

SENSIBILITÉ VIS-À-VIS DE L'ISAVUCONAZOLE DES SOUCHES DE *CANDIDA* AVEC CALCUL DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE EN UTILISANT LA TECHNIQUE EUCAST

MERADJI A⁽¹⁾, MOSBAH N⁽²⁾, MERADJI M⁽³⁾, BENMEZDADA⁽¹⁾, MOULAHM T⁽¹⁾.

1) Service de Parasitologie et Mycologie Médicales, CHU Constantine, Faculté de Médecine, Université Salah Bounider Constantine 3 (UC3).

2) Service de Réanimation Médicale, CHU Sétif, faculté de médecine, université Ferhat Abbas Sétif 1 (UFASI).

3) Laboratoire Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1).

E-mail: Meradji A : assia.meradji@yahoo.fr ; Mosbah N : mosbahnabil05@gmail.com ; Meradji M : meriem.meradji@umc.edu.dz ; Benmezdada A : benmezdada@gmail.com ; Moulahem T : tmoulahem@gmail.com

RÉSUMÉ :

L'isavuconazole est un nouveau antifongique triazolé qui a un spectre d'action très large et qui possède une excellente activité *in vitro* contre les champignons filamenteux et levuriformes. L'utilisation clinique de l'isavuconazole pour le traitement des candidoses invasives n'a pas été signalée. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité des levures du *Candida* isolés à partir de patients hospitalisés dans les Services de Réanimation du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Sétif à l'isavuconazole avec calcul de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en utilisant la technique de référence européenne «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (EUCAST). 37 souches de *Candida* (C) isolées à partir d'hémocultures, de cathéters et des urines sont utilisées pour les tests de sensibilité à l'isavuconazole. Les 16 souches de *C.albicans* ont présenté une CMI très faible (CMI = 0.015). Les CMI de *C.glabrata* varient de 0.06 à 0.25 µg/ml. *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* et *C.dubliniensis* ont présenté une CMI très faible (CMI = 0.015 µg/ml).

Mots clés : Isavuconazole, *Candida. spp*, Candidémie, EUCAST, Concentration minimale inhibitrice.

ABSTRACT: DETERMINATION OF ISAVUCONAZOLE SUSCEPTIBILITY OF CANDIDA SOECIES BY THE EUCAST METHOD.

Isavuconazole is a new triazole antifungal agent with a very broad spectrum of action and excellent *in vitro* activity against filamentous fungi and yeast. Clinical use of isavuconazole for the treatment of invasive candidiasis has not been reported. The objective of this study is to evaluate the sensitivity of *candida* yeasts isolated from patients hospitalized in the intensive care unit of the Sétif University Hospital to isavuconazole with calculation of minimal inhibitory concentration using the European reference technique EUCAST. 37 *Candida* strains isolated from blood cultures, catheters and urine are used for isavuconazole sensitivity testing. The 16 strains of *C.albicans* showed a very low MIC (MIC = 0.015) and the MIC of *C.glabrata* ranged from 0.06 to 0.25 µg/ml. *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* and *C.dubliniensis* showed a very low MIC (MIC = 0.015 µg/ml).

Key words: Isavuconazole, *Candida. spp*, Candidemia, EUCAST, Minimal inhibitory concentration.

INTRODUCTION

L'incidence des infections fongiques nosocomiales a augmenté de façon considérable ces 30 dernières années [1]. Les candidoses restent les infections fongiques les plus fréquemment diagnostiquées et représentent 7% des infections nosocomiales. Elles sont responsables d'une augmentation de la morbi-mortalité, plus particulièrement en réanimation. Malgré les progrès réalisés dans le domaine des traitements antifongiques, la mortalité liée aux candidoses invasives est de 40% [2]. Quatre classes d'antifongiques sont disponibles pour le traitement des candidémies : les polyènes, les triazolés, les échinocandines et la flucytosine.

L'isavuconazole est un nouveau antifongique triazolé qui a un spectre d'action très large et qui possède une excellente activité *in vitro* contre les champignons filamenteux et levuriformes. Son activité fongicide repose sur le blocage de la synthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane des cellules fongiques. Il a une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) européenne dans le traitement de l'aspergillose invasive et de la mucormycose chez les patients pour lesquels le traitement par amphotéricine B est inapproprié [3]. L'utilisation clinique de l'isavuconazole pour le traitement des candidoses invasives n'a pas été signalée, cette molécule est en cours d'essais pour le traitement des candidémies. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité des levures du genre *Candida* isolées à partir de patients hospitalisés dans les services de réanimation du CHU de Sétif à l'isavuconazole avec calcul de la CMI en utilisant la technique de référence européenne EUCAST.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Les souches étudiées

Les espèces de *Candida* utilisées pour les tests de sensibilité à l'isavuconazole sont des souches isolées à partir d'hémocultures, de cathéters, d'urines, de liquide de dialyse et de sondes urinaires. Ces espèces ont été isolées chez des patients hospitalisés dans les services de réanimation du CHU de Sétif durant la période du 1er novembre 2016 au 30 novembre 2017.

Plusieurs espèces ont été étudiées : *C.albicans* (16 espèces), *C.glabrata* (06 espèces), *C.parapsilosis* (07 espèces), *C.tropicalis* (05 espèces), *C.dubliniensis* (02 espèces) et *C.pelliculosa* (01 espèce).

2. Les souches de références

Deux souches de référence ont été utilisées : *C. krusei* ATCC 6258 et *C.parapsilosis* ATCC 22019. Elles sont recommandées par l'EUCAST pour l'étude de la sensibilité aux antifongiques [4,5].

3. Sensibilité à l'isavuconazole

Les tests de sensibilité à l'isavuconazole ont été réalisés par la technique de microdilution sur microplaque selon le protocole standard de l'EUCAST [4-6], dans le laboratoire des maladies infectieuses, Hôpital Gregorio Maranon, Madrid, Espagne.

La solution d'isavuconazole à tester aux dilutions souhaitées a été préparée dans le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640, qui contient le L- glutamine et le glucose à 2%. Le milieu a été tamponné avec l'acide 3 N-morpholino propane sulfonique (MOPS) à une concentration finale de 0.165 mol/L. Le pH du milieu a été ajusté à 7 (6.9-7.1) avec la soude 10 mol/L et préparé en double concentration pour permettre une dilution de 50%, une fois l'inoculum fongique ajouté.

3.1. Préparation de la gamme de dilution de l'isavuconazole

La gamme des concentrations testées dépendra de l'antifon-

gique à tester. Ces concentrations doivent encadrer les concentrations seuils et les valeurs de CMI attendues pour les deux souches de contrôle qualité. Elles doivent également correspondre à des taux plasmatiques efficaces. Selon les recommandations de l'EUCAST, la gamme de concentration finale utilisée pour l'isavuconazole est de 0.015 à 8 mg/L.

La solution mère a été préparée à des concentrations au moins 200 fois supérieure à la concentration la plus élevée à tester. Le solvant utilisé est le diméthylsulfoxyde (DMSO).

La gamme de dilution de 0.0312 à 16 mg/L a été obtenue par dilution successive de la solution mère à 16000 mg/L. Pour chaque concentration finale, 100µl ont été distribués dans les puits des 10 premières colonnes d'une plaque de microtitration à 96 puits. 100µL de RPMI 1640 ont été distribués dans les cupules de la 11^{ème} et la 12^{ème} colonnes. Les premières correspondent au témoin de croissance des cultures ; il sera ajouté 100µL de la suspension de levures. Les dernières correspondent au témoin de stérilité du milieu ; dans ces cupules, seront distribuées 100µL d'eau distillée stérile (même eau utilisée pour la préparation de l'inoculum).

L'antifongique étant dilué au 1/2 dans la plaque lorsque l'on ajoute l'inoculum, la gamme des concentrations finales lors de l'essai est de 0.015 à 8mg/L.

3.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum de levures a été préparé à partir de cinq colonies d'une culture de la souche datant de 18 à 24 heures. Les colonies ont été mises en suspension dans 3 ml d'eau distillée stérile. La suspension a été ajustée à une turbidité Mc Farland de 0.5, en utilisant un néphélomètre (Dinko Instruments, Spain), ce qui correspond à une concentration de 1-5 x 10⁶ cellules /ml. Ensuite, une dilution à 1/10 de l'inoculum dans de l'eau distillée stérile a été réalisée pour obtenir une concentration à 1-5 x 10⁵ cellules/ml. 100 ml de l'inoculum ont été déposés dans chaque puit des colonnes 1 à 11, on obtient une concentration fongique finale de 0.5 à 2.5 x 10⁵ cellules/ml.

L'incubation des plaques a été faite à 35 ± 2 °C pendant 24 ± 2 heures. Si l'absorbance est inférieur ou égal à 0.2, une 2^{ème} incubation de la plaque pendant 12 à 24 heures sera réalisée.

Les plaques de microtitrations ont été lues à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 530 nm. Le logiciel associé au spectrophotomètre permet de soustraire le blanc qui est la moyenne des densités optiques (DO) réalisées sur l'ensemble des cupules de la dernière ligne (témoin de stérilité du milieu).

La lecture de la CMI de l'isavuconazole correspond à la cupule où la DO est de 50% de la DO du témoin de pousse. Ceci correspond à 50% d'inhibition de pousse du témoin. La souche a été classée dans une des trois catégories ; sensible, sensibilité intermédiaire ou résistante en fonction des valeurs seuils publiées par le comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens.

RÉSULTATS

37 souches de *Candida* isolées à partir d'hémocultures, de cathéters et des urines ont été utilisées pour les tests de sensibilité à l'isavuconazole. Les résultats des CMI sont représentés dans le tableau I.

- Les 16 souches de *C.albicans* ont présenté une CMI très faible (CMI = 0.015).

- Les CMI de *C. glabrata* variaient de 0.06 à 0.25µg/ml.

C.tropicalis, *C. parapsilosis* et *C.dubliniensis* ont présenté une CMI très faible (CMI = 0.015µg/ml).

- La CMI de *C.pelliculosa* était de 0.03µg/ml.

Tableau I. Sensibilité des souches de *Candida* vis-à-vis de l'isavuconazole.

Espèce de <i>Candida</i> (nombre d'isolats)	Nombre d'isolats avec une CMI (µg/ml) de :				
	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25
<i>C.albicans</i> (16)	1				
<i>C.tropicalis</i> (5)	5				
<i>C.glabrata</i> (6)			2	2	2
<i>C.parapsilosis</i> (7)	7				
<i>C.dubliniensis</i> (2)	2				
<i>C.pelliculosa</i> (1)		1			

DISCUSSION

La détermination de la sensibilité aux antifongiques des levures se fait par la mesure de la CMI qui correspond à la plus faible concentration d'antifongique permettant d'inhiber totalement ou partiellement (pour certains antifongiques) la pousse d'un agent fongique.

L'isavuconazole est un nouveau antifongique triazolé, actuellement, il est utilisé pour le traitement de l'aspergillose invasive et la mucormycose [7, 8]. L'activité *in vitro* de l'isavuconazole contre les levures a été rapportée.

Une vaste étude multicentrique comparant l'isavuconazole à la caspofungine pour le traitement des candidémies et des candidoses invasives suggère que l'isavuconazole ne répond pas aux critères de non infériorité, mais son efficacité *in vitro* sur les levures du genre *Candida* a été démontrée [9]. Les CMI retrouvées dans cette étude sont comparables aux CMI rapportées par d'autres auteurs ; en effet, l'isavuconazole est très actif contre *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* et *C.dubliniensis*. *C.glabrata* qui est connue comme étant moins sensible aux triazolés, a montré des CMI plus élevées que les autres espèces [9,10]. Dans une étude réalisée en France sur une large collection de levures responsables de mycoses invasives (1457 souches), l'isavuconazole était actif contre les cinq espèces de *Candida* les plus fréquemment isolées (CMI₉₀ ≤ 0.5 mg/L pour *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* et *C.krusei*) et également contre la majorité des espèces rares dont *C.kefyr* et *C.lusitaniae*. Selon les résultats de la même étude, quelques isolats de *C.albicans* (0.7%), *C.glabrata* (2.7%), *C.tropicalis* (1%) et *C.parapsilosis* (0.8%) ont présenté des CMI ≥ 4mg/L, mais toutes ces espèces étaient également résistantes au fluconazole [10]. Une autre étude espagnole a révélé que *C.alcibans* était l'espèce la plus sensible, suivie de *C.parapsilosis* et de *C.tropicalis*, tandis que des CMI plus élevées ont été observées avec les deux espèces *C.glabrata* et *C.krusei* [11].

CONCLUSION

La résistance acquise des *Candida spp.* aux antifongiques est rare et ne possède pas la même ampleur que celle des bactéries vis-à-vis des antibiotiques du fait de sa faible prévalence. Bien que l'isavuconazole n'ait pas d'indication dans le traitement des candidoses invasives, cette molécule a montré une bonne activité contre les espèces de *Candida* testées.

REMERCIEMENT :

Une partie de ce travail a été réalisée dans le laboratoire des maladies infectieuses, Hôpital Gregorio Maranon, Madrid, Espagne, dirigé par Professeur Jesus Guinea à qui j'adresse ma gratitude et mes remerciements.

CONFLITS D'INTÉRÊT : Aucun.

DATE D'ENVOI : 09/07/2021.

DATE D'ACCEPTATION : 10/09/2021.

DATE DE PUBLICATION : 24/03/2022.

RÉFÉRENCES

1. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. N Engl J Med. 2015; 373(15): 1445-56.
2. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. Clin Infect Dis. 2012; 54.
3. European Medicines Agency. Cresemba. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/cresemba>.
4. AFST. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008; 14(4): 398-405.
5. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012; 18(7): E246-7.
6. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida spp.* and triazoles against *Aspergillus spp.* Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2013; 16(6): 81-95.
7. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. Haematologica. 2017; 102(3): 433-44.
8. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clinical Microbiology and Infection. 2018; 24: e1-e38.
9. Kullberg BJ, Viscoli C, Pappas PG, Vazquez J, Ostrosky-Zeichner L, Rotstein C, et al. Isavuconazole Versus Caspofungin in the Treatment of Candidemia and Other Invasive Candida Infections: The ACTIVE Trial. Clin Infect Dis. 2019; 68(12): 1981-9.
10. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boulié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O. Isavuconazole MIC distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015–2017). Clinical Microbiology and Infection. 2019; 25(5): 634.e1-e4.
11. Marcos-Zambrano LJ, Gomez A, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, Munoz P, Escibano P, et al. Isavuconazole is highly active *in vitro* against *Candida* species isolates but shows trailing effect. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2018.