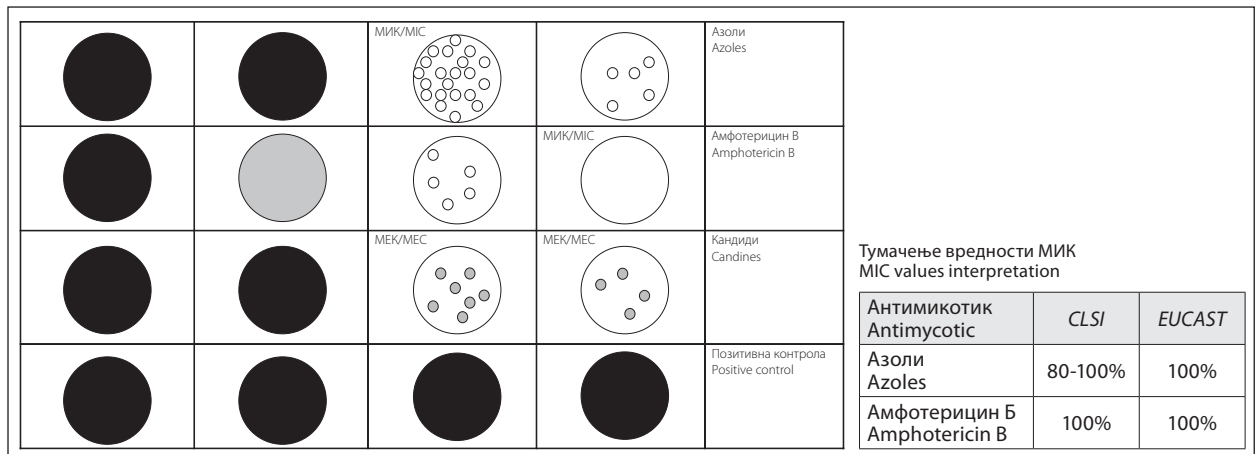
нису дефинисани услови за испитивање осетљивости дерматофита [7].

На основу резултата испитивања великог броја изолата дерматофита може се утврдити ефикасност појединих АМ одређивањем вредности МИК₅₀, концентрације која инхибира раст 50% испитиваних изолата гљива, односно МИК₉₀, концентрације која инхибира раст 90% испитиваних изолата (Табела 3). Контролни сојеви који су досад коришћени приказани су у табели 4.

Дифузиона метода

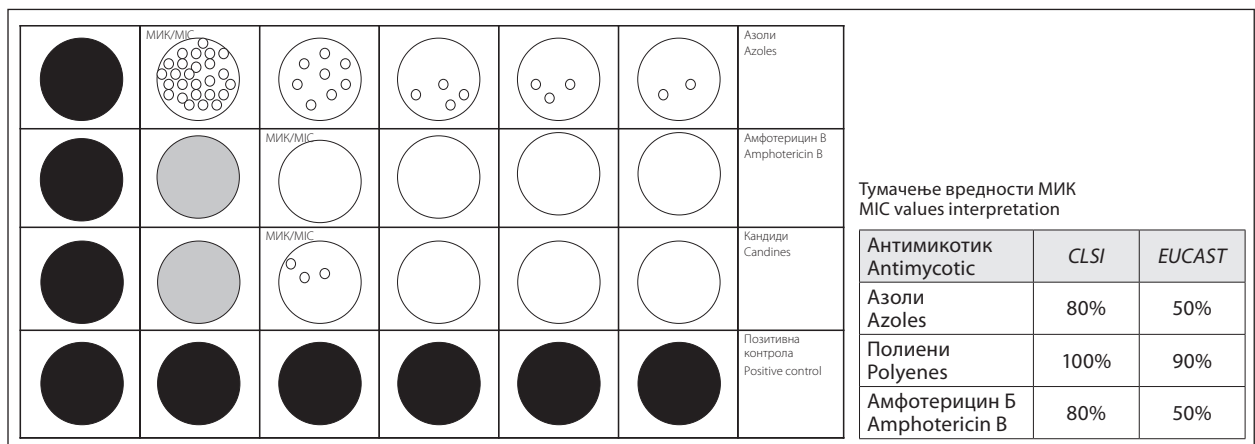
Она се изводи у плочама пречника 10 cm у којима се разлије 16 ml подлоге (дебљина 4 mm) које се чувају на 4°C [14]. Од изолата се припрема суспензија која се наноси брисом [17, 18] или пипетом [14], плоча се суши 15-20 минута, наносе се дискови, таблете или Е-тест траке, а затим се преврнута плоча инкубира на 25°C или 35°C од два до десет дана (Табела 1).

За правилно тумачење налаза диск-дифузионе методе – где се бележе вредности осетљив (S), умерено осетљив (I) и резистентан (R) – потребно је добијене резултате упоредити с пречником зоне инхибици-



Слика 1. Смањење раста плесни и тумачење вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) за поједине групе антимикотика
Figure 1. Molds growth reduction and minimal inhibitory concentration (MIC) values interpretation for some antimycotic groups

МЕК – минимална ефективна концентрација; МЕС – minimal effective concentration



Слика 2. Смањење раста квасница и тумачење вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) за поједине групе антимикотика
Figure 2. Yeasts growth reduction and minimal inhibitory concentration (MIC) values interpretation for some antimycotic groups

Табела 3. Вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) за врсте рода *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*
Table 3. Minimal inhibitory concentrations (MICs) values for species of genus *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*

Врста (број изолата) Species (number of isolates)	AM	Распон МИК MICs values	МИК ₅₀ MIC ₅₀	МИК ₉₀ MIC ₉₀	Реф. Ref.
<i>T. rubrum</i> (50)	KET FLU ITR GRI TER	0.0625-2.0 1.0->64.0 <0.031-1.0 0.25-2.0 <0.031	0.5 >64.0 0.125 1.0 <0.031	1.0 >64.0 0.25 1.0 <0.031	[2, 11]
<i>T. rubrum</i> (50)	KET FLU ITR GRI TER	0.062-1.0 1.0-64.0 0.031-0.25 0.062-1.0 <0.007-0.031			[10]
<i>T. mentagrophytes</i> (50)	KET FLU ITR GRI TER	0.062-2.0 8.0-64.0 0.015-0.25 0.125-1.0 0.007-0.015			[10]
<i>T. tonsurans</i> (25)	KET FLU ITR GRI TER	0.125-1.00 0.25-16.00 0.06-0.50 0.50-16.00 0.007-0.125	0.125 1.00 0.01 2.00 0.07	0.25 4.00 0.03 8.00 0.125	[8]
<i>T. soundanense</i> (15)	KET FLU ITR GRI TER	1.00-16.00 8.00-32.00 0.03-0.125 2.00-16.00 0.01-0.25	1.00 8.00 0.03 2.00 0.01	2.00 16.00 0.125 8.00 0.06	[8]
<i>T. mentagrophytes</i> (9)	KET FLU ITR GRI TER	0.06-4.00 0.06-64.00 0.01-4.00 0.125-4.00 0.007-0.5	0.05 2.00 0.01 0.50 0.07		[8]
<i>T. rubrum</i> (5)	KET FLU ITR TER	0.125-4.00 1.00-8.00 0.01-1.00 0.03-0.25			[20]
<i>Trichophyton spp.</i> (6)	POS RAV ITR FLU TER	0.007-1.0 0.015-8.0 0.015-8.0 0.125->64.0 0.03->2.0			[20]
<i>T. rubrum</i> (50)	KET FLU ITR GRI TER	<0.008->4.0 <0.06->32 <0.001-1 0.016-8 ≤0.001-1	0.25 4 0.008 0.5 0.002	1 32 0.5 1 0.008	[18]
<i>T. mentagrophytes</i> (3)	KET FLU ITR GRI TER	0.008-4 16-32 0.008-0.06 0.016-0.125 ≤0.001			[18]
<i>T. rubrum</i> (10)	EBR	0.03-0.125			[17]
<i>T. mentagrophytes</i> (10)	EBR	0.06-0.5			[17]
<i>T. interdigitale</i> (10)	EBR	0.125-0.5			[17]
<i>M. canis</i> (10)	EBR	0.03-2.0			[17]
<i>M. gypseum</i> (10)	EBR	0.03-0.125			[17]
<i>M. audouinii</i> (2)	KET FLU ITR GRI TER	0.01-0.50 0.50-2.00 0.01-0.125 0.25-1.00 0.01			[8]
<i>E. floccosum</i> (2)	KET FLU ITR GRI TER	0.01-1.00 0.50-2.00 0.01-0.50 1.00-2.00 0.01-0.125			[8]

KET – кетоназол; FLU – флуконазол; ITR – итраконазол;
 GRI – гризеофулин; TER – тербинафин; POS – посаконазол;
 RAV – равуконазол; EBR – еберконазол

KET – ketoconazole; FLU – fluconazole; ITR – itraconazole;
 GRI – griseofulvin; TER – terbinafin; POS – posaconazole;
 RAV – ravuconazole; EBR – eberconazole

је раста за сваки АМ. Ове вредности зависе од фармакокинетичких и биохемијских особина АМ, величине молекула, солубилности, дифузибилности у агар, а добијене су испитивањем великог броја клиничких изолата диск-дифузионом и дилуционом методом истовремено, на основу чега се конструише линија регресије за читавање МИК и врши тумачење [19]. Међу-

Табела 4. Контролни сојеви и методе испитивања осетљивости дерматофита на антимикотике

Table 4. Control strains and methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes

Контролни сојеви Control strains	Метода Method	Референца (документ) Reference (document)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> MRL 1957 ATCC MYA-4439	Микродилуциона Microdilution	[5] (CLSI)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40004	Микродилуциона Microdilution	[8, 11,12, 13]
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 40051	Микродилуциона Microdilution	[11, 12, 13]
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Микродилуциона Microdilution	[8, 11, 12, 13, 15]
	Диск-дифузиона Disk-diffusion	[17]
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Микродилуциона Microdilution	[8, 11,12, 13]
<i>Paecilomyces variotti</i> ATCC 36257	Диск-дифузиона Disk-diffusion	[14]
<i>Aspergillus fumigatus</i> NCPF 7099	Диск-дифузиона Disk-diffusion	[17]
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Диск-дифузиона Disk-diffusion	[18]

тим, за дерматофите ове вредности још нису дефинисане, па су потребна даља истраживања.

Е-тест

Он је једноставан за примену и представља методу избора за рутинско испитивање осетљивости гљива на АМ. Траке су импрегниране АМ чија се концентрација постепено смањује, а АМ током инкубације дифундује у подлогу и инхибира раст гљива. Вредност МИК је концентрација АМ која се добија на месту где пораст гљива „сече” траку Е-теста [16, 17].

ПРОБЛЕМИ ИСПИТИВАЊА ОСЕТЉИВОСТИ ДЕРМАТОФИТА

Референтна метода за испитивање осетљивости дерматофита на АМ је актуелан проблем који је делимично решен протоколима *E.DEF 9.1* и *M38-A2*. Многа истраживања се баве утицајем техничких фактора: величине и састава инокулума (хифе, микрокониције и макрокониције), врсте подлога, висине температуре, дужине инкубације.

Значајан фактор је величина и састав инокулума. Антропофилне врсте дерматофита тешко стварају конидије, посебно при понављаном култивисању, па је важно користити подлоге за стимулацију стварања конидија. Према документу *M38-A2*, користи се *PDA*, који се показао боље него *SDA* [3], осим у случају *T. rubrum* (користи се *oat-meal* агар) [5], а препорука је и пиринчани (енгл. *rice*) агар [9]. С обзиром на то да дерматофити стварају микрокониције и макрокониције, због разлике у величини конидија, састав инокулума мења

трансмисију, што утиче на вредност *CFU* и стандардизацију инокулума [3]. Ђелије са тањим зидом су осетљивије на АМ, па је важно да ли изолат ствара микрокониције или макрокониције. Поређењем инокулума *T. mentagrophytes* и *T. rubrum*, добијеног са филтрацијом и без ње, вредности МИК за инокулум с микроконицијама су биле од два до четири пута мање од вредности за инокулум који се састојао и од микрокониција и од хифа [12]. Такође, вредности МИК за инокулум са макроконицијама и деловима хифа су биле веће. Највеће вредности МИК за инокулум с макроконицијама су добијене за следеће врсте и АМ: *Microsporum (M) canis* – тербинафин, *M. cookei* – равуконазол, *M. gypseum* – клотримазол, *M. racemosum* – тербинафин, вориконазол и итраконазол, и *T. ajelloi* – итраконазол [9]. Род *Trichophyton* ретко ствара макрокониције, те ово нема значаја.

Различити инокулуми у истраживањима према протоколу *M38-A* (од $0,4 \times 10^4$ до 5×10^4 *CFU/ml*) и *EUCAST* за кваснице (од $0,5 \times 10^5$ до $2,5 \times 10^5$ *CFU/ml*) нису довели до значајне разлике у добијеним вредностима МИК [10]. Поређењем инокулума од $2,0 \times 10^3$ до $6,8 \times 10^3$ *CFU/ml* већег од $1,2 \times 10^4$ до $6,0 \times 10^4$ *CFU/ml* закључено је да је боље интерлабораторијско слагање МИК постигнуто када је коришћен инокулум од 10^4 *CFU/ml* [3]. Поређењем различитих величина инокулума (Е-тест) закључено је да инокулум од 10^3 *CFU/ml*, 10^4 *CFU/ml* и $0,5$ *MF* показује субоптималан раст у односу на инокулум од 1,0 и 2,0 *MF* [16]. Према протоколу *M38-A2*, величина инокулума за дерматофите је од 10^3 до 3×10^3 *CFU/ml* [5], а према протоколу *E.DEF 9.1*, величина инокулума за плесни је од 2×10^5 до 5×10^5 *CFU/ml* [7].

Испитивања осетљивости *in vitro* вршена су углавном на стандардној подлози *RPMI-1640*, док испитивања на другим подлогама нису дала задовољавајуће резултате. У једној студији поређене су три подлоге: *RPMI-1640*, Меквеј-Мортонова (*McVeigh-Morton - MVM*), хемијски дефинисан медијум, и Саборо декстрозни бујон (енгл. *Sabouraud dextrose broth - SDB*) [11]. Вредности МИК су се значајно разликовале у зависности од медијума, при чему су биле константно веће (обично 2-4 пута) када се користи *RPMI-1640*, него када се користи *MVM* или *SDB*. *MVM* се због своје прозирности показао незгодним за читавање МИК, а *SDB* је дао ниже вредности МИК, као и већу дискрепанцију у поређењу са *MVM* и *RPMI-1640*, због чега се не користи.

Различите температуре инкубације (микродилуционом методом) – 28°C и 35°C [11] или 30°C и 35°C [8] – не утичу значајно на резултате испитивања, али су бољи налази добијени при инкубацији од 28°C [1]. Температура од 30°C даје боље резултате на Е-тесту [16], а температура од 35°C је препоручена протоколима *M38-A2* и *E.DEF 9.1* [5, 7].

Дужина инкубације је значајна и препорука је да она траје најмање пет дана [8], односно седам када је поређена дужина инкубације три, седам и четрнаест дана [3]. У односу на четири, седам и десет дана, добијен је задовољавајући раст седмог дана, а вредности МИК при инкубацији од седам и десет дана су се значајно

разликовале [11]. Према протоколу *M38-A2*, инкубација за дерматофите траје најмање четири дана [5].

Поређењем визуелног и спектрофотометријског начина читавања нису нађене значајне разлике [10]. Граничне вредности МИК нису установљене, те је потребно даљим истраживањима утврдити корелацију између вредности МИК и клиничког исхода лечења инфекције изазване дерматофитима [5, 7]. Применом микродилуционе методе показала се најбоља ефикасност тербинафина [8, 11, 20], а следе остали АМ: тербинафин, посаконазол, равуконазол, итраконазол, флуконазол [20], односно тербинафин, итраконазол, кетоназол, гризеофулвин, флуконазол [8].

Проблем читавања зона инхибиције раста диск-дифузионом методом (утврђивање МИК за Е-тест) може да настане због неједнаке расподеле инокулума на плочи и спорог стварања колонија [2]. Начини читавања зона инхибиције раста дерматофита се разликују. Караца (*Karaca*) и Коч (*Koç*) [18] су микродилуционом и диск-дифузионом методом одређивали МИК као 50% инхибиције раста дерматофита за азоле и 80% инхибиције раста дерматофита за тербинафин и гризеофулвин. Поређењем активности АМ диск-дифузионом и микродилуционом методом добијене су сличне вредности (око 90% изолата је било осетљиво на вориконазол, око 80% на итраконазол, а око 45% на флуконазол). Најосетљивији је био *Epidermophyton*, а најмање су били осетљиви *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* и *M. gypseum* [14]. Друга студија на 59 изолата *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* и *T. tonsurans* (клотримазол, итраконазол и тербинафин) показала је да је тербинафин најефикаснији. Обе методе (диск-дифузија и микродилуција) су дале репродукбилне резултате, па аутори предлажу методу диск-дифузије за рутинску праксу [21]. Поређењем микродилуционе (*M38-A*) и диск-дифузионе методе (*NCCLS* из 1999. године) добијени су репродукбилни резултати за кетоназол, итраконазол, флуконазол, миконазол, оксиконазол, гризеофулвин и тербинафин, док за бифоназол, сулконазол и циклопроксоламин нису [18]. Међутим, неки аутори нису запазили добру корелацију за диск-дифузиону методу на агару *RPMI-1640* [17, 22], али су добили корелацију на антибиотском медијуму 3 (АМ3) [17]. Поређењем микродилуционе методе и Е-теста добијене су значајно веће вредности МИК за итраконазол Е-тестом него микродилуцијом [2]. У другој студији корелација Е-теста и микродилуције је била променљива: била је добра за амфотерицин Б (97%), итраконазол (80%) и кетоназол (77%), а лоша за флуконазол (27%) [23]. Испитивањем 46 сојева дерматофита диск-дифузионом методом, Е-тестом и микродилуционом методом (*M38-A*), корелација Е-теста са микродилуционом методом (± 2 дилуције) је била 45,6% за флуконазол, 19,5% за итраконазол и 52,1% за вориконазол [24]. И поред многих проблема у испитивању осетљивости, неки аутори предлажу микродилуционе тестове *Etest*[®], *Sensititre Yeast* или *One*[®] и за испитивање осетљивости, јер су доступни и једноставни за употребу, а резултати добијени њиховом применом репродукбилни [1].

УЛОГА РЕФЕРЕНТНЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ ЗА УЗРОЧНИКЕ МИКОЗА У ПРАЋЕЊУ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ДЕРМАТОФИТА

Због чињенице да су инфекције дерматофитима раширене у нашој општој популацији и да се тешко лече, циљ Националне референтне лабораторије за узрочнике микоза је да изврши увођење и ширу примену лабораторијских стандардних процедура и референтних метода за изоловање, препознавање и праћење резистенције, како гљива рода *Malassezia* [25], *Cryptococcus* [26, 27, 28] и *Candida* [29, 30, 31, 32], тако и плесни, а пре свега дерматофита. О резистенцији квасница код нас постоје бројни подаци [28-31], међутим, плесни су данас све значајнији проблем [33], а о њиховој резистенцији има мало података. У рутинском раду у дијагностичким лабораторијама могу да се користе Е-тест и диск-дифузна метода. Е-тест је скуп, али једноставан за извођење, а могу се одредити и вредности МИК. Диск-дифузна метода је јефтина, такође једноставна за примену, али се добијају само квалитативни резултати (S, I, R); међутим, значајно нижа цена може да утиче на њену ширу примену. Микродилуциона метода је скупа, али даје најрепродукцибилније резултате; постоје, с друге стране, проблеми у набавци АМ, компликована је за рутински рад, па се примењује само у референтним установама ради потврде резистенције и за испитивање неколико изолата истовремено.

Према препорукама европских центара, све резистентне сојеве гљива на основу диск-дифузије или Е-те-

ста треба потврдити референтном микродилуционом методом [4]. Због тога је неопходна примена контроле квалитета, како интерна, тако и екстерна (нпр. *United Kingdom National External Quality Assessment Service – UK NEQAS*), ради одговарајуће валидације и међулабораторијских поређења.

Нова организација лабораторија за медицинску микологију састоји се од формирања мреже лабораторија, што треба да омогући међулабораторијске студије и даљу стандардизацију метода за испитивање осетљивости дерматофита на АМ. На овај начин је могуће постићи репродукцибилност налаза уз праћење клиничке корелације (вредности МИК и клиничког исхода дерматофитоза). Значај нове организације је очекивано побољшање ефикасности лечења дерматофитоза код нас и уштеда трошкова, будући да лечење дерматофитоза траје месецима, па и годинама, због чега је скуп, а може бити неефикасно услед резистенције узрочника на АМ.

НАПОМЕНА

Рад је саопштен на Шестом конгресу медицинске микробиологије МИКРОМЕД 2008, који је одржан у Београду 11-14. јуна 2008. године.

Рад је финансијски помогло Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије (пројекат број ТР23009).

ЛИТЕРАТУРА

- Fernández-Torres B. Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos [dissertation]. Reus, Spain: Universitat Rovira i Virgili; 2005.
- Abdel Aal AM, Taha MM, El-Mashad N, El-Shabrawy W. Antifungal susceptibility testing: new trends. *Egyptian Dermatology Online Journal*. 2007; 3:1.
- Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Muñoz AJ, Esteban A, Inza I, Abarca L, et al. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(11):3999-4003.
- The University of Adelaide. Antifungal susceptibility testing. *Micology online* 2006; Available from: <http://www.micology.adelaide.edu.au>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chrystanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document E.Def 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:398-405.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chrystanthou E, et al. EUCAST definitive document E.Def 9.1: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); 2008.
- Nweze EI, Ogonna CC, Okafor JI. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(5):293-5.
- Fernández-Torres B, Inza I, Guarro J. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia (letter). *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(10):3371-2.
- Barros MES, Santos DA, Hamdan JS. In vitro methods for antifungal susceptibility testing of Trichophyton spp. *Mycol Res*. 2006; 110(Pt 11):1355-60.
- Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for Trichophyton rubrum. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4):1917-20.
- Santos DA, Barros MES, Hamdan JS. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(1):98-101.
- da Silva Barros MES, de Assis Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Med Microbiol*. 2007; 56(Pt 4):514-8.
- Carrillo-Muñoz AJ, Cárdenes CD, Carrillo-Orive B, Rodríguez V, Valle O, Casals JB, et al. In vitro antifungal activity of voriconazole against dermatophytes and superficial isolates of Scopulariopsis brevicaulis. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22:110-3.
- Araújo CR, Miranda KC, Fernandes OFL, Soares AJ, Silva MRR. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brasil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009; 51(1):9-12.
- Lamers SA, Curfs IM, Mouton JW, Meis JF. Standardisation of the E-test for antifungal susceptibility testing for dermatophytes. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Sep 14-17; 43: abstract no. M-1218.

20. Fernández-Torres B, Inza I, Guarro J. Evaluation of disk diffusion method for determining eberconazole susceptibility of dermatophytes and influence of culture medium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5):2116-8.
21. Karaca N, Koç AN. In vitro susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk-diffusion and reference broth-dilution methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48:259-64.
22. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. In: Hindler JF, Jorgensen JH, editors. *Antimicrobial Susceptibility Testing.* 3rd ed. St. Louis: Elsevier; 2007. p. 329-30.
23. Gupta AK, Kohli Y, Batra R. In vitro activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. *Med Mycol.* 2005; 43(2):179-85.
24. Esteban A, Abarca ML, Cabañes FJ. Comparasion of disk diffusion method and microdilution method for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol.* 2005; 43(1):61-6.
25. Singh J, Zaman M, Gupta AK. Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol.* 2007; 45(7):595-602.
26. Fernández-Torres B, Carrillo-Muñoz A, Ortoneda M, Pujol I, Pastor FJ, Guarro J. Interlaboratory evaluation of the E-test for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol.* 2003; 41(2):125-30.
27. Méndez CC, Serrano MC, Valverde A, Pemán J, Almeida C, Martín-Mazuelos E. Comparison of E-Test(R), disk diffusion and a modified CLSI broth microdilution (M 38-A) method for in vitro testing of itraconazole, fluconazole and voriconazole against dermatophytes. *Med Mycol.* 2008; 46(2):119-23.
28. Arsić-Arsenijević V, Milobratović D, Džamić A, Mitrović S, Radonjić I, Petković Lj, et al. Prvi slučaj izolacije *Malassezia globosa* kod nas. *Srp Arh Celok Lek.* 2003; 131(11-12):454-7.
29. Arsić V, Kranjčić-Zec I, Mitrović S, Ramić Z, Mostarica-Stojković M. The role of CD4+ T cells in rat cryptococcosis. *J Chemother.* 1993; 5(Suppl 1):422-3.
30. Arsić V, Mitrović S, Džamić A, Kranjčić-Zec I, Milobratović D, Mostarica-Stojković M. Direct anticryptococcal activity of rat T cells. In: Lukić LM, Čolić M, Mostarica Stojković M, Čuperlović K, editors. *Immunoregulation in Health and Disease.* Belgrade: Academic Press; 1997. p.406-412.
31. Arsić V, Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Džamić A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A or D resistant to 5-fluorocytosine. *J Chemother.* 1995; 7(Suppl 4):90-2.
32. Mitrović S, Džamić A, Arsić-Arsenijević V, Radonjić I, Kranjčić-Zec I. Rezistencija gljiva na antimikotike – mehanizmi nastanka, učestalost, prevencija i kontrola rezistencije. *Srp Arh Celok Lek.* 2007; 135(7-8):486-94.
33. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsić V, Berger-Jekić O, Džamić A. Susceptibility in vitro to antifungal agents of strains of yeasts isolated from blood cultures of neutropenic patients with leukemia. *J Chemoter.* 1993; 5(Suppl 1):428-30.
34. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Marović M, Šćepan Lj, Arsić V. Disk agar diffusion testing of yeasts-effect of culture media. *J Chemoter.* 1991; 3(Suppl 4):474-6.
35. Arsić-Arsenijević V, Arsović N, Džamić A, Trpković A, Kranjčić-Zec I, Djukić V. Protease activities of *Candida* spp. isolated from immunocompetent patients with otomycosis. *Jugoslavenska medicinska biohemija.* 2004; 23:1-4.
36. Pekić S, Arsić-Arsenijević V, Skender-Gazibara M, Milojević T, Pendjer I, Stojanović M, et al. What lurks in the sellar? *Lancet.* 2010; 375(9712):432.

Antimycotics Susceptibility Testing of Dermatophytes

Valentina Arsić-Arsenijević¹, Milena Branković², Ivana Čolović¹, Aleksandar Džamić¹, Sanja Mitrović¹, Eleonora Ratkov¹

¹Medical Mycology Reference Laboratory, Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Microbiology Laboratory, General Hospital, Užice, Serbia

SUMMARY

Dermatophytes are moulds that produce infections of the skin, hair and nails of humans and animals. The most common forms among these infections are onychomycosis and tinea pedis affecting 20% of world population. These infections are usually chronic. The treatment of dermatophytoses tends to be prolonged partly because available treatments are not very effective. Antifungal drug consumption and public health expenditure are high worldwide, as well as in Serbia. For adequate therapy, it is necessary to prove infection by isolation of dermatophytes and to test the antifungal susceptibility of isolates. Susceptibility testing is important for the resistance monitoring, epidemiological research and to compare in vitro activities of new antifungal agents. The diffusion and dilution methods of susceptibility tests are used, and technical issues of importance for the proper performance and interpretation of

test results are published in the document E.DEF 9.1 (EUCAST) and M38-A2 (CLSI). The aim of our paper is to promptly inform the public about technical achievements in this area, as well as the new organization of laboratory for medical mycology in our country. The formation of laboratory networks coordinated by the National Reference Laboratory for the cause of mycosis need to enable interlaboratory studies and further standardization of methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes, reproducibility of tests and clinical correlation monitoring (MIK values and clinical outcome of dermatophytosis). The importance of the new organization is expected efficient improvement in the dermatophytosis therapy at home, better quality of patient's life and the reduction of the cost of treatment.

Keywords: dermatophytes; susceptibility testing; documents E.DEF 9.1 and M38-A2

Примљен • Received: 24/07/2009

Прихваћен • Accepted: 20/11/2009