

## EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC IN VITRO AL MXP-4509 FATA DE LEVURI UTILIZAND METODA STANDARDIZATA EUCAST DEF. 7.1

### MATERIAL SI METODA

Procedura de testare utilizată a respectat standardul adoptat de European Committee of Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST Def. 7.1). Testul se efectuează în microplăci de titrare, folosind diluții binare descrescânde de antifungic.

Mediul de testare recomandat este RPMI 1640 (cu glutamină, un indicator de pH și fara bicarbonat), suplimentat cu glucoză la o concentrație finală de 2%). Utilizarea unei concentrații mai mari de glucoză conduce la o creștere mai bună a levurilor și facilitează lectura. Concentrațiilor minime inhibitorii. Utilizarea MOPS ( acid 3-(N-morpholino) propanesulfonic) la o concentrație finală de 0.165mol/L menține pH-ul optim de-a lungul incubării.

Mediul RPMI cu 2% glucoză (Tabelul 1) se prepară după cum urmează:

1. Se adauga componentele din Tabelul 1 în 600 ml apă distilată
2. Se agită până la completa dizolvare a componentelor
3. În timpul agitării se ajustează pH-ul la valoarea 7, la 25°C, cu o soluție 1 N de Hidroxid de sodiu.
4. Se adaugă apă până la volumul de un litru.
5. Se sterilizează cu ajutorul unui filtru cu porii de 0,22μm.
6. Stocarea se face la 4° C.
7. Pentru testarea calității se folosește o probă din mediul sterilizat pentru un control cu o tulpina de referință și se retestează pH-ul.

Tabelul 1

Componenții mediului RPMI 2% glucoză

<b>Component</b>	<b>Concentrație x 2</b>
Apă distilată	900mL
RPMI 1640	20.8g
MOPS	69.06g
Glucoză	36g



Sterilizarea prin filtrare a mediului RPMI 1640

### **Agenții antifungici. Pregătirea soluției stoc.**

S-au testat comparativ trei antifungice din categoria triazolilor: MXP-4509, voriconazol și fluconazol. Pulberile s-au păstrat în containere sigilate, la -20°C.

Soluțiile stoc de antifungice au fost preparate ținând cont de potența lotului. Cantitatea de pulbere necesară s-a calculat după următoarele formule:

$$\text{Cantitatea de pulbere (g)} = \frac{\text{Volumul (L)} \times \text{Concentrația (mg/L)}}{\text{Potența (mg/g)}}$$

$$\text{Volumul (mg/L)} = \frac{\text{Greutatea (g)} \times \text{Potența (mg/g)}}{\text{Concentrația (mg/L)}}$$

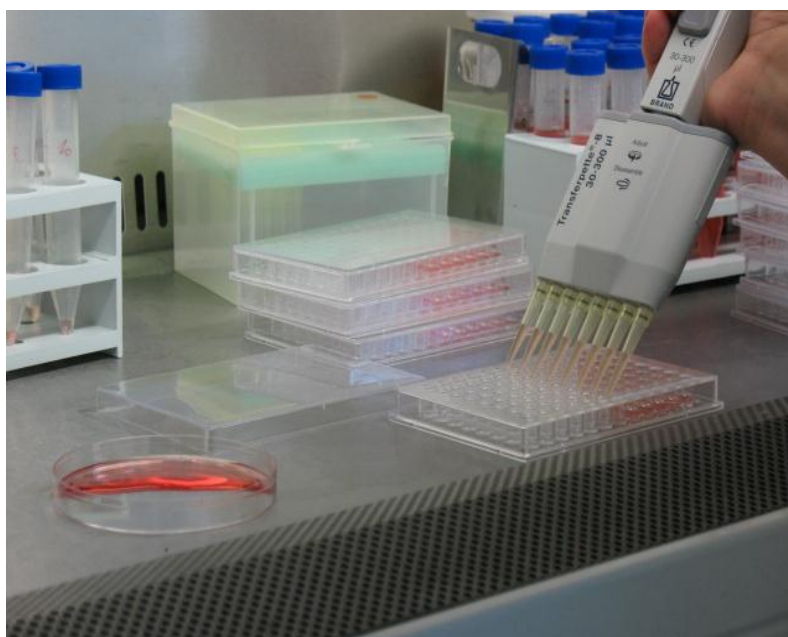
Se cântărește pulberea de antifungic la o balanță analitică care a fost calibrată cu două zecimale. Se recomandă să se cântărească minim 100 mg. Pulberile au fost solubilizate în apă distilată sterilă, obținându-se o concentrație finală de 200 ori mai mare decât cea finală.

### **Prepararea soluțiilor de lucru**

Gama de concentrații testate depinde de antifungic și trebuie să cuprindă obligatoriu punctul de ruptură (breakpoint) atunci când acesta există, precum și valorile preconizate pentru tulpinile de control. Intervalele de concentrație obținute în final după adăugarea inoculului sunt: 64 – 0,125 mg/L pt. fluconazol, respectiv 8 – 0,0156 mg/L pt. MXP-4509 și voriconazol.

### **Pregătirea microplăcilor**

Se folosesc placi sterile din plastic, de unică folosință, care conțin 96 de godeuri cu fund plat și o capacitate de aproximativ 300  $\mu\text{L}$ . Se repartizează în fiecare coloană de la 1-10 câte 100  $\mu\text{L}$  din fiecare tub care conține concentrația corespunzătoare de antifungic. În final, coloanele 1-10 conțin 100  $\mu\text{L}$  antifungic în mediu dublu concentrat cu 1% solvent, iar coloanele 11 și 12 doar mediul de cultura dublu concentrat.



Repartizarea diluțiilor de antifungic în godeurile microplăcii

### **Prepararea inoculului**

Standardizarea inoculului este esențială pentru testele de sensibilitate la antifungice. Inoculul final trebuie să conțină între  $1 \times 10^5$  și  $2.5 \times 10^5$  UFC/mL.

Din subcultura obținută pe Agar Sabouraud, se prepară o suspensie în apă distilată sterilă până la o densitate de 0,5 McFarland (cca.  $2.5 \times 10^6$  UFC/ml). Urmează o a doua diluție tot cu apă distilată sterilă de 1:10, obținându-se inoculul final. Au fost testate un număr de 273 tulpini levurice.

### **Inocularea microplăcilor**

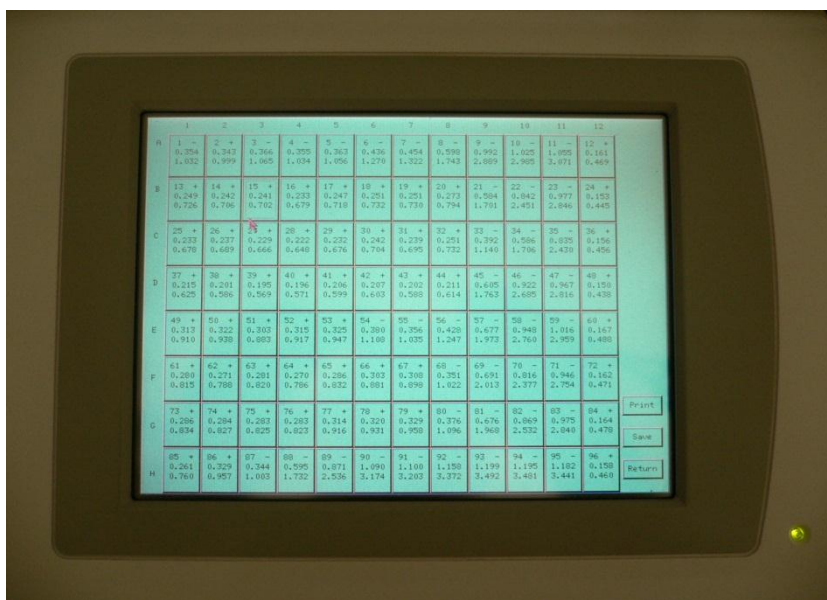
Inocularea se recomandă să se efectueze în maxim 30 minute de la standardizarea suspensiei pentru a menține levurile viabile. Se inoculează fiecare godeu cu 100  $\mu\text{L}$  din suspensia de levuri. Incubarea plăcilor inoculate se realizează fără agitare, la 35-37°C, timp de 24 ore. În unele cazuri o nouă perioadă de incubație de 24 ore poate fi necesară pentru obținerea unei creșteri adecvate în godeurile de control, însă o incubație mai lungă nu este recomandată.

## Citirea și interpretarea rezultatelor

Rezultatul final s-a citit prin folosirea unui spectrofotometru MR-96 (Mindray-China), înregistrându-se absorbanta fiecărui godeu la 405 nm. CMI-ul tuturor antifungicelor azolice se calculează ca fiind cea mai mică concentrație care inhibă cu 50% creșterea (comparativ cu martorul pozitiv din godeul 11).



Cititorul de microplaci MR-96 (Mindray-China)



Display-ul spectrofotometrului în timpul citirii rezultatelor

**NOVATEC**  
IMMUNDIAGNOSTICA GMBH

Test: EUCAST 7.1 Lot/Chargen-Bez.: MXP 4509 / RPM 1640

Operator/Untersucher: Date/Datum: 03.03.2011 (24 h)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,197	0,186	0,175	0,181	0,165	0,190	0,170	0,256	0,203	0,386	0,407	0,150
B	0,171	0,155	0,145	0,248	0,130	0,133	0,144	0,135	0,152	0,360	0,548	0,098
C	0,153	0,143	0,137	0,134	0,136	0,127	0,136	0,128	0,198	0,271	0,336	0,112
D	0,180	0,161	0,150	0,157	0,157	0,158	0,146	0,155	0,160	0,255	0,477	0,378
E	0,193	0,164	0,170	0,183	0,173	0,158	0,146	0,155	0,160	0,519	0,497	0,152
F	0,148	0,146	0,150	0,158	0,139	0,150	0,152	0,157	0,155	0,260	0,458	0,139
G	0,163	0,171	0,163	0,157	0,159	0,159	0,171	0,167	0,189	0,361	0,446	0,149
H	0,185	0,199	0,209	0,218	0,234	0,295	0,292	0,283	0,326	0,362	0,359	0,166

Notarea CMI-urilor în fișele de înregistrare a datelor

## Rezultate

Sinteza rezultatelor este prezentată în Tabelul 2.

Tabel 2

Efectul antifungic al celor trei azoli – sinteza datelor

Antifungicul	Intervalul concentrațiilor (µg/ml)	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Fluconazol	>64-0.125	0.5	32
Voriconazol	>8-0.0156	0.0156	0,25
MXP 4509	>8-0.0156	0.0312	0,25

CMI – concentrația minimă inhibitorie  
(50 – pt. 50% dintre tulpini, 90 – pt. 90% dintre tulpini)

Rezultatele detaliate ale testărilor sunt ilustrate în Tabelul 3. Distribuția concentrațiilor minime inhibitorii ale MXP-4509 a fost similară cu cea a voriconazolului (CMI<sub>50</sub>: 0.0312 mg/L versus 0.0156 mg/L; CMI<sub>90</sub>: 0.25 mg/L versus 0.25 mg/L), dar semnificativ diferită față de cea a fluconazolului (CMI<sub>50</sub>: 0.0312 mg/L versus 0.5 mg/L; CMI<sub>90</sub>: 0.25 mg/L versus 32 mg/L). Noul triazol MXP-4509 dovedește o bună activitate antifungică *in vitro* față de levuri din diferite genuri și specii, ceea ce suscită un interes pentru continuarea testărilor de eficiență *in vivo*.

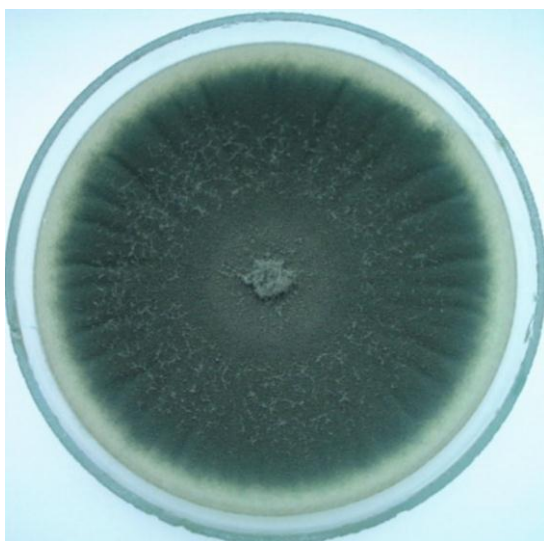
Activitatea in vitro a fluconazolului, voriconazolului și noului compus triazolic MXP-4509 față de cele 273 tulpini levurice testate

Specia (nr. de izolate)	Agentul antifungic	CMI (mg/L)			
		Intervalul conc.	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Media geometrică
C. albicans (n=84)	FCA	0.125-0.5	0.25	0.5	0.205
	VOR	0.0156-0.0312	0.0156	0.0156	0.0159
	MXP	0.0156-0.0625	0.0156	0.0312	0.0194
C. parapsilosis (n=90)	FCA	0.125-2	0.5	1	0.535
	VOR	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156
	MXP	0.0156-0.25	0.0625	0.0625	0.0484
C. glabrata (n=27)	FCA	0.25-64	32	64	17.281
	VOR	0.0156-8	0.125	8	0.340
	MXP	0.0156-8	0.125	4	0.231
C. pelliculosa (n=12)	FCA	2-8	4	ND	4
	VOR	0.0312-0.125	0.0625	ND	0.074
	MXP	0.0625-0.5	0.0625	ND	0.105
C. krusei (n=12)	FCA	16-64	32	ND	38.054
	VOR	0.25-0.5	0.25	ND	0.353
	MXP	0.25-1	0.5	ND	0.500
C. guilliermondii (n=9)	FCA	0.5-4	0.5	ND	1
	VOR	0.0156-0.0312	0.0156	ND	0.0196
	MXP	0.0625-0.25	0.25	ND	0.157
C. lusitaniae (n=6)	FCA	0.125-1	ND	ND	0.353
	VOR	0.0156	ND	ND	0.0156
	MXP	0.0156	ND	ND	0.0156
C. tropicalis (n=6)	FCA	0.5-64	ND	ND	5.656
	VOR	0.0156-2	ND	ND	0.176
	MXP	0.0625-8	ND	ND	0.707
S. cerevisiae (n=6)	FCA	4-16	ND	ND	8
	VOR	0.0156-0.0625	ND	ND	0.0312
	MXP	0.0312-0.0625	ND	ND	0.0441
T. asahii (n=6)	FCA	4-32	ND	ND	11.313
	VOR	0.0156-0.25	ND	ND	0.0624
	MXP	0.0312	ND	ND	0.0312
C. dubliniensis (n=3)	FCA	0.0625-0.25	ND	ND	0.125
	VOR	0.0156	ND	ND	0.0156
	MXP	0.0156	ND	ND	0.0156
C. intermedia (n=3)	FCA	0.125-0.5	ND	ND	0.25
	VOR	0.0156	ND	ND	0.0156
	MXP	0.0156-0.0625	ND	ND	0.0312
C. neoformans (n=3)	FCA	2-8	ND	ND	4
	VOR	0.0156	ND	ND	0.0156
	MXP	0.0625-0.25	ND	ND	0.125
G. capitatum (n=3)	FCA	4	ND	ND	4
	VOR	0.0156-0.0625	ND	ND	0.0312
	MXP	0.0156	ND	ND	0.0156
R. mucilaginosa (n=3)	FCA	16-64	ND	ND	32
	VOR	0.5-2	ND	ND	1
	MXP	8	ND	ND	8

## EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC IN VITRO AL MXP-4509 FATA DE FUNGI FILAMENTOSI UTILIZAND METODA STANDARDIZATA EUCAST DEF. 9.1

### MATERIAL SI METODA

Au fost studiate 24 tulpini aparținând genului *Aspergillus*. Ele provin din colecția laboratorului, fiind izolate de la pacienții cu afecțiuni micotice : afecțiuni ale urechii externe, ale pielii, traumatisme, aspergiloză pulmonară invazivă. Din numărul total de 24 de tulpini, 2/3 au fost reprezentate de *Aspergillus fumigatus* și 1/3 de *Aspergillus flavus*.



Colonie de *Aspergillus fumigatus*



Colonii de *Aspergillus flavus*

Singura diferență față de metoda anterioară este legată de prepararea inoculului și citirea rezultatelor (vizuală). Astfel, prepararea inoculului se realizează din culturi proaspete și mature

(2-5 zile), obținute pe Agar cu extract de cartof și glucoză. Se acoperă coloniile cu aproximativ 5 ml apa sterilă suplimentată cu 0.1% Tween 20. Apoi se detașează cu grijă conidiile cu ajutorul unui tampon steril și se transferă cu ajutorul unei pipete într-un tub steril. Se omogenizează suspensia timp de 15 secunde la un vortex la 2000 rotații pe minut. Suspensiile realizate se etalonează într-o cameră de numărare hemocitometrică. Inoculul trebuie examinat pentru descoperirea diverselor hife și aglomerări de conidii. Dacă un număr semnificativ de hife este detectat ( $\geq 5\%$  din structurile fungice), se transferă 5 mL de suspensie într-o seringă sterilă la care este atașat un filtru steril cu un diametru al porilor de  $11\mu\text{m}$ . Inoculul astfel obținut se colectează și se transferă într-un tub steril. Acest pas este necesar pentru speciile de *Aspergillus*, eliminând hifele și obținându-se o suspensie omogenă, formată numai din spori. În cazul în care se observa după mixare pâlcuri de hife se poate agita din nou pentru 15 secunde. Această operațiune se repetă ori de câte ori este nevoie. Se ajustează suspensia cu apă distilată sterilă până la o concentrație de  $2-5 \times 10^6$  UFC/ml. Urmează o a doua diluție tot cu apă distilată sterilă de 1:10 obținându-se inoculul final.

Concentrațiile finale de antifungic au fost 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.625, 0.0312 mg/L. Gradul de creștere în godeurile conținând agent antifungic l-am interpretat prin comparație cu cel existent în godeurile martor (fără antifungic). Deoarece derivații azolici permit o creștere reziduală a fungilor în mediul de testare, se consideră că o inhibiție de 50% a creșterii indică o acțiune satisfăcătoare. Spectrofotometrul citește densitatea fiecărui godeu și valoarea obținută va fi comparată cu jumătatea valorii obținute pentru martorul de creștere, la o lungime de undă de 405nm (ceea ce corespunde unei inhibiții de 50% a creșterii). Concentrația minimă inhibitorie (CMI) s-a considerat a fi cea mai mică concentrație care produce o inhibiție de 50% a creșterii (turbiditate identică sau mai slabă decât 50% din cea a martorului de control).

## Rezultate

Tabel 4

CMI-urile pentru cele 2 antifungice testate pe tulpinile de *Aspergillus fumigatus* (n=16)

Concentrația (mg/l)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156
Voriconazol (nr. tulpini)	4	5	1	6	0	0	0	0	0	0
MXP 4509 (nr. tulpini)	2	1	0	2	1	0	0	0	0	0



CMI-urile pentru cele 2 antifungice testate pe tulpinile de *Aspergillus flavus* (n=8)

Concentrația (mg/l)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156
<b>Voriconazol (nr. tulpini)</b>	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>MXP 4509 (nr. tulpini)</b>	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Cele doua antifungice au o actiune oarecum similară față de tulpinile de *Aspergillus*, ilustrată de concentrațiile minime inhibitorii apropiate. Toate tulpinile prezinta CMI-uri relativ mari fata de antifungicele testate, ceea ce poate indica rezistență microbiologică – un factor de pronostic important pentru rezistenta terapeutică.

#### **DETERMINAREA DOZEI LETALE 90 LA SOARECI PENTRU TULPINA SC5314 DE CANDIDA ALBICANS**

S-a avut în vedere obținerea unui model murin de candidoză diseminată (invazivă) în vederea testării ulterioare a eficienței terapeutice a noului triazol MXP-4509. Principalul obiectiv al studiului a fost identificarea dozei de levuri care inoculată unui lot de șoareci outbred, de greutate aproximativ identică, să provoace decesul a 90% dintre aceștia într-o perioadă de 10-15 zile.

#### **Material si metoda**

- soareci femele NMRI, in greutate de 25 grame
- tulpina SC5314 (wild type) de *Candida albicans*
- pentru prepararea inoculului de *Candida albicans*: placi cu Agar YPD, anse de inoculare, tampon fosfat, agitator vortex, eprubete sterile, camera de numărât Neubauer improved.
- pentru manipularea animalelor: halat, masca, manusi de latex, inel de cauciuc pt. deget
- pentru inocularea intravenoasa a soarecilor: dispozitiv de contentie soareci, seringi cu ac 25 G

#### **Desfasurarea experimentului**

Se vor determina urmatorii parametri in timpul perioadei de infectie (pana la 15 zile): timpul mediu de supravietuire, numarul de soareci morti versus numarul total de soareci infectati.

## ZIUA 0

Insamantarea tulpinilor de testat pe Agar YPD (extract de drojdie, peptona, glucoza) si incubare la 30 grade C timp de 24 ore.

## ZIUA 1

Prepararea inoculului (din tulpina de *Candida albicans*):

- se pregateste o suspensie de levuri in tampon fosfat care apoi se ajusteaza (prin numarare in camera) la densități de  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  celule/ml (densitatea stricta este cruciala in acest tip de experiment)

Inocularea soarecilor:

- se formează 4 loturi de câte 25 animale (câte un lot pentru fiecare densitate a inoculului)
- se plaseaza soarecii in dispozitivele de contentie
- se incalzesc soarecii sub o lampa cu bec infrarosu (in mediu cu temperatura scazuta venele cozii sunt colabate si inocularea se face anevoios sau este imposibil de practicat); nu se depaseste temperature de 30 grade C la nivelul soarecilor pt. a evita supraincalzirea.
- se incarca o seringa de insulina cu 550 microlitri din inoculul preincalzit si se elimina bulele de aer prin acul de 25 G ferm adaptat la seringa
- se imobilizeaza coada soarecelui intre indexul si policele mainii stangi, apoi se patrunde cu acul in vena aproape paralel cu lumenul vasului; se incepe de la varful cozii, astfel ca in caz de nereusita sa se poata relua operatiunea intr-o zona situata mai spre baza cozii
- dupa injectare, acul se lasa pe loc cca. 5 secunde astfel ca materialul injectat sa fie drenat din coada
- se plaseaza soarecii inoculati in cusca initiala si se mentin in acelasi regim de hranire si in acelasi microclimat timp de până la 15 zile, notându-se zilnic numarul animalelor decedate.

## ZILELE 2-10

- se urmaresc zilnic soarecii inoculati si se noteaza eventualele decese pe zile si loturi

### **Rezultate**

In urma analizei dinamicii mortalitatii la cele 4 loturi de soareci inoculati s-a stabilit că doza de  $2,5 \times 10^6$  UFC/ml produce o mortalitate de 90% in 14 zile (au supravietuit doar 3 soareci din totalul de 25 inoculati).