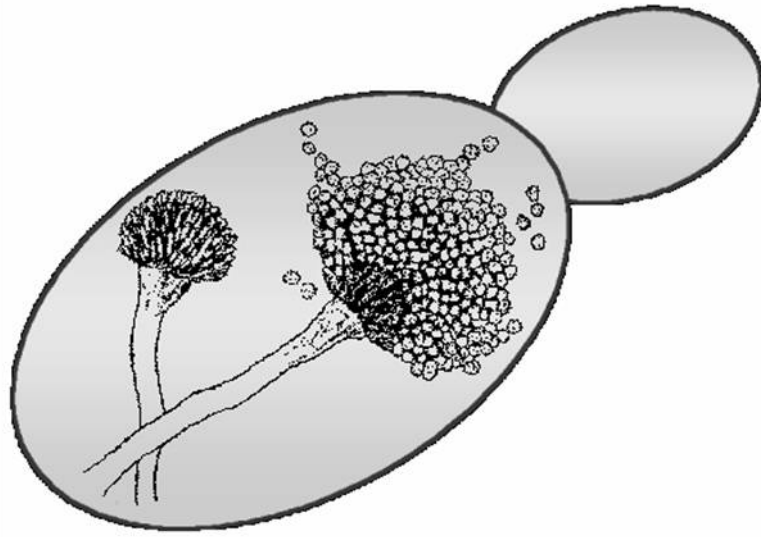
Antimicogramma per *Candida*

Guida pratica

A cura del CoSM
(Comitato di Studio per la Micologia)



AMCLI
associazione
microbiologi
clinici italiani

Comitato di Studio per la Micologia (CoSM)

Coordinatore Comitato: Dott. Stefano Andreoni

Segretario: Dott. Gianluigi Lombardi

Membri ordinari: Dott. Claudio Farina
Dott. Marco Conte
Dott. Paolo Fazii
Dott.ssa Esther Manso
Dott.ssa Silvana Sanna
Prof.ssa Elisabetta Blasi

Antimicogramma per *Candida*: come farlo, quando farlo e come interpretarlo (01-01-2015)

A cura del CoSM - Comitato di Studio per la Micologia

Candida

L'elevato tasso di mortalità associato alle infezioni invasive da *Candida* ed alle candidemie, insieme ad un ritardo della terapia antifungina e ad una diagnosi non ottimale, ha determinato un uso eccessivo di farmaci antifungini sia per la terapia che per la profilassi di queste infezioni. *Candida albicans* rimane la specie di più frequente riscontro: tuttavia altre specie, quali *C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. krusei*, la cui sensibilità agli agenti antifungini disponibili risulta spesso variabile, risultano in sensibile aumento. La resistenza al fluconazolo nelle specie di *Candida* è ritenuta essere una grave minaccia negli USA per la gestione dei singoli casi e quale evento epidemiologico di rilievo. *C. glabrata* e *C. parapsilosis* rappresentano le due specie con ridotta sensibilità rispettivamente agli azoli ed alle echinocandine di più frequente riscontro. Di recente, in due importanti studi di sorveglianza, è stata osservata una diminuzione della sensibilità alle echinocandine nei ceppi di *C. glabrata* resistenti al fluconazolo (2,25,32).

La recente introduzione di nuove molecole antifungine meno tossiche, pur contribuendo a migliorare sostanzialmente la gestione clinico-terapeutica dei pazienti, ha sollevato la questione della scelta del regime terapeutico più appropriato. L'incremento delle infezioni fungine, la disponibilità di nuovi farmaci, così come la comparsa, accanto a forme di resistenza primitiva, di fenomeni di resistenza secondaria, ha comportato la necessità, da parte dei laboratori di Microbiologia Clinica, di perfezionare le tecniche diagnostiche atte ad un più accurato controllo delle sensibilità alle molecole antifungine. I *test* di sensibilità agli antifungini devono essere inclusi nella *routine* per l'ottimizzazione della terapia adeguata nelle infezioni gravi ed in alcuni specifici casi. I *test* di sensibilità agli antifungini per *Candida* spp. sono stati standardizzati nelle ultime due decadi e sono ancora in fase di sviluppo per alcuni antifungini e per altre specie fungine.

Resistenza agli antifungini

Amfotericina B (AMB). La resistenza all'amfotericina B è un fenomeno poco frequente in *Candida* spp. (1-3%). Sono rari i ceppi descritti con resistenza intrinseca all'AMB con elevate MIC e in letteratura si menziona la possibilità di sviluppo di resistenza di *C.lusitaniae* in corso di terapia con AMB (7). Diversi studi segnalano che i metodi di riferimento non sono completamente affidabili per classificare i ceppi AMB-resistenti, in quanto i valori di MIC

dell'AMB si espletano in solo 3-4 doppie diluizioni di intervallo, precludendo la separazione dei ceppi sensibili dai resistenti. AMB sta diventando l'ultima alternativa per il trattamento delle infezioni invasive da *C. glabrata* resistenti al fluconazolo e alle echinocandine (14).

Azoli: Fluconazolo, Itraconazolo, Voriconazolo, Posaconazolo

Nei lieviti, il *target* degli azoli è l'enzima 14-alfalanosterol dimetilasi generato dal gene *ERG11*. La maggior parte delle resistenze di *Candida* spp. agli azoli sono dovute ad una superespressione dei geni *CDR* e *MDR* che codificano le pompe di efflusso. Inoltre, sono state associati ad un aumento della MIC le mutazioni dell'*ERG11* ed altri cambiamenti genetici. La resistenza agli azoli è stata descritta con certa frequenza nelle *Candida* spp. *Candida glabrata*, è una specie con diminuita sensibilità al fluconazolo e ad altri triazoli che viene con frequenza isolata nelle candidosi invasive. *Candida krusei* è naturalmente resistente al fluconazolo. Sono state riscontrate resistenze agli azoli anche in *C. albicans, C. tropicalis* ed in *C. parapsilosis* (14).

Echinocandine: Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina

Le echinocandine mostrano *in vitro* un'attività fungicida nei confronti della maggior parte delle *Candida* spp., buoni profili farmacocinetici e tollerabilità, e sono state raccomandate come antifungini di prima linea per le candidosi invasive finché sia identificata la specie fungina e confermata la diagnosi clinica. Le echinocandine esercitano la loro attività antifungina inibendo l'enzima glucansintetasi codificato dai tre relativi geni (*fks1, fks2* e *fks3*). La maggior parte delle specie di *Candida* sono considerati buoni bersagli per le echinocandine, ma alcune specie quali *C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis, C. guilliermondii* e *C. lipolytica*, mostrano una sensibilità inferiore *in vitro*, con una concentrazione minima inibente (MIC) più elevata, dovuta ad una alterazione intrinseca nel gene *target.* L'uso sempre più frequente delle echinocandine ha comportato la comparsa di resistenze acquisite, correlata alla pressione selettiva, in ceppi di *Candida* spp., includendo *C. albicans, C. dubliniensis, C. kefyr, C. glabrata, C. krusei, C. lusitaniae* e *C. tropicalis* (5). La resistenza alle echinocandine frequentemente si instaura in modo progressivo. Per questo motivo, quando le echinocandine sono prescritte per lunghi periodi, viene consigliato un monitoraggio della resistenza antifungina da materiali biologici sede di infezione profonda o di colonizzazione. La resistenza alle echinocandine è in aumento, in particolare nelle infezioni da *C. glabrata* trattate con terapie prolungate (3-4 settimane) con echinocandine, in relazione alla ridotta sensibilità intrinseca al fluconazolo. Le MIC elevate sono state associate a sostituzioni di un numero di singoli aminoacidi causate da mutazioni in regioni

specifiche "*hot spot*" dei geni target *fks1* per tutte le *Candida* spp. e anche di *fks2* per *C. glabrata*. È stato solidamente documentato che l'*outcome* del paziente peggiora significativamente con l'aumento delle MIC (2,8,34). La posizione, così come la sostituzione di specifici aminoacidi, determina il grado dell'aumento della MIC nei singoli ceppi. Nella maggior parte dei casi le alterazioni *fks* conferiscono resistenza crociata a tutte tre echinocandine, ma nel caso di alcune specifiche alterazioni l'aumento della MIC è più moderato e non sempre per tutti i tre antifungini. Le doppie mutazioni eterozigotiche ed omozigotiche aumentano significativamente la resistenza *in vivo* di *C. albicans*, se si compara con la resistenza osservata con una singola mutazione eterozigotica, e comportano un rischio maggiore di fallimento terapeutico (21).

La resistenza alle echinocandine può essere determinata fenotipicamente mediante l'antimicogramma o con metodi molecolari tramite la determinazione delle mutazioni nelle regioni "*hot spot*" dei geni *fks1* e per *C. glabrata* anche del gene *fks2.* Non si è mai osservata una resistenza clinicamente rilevante in *Candida* in assenza di mutazioni nei *"hot spot" fks* (5).

Quali sono le tecniche di riferimento per l'antimicogramma di *Candida*?

Negli ultimi anni, il *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) hanno lavorato proficuamente per l'armonizzazione dei due protocolli internazionali di standardizzazione:

- Microdiluizione in brodo in micropiastra
  - CLSI M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012)
  - EUCAST Edef 7.2 (2012) , nuovi BP (vs. 7.0, 12-8-2014)
- Disco-diffusione
  - CLSI M44-A2 e M44-S3 (2009)

È utile identificare la specie fungina?

L'identificazione di specie del lievito isolato non solo è utile ma è addirittura ***indispensabile***: è il primo passo necessario prima di decidere se realizzare *in vitro* i *test* di sensibilità agli antifungini. Infatti in caso di identificazione di: *C. krusei*: non testare né usare il fluconazolo; *C. rugosa, C. norvegensis, C. lipolytica, C. valida, C. inconspicua, C. zeylanoides*: ridotta sensibilità agli azoli;

C. guilliermondii, C, metapsilosis, C. parapsilosis, C. fermentati: ridotta sensibilità alle echinocandine; *C. lusitaniae:* ridotta sensibilità all'amfotericina B.

Attualmente, sia per l'EUCAST che per il CLSI, l'interpretazione dei risultati, *cutoff* epidemiologici (ECV) e *breakpoint* clinici (CBP) è **specie-dipendente**.

EUCAST vs CLSI

Come si osserva nella tabella 1, le due metodiche standardizzate di microdiluizione in brodo, proposte da CLSI (11) e da EUCAST (19), differiscono nella quantità di glucosio presente nel terreno e nell'inoculo fungino (rispettivamente 10 e 100 volte superiori nell'istruzione operativa proposta da EUCAST), nella tipologia dei pozzetti della micropiastra (a fondo piatto piuttosto che ad "U") e per le modalità di lettura (spettrofotometrica con EUCAST e visiva con CLSI).

Per quanto attiene all'interpretazione, EUCAST (20) e CLSI (12) hanno stabilito i CBP a seconda del valore del *cutoff* epidemiologico delle principali specie di *Candida*.

	EUCAST (Edef 7.2)	**CLSI (M27-A3 e M27-S4)**
Glucosio	2%	0.2%
Inoculo	0.5-2.5 x 10^5	0.5-2.5 x 10^3
Piastre & Lettura	Piatte & spettrofotometro	Fondo ad "U" & Visiva
Tempo di incubazione	24 ore	24 ore
End point	50% inibizione (AMB: ≤90%)	50% inibizione (AMB: 100%)
Interpretazione	Per lieviti	Per lieviti

Tabella 1.- Comparazione delle due metodiche standardizzate CLSI M27-A3 e M27-S4 vs EUCAST (Edef 7.2)

I metodi sono diversi tra loro ma esitano in valori di MIC molto simili quando si testano gli azoli (fluconazolo e voriconazolo) e la lettura viene eseguita dopo 24 ore di incubazione. Questa armonizzazione comporta che per alcuni antifungini i *breakpoint* clinici possono coincidere (o variare solo marginalmente) per entrambe le metodiche standardizzate (24). Buona concordanza si rileva tra CLSI ed EUCAST per amfotericina B (>98%) e 5-fluorocitosina (>98%), ma non ci sono studi disponibili per le singole specie (13). In *C. glabrata,* è stata osservata una concordanza in 50 su 51 ceppi che presentavano una mutazione *fks* e la resistenza almeno ad una echinocandina con la metodica CLSI (32).

Attualmente sono disponibili nuove informazioni su quali siano le molecole di echinocandine da testare, in quanto è stato osservato un numero inaspettatamente elevato di ceppi di *C. glabrata* e di *C. krusei* categorizzati come caspofungina R e anidulafungina e micafungina S, utilizzando il metodo CLSI o metodi commerciali (17,18,35). Recentemente, il

CLSI, come già indicato dall'EUCAST, propone di testare anidulafungina e micafungina e di utilizzarli come *marker* surrogati per predire la sensibilità e la resistenza alla caspofungina (29,31).

Ad oggi EUCAST ha stabilito per alcune specie i CBP solo per anidulafungina e micafungina ed il valore di CBP, utilizzando la metodica operativa proposta da EUCAST, è generalmente più basso, da 1 a 3 diluizioni per anidulafungina e da 1 a 4 diluizioni per micafungina, secondo la specie, rispetto a quello indicato col metodo CLSI.

La metodica di disco-diffusione del CLSI (M44-A2), di semplice realizzazione, si scontra con il problema della mancanza di criteri interpretativi del BPC ripartiti per specie proposti nell'ultimo *standard* pubblicato (M44-S3) nel 2009.

Come sono le MICs dei *breakpoint* clinici e quindi le interpretazioni per specie con EUCAST e CLSI ?

Nella tabella 2 sono messi a confronto i valori di CBP con la metodica EUCAST (25) e CLSI (14), con lettura alle 24 ore di incubazione:

Antifungino	**Specie**	**EUCAST (v 7.0)**			**CLSI (A27-S4)**			
		S	**I**	**R**	**S**	**S-DD**	**I**	**R**
Fluconazolo	*C. albicans*	≤2	4	>4	≤2	4	-	≥8
	C. glabrata	≤0.002	0.004-32	>32	-	≤32	-	≥64
	C. krusei	NR	NR	NR		-	-	-
	C. parapsilosis	≤2	4	>4	≤2	4	-	≥8
	C. tropicalis	≤2	4	>4	≤2	4	-	≥8
	C. guilliermondii	IE	IE	IE				
	Specie non-correlate*	≤2	4	>4				
Voriconazolo	*C. albicans*	≤0.12	-	>0.12	≤0.12	-	0.25-0.50	≥1
	C. glabrata	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
	C. krusei	IE	IE	IE	≤0.50	-	1	≥2
	C. parapsilosis	≤0.12	-	>0.12	≤0.12	-	0.25-0.50	≥1
	C. tropicalis	≤0.12	-	>0.12	≤0.12	-	0.25-0.50	≥1
	C. guilliermondii	IE	**IE**	IE				
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
Posaconazolo	*C. albicans*	≤0.06	-	>0.06				
	C. glabrata	IE	IE	IE				
	C. krusei	IE	IE	IE				
	C. parapsilosis	≤0.06	-	>0.06				
	C. tropicalis	≤0.06	-	>0.06				
	C. guilliermondii	IE	IE	IE				
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
Itraconazolo	*C. albicans*	≤0.06	-	>0.06	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	C. glabrata	IE	IE	IE	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	C. krusei	IE	IE	IE	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	C. parapsilosis	≤0.12	-	>0.12	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	C. tropicalis	≤0.12	-	>0.12	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	C. guilliermondii	IE	IE	IE	≤0.12	0.25-0.50		≥1
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
AMB[a]	*C. albicans*	≤1	-	>1	-	-	-	-
	C. glabrata	≤1	-	>1	-	-	-	-
	C. krusei	≤1	-	>1	-	-	-	-
	C. parapsilosis	≤1	-	>1	-	-	-	-

	C. tropicalis	≤1	-	>1	-	-	-	-
	C. guilliermondii	IE	IE	IE				
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
Caspofungina[b]	*C. albicans*	-	-	-	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. glabrata	-	-	-	≤0.12	-	0.25	≥0.50
	C. krusei	-	-	-	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. parapsilosis	-	-	-	≤2	-	4	≥8
	C. tropicalis	-	-	-	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. guilliermondii	IE	IE	IE	≤2		4	≥8
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
Micafungina	*C. albicans*	≤0.016		>0.016	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. glabrata	≤0.03		>0.03	≤0.06	-	0.12	≥0.25
	C. krusei	IE	IE	IE	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. parapsilosis	≤0.002	0.004-2	>2	≤2	-	4	≥8
	C. tropicalis	IE	IE	IE	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. guilliermondii	IE	IE	IE	≤2		4	≥8
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
Anidulafungina	*C. albicans*	≤0.03	-	>0.03	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. glabrata	≤0.06	-	>0.06	≤0.12	-	0.25	≥0.50
	C. krusei	≤0.06	-	>0.06	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. parapsilosis	≤0.002	0.004-2	>4	≤2	-	4	≥8
	C. tropicalis	≤0.06	-	>0.06	≤0.25	-	0.50	≥1
	C. guilliermondii	IE	IE	IE	≤2		4	≥8
	Specie non-correlate*	IE	IE	IE				
5-Fluorocitosina[c]	*Candida* spp	-	-	-	≤4		8-16	≥32

S: sensibile, I: intermedio, S-DD: sensibile dose-dipendente; R: resistente; NR: non raccomandato; IE: dati insufficienti per determinare *i breakpoint*

Tabella 2.- CBP EUCAST e CLSI a confronto

*I *breakpoint* non correlati alle specie sono determinati dall'EUCAST in base principalmente dei dati PK/PD e sono indipendenti della distribuzione delle MIC specifiche di specie. Sono da utilizzare unicamente per le specie senza *breakpoint* specifici.

[a] Per amfotericina B, EUCAST indica che i valori di *breakpoint* si basano sui valori di *cutoff* epidemiologici. R se >1 μg/mL. Non esiste esperienza clinica con ceppi che presentano meccanismi di resistenza acquisita e, quindi, non è possibile attualmente correlare direttamente la MIC *in vitro* e l'*outcome* clinico. In particolare, CLSI stabilisce che una MIC >2 μg/mL deve essere considerata inusuale per la maggior parte di *Candida* spp. e suggerisce che per questi ceppi la terapia con AMB potrebbe essere non ottimale. Diversi studi hanno stabilito comunque, che queste metodiche sono capaci di individuare i ceppi con valori di MIC elevati, però non sono completamente attendibili per classificare correttamente alcuni ceppi AMB-R. Inoltre, la determinazione dei meccanismi di resistenza all'AMB a livello molecolare è clinicamente irrilevante.

[b] Per caspofungina: i ceppi che sono sensibili o resistenti all'anidulafungina e anche alla micafungina devono essere considerati sensibili o resistenti alla caspofungina, fino che non siano stati determinati i *breakpoint* alla caspofungina. Per lo stesso motivo i ceppi di *C. parapsilosis* intermedi all'anidulafungina e micafungina possono essere refertati come intermedi alla caspofungina.

[c] Nel caso della 5-fluorocitosina, non sono definiti i *breakpoint* da parte di EUCAST, mentre quelli proposti da CLSI nel documento MS-S3, non essendo distinti per specie, non sono più validi. I *breakpoint* CLSI (2008) (≤4, ≥32) sono troppo alti, non sono o sono stati poco considerati i dati clinici o i meccanismi di resistenza e probabilmente, sono poco sensibili per determinare i ceppi con alcuni tipi di mutazioni (Mutazioni in *FCY2*: MIC >0.5 mg/mL ma < 8 mg/mL) (27).

Per testare echinocandine, azoli e amfotericina B, l'ultimo documento EUCAST Edef 7.2 (2012) (3) dà indicazione di scioglierle in DMSO e non in acqua.

Prima di eseguire ed interpretare un antimicogramma è quindi, mandatorio eseguire i *test* di controllo di qualità con colture fresche su Sabouraud destrosio agar di almeno due ceppi di controllo ATCC: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, i cui risultati devono evidenziare valori di MIC compresi nei limiti attesi segnalati nella tabella 3 con le metodiche EUCAST o CLSI e lettura delle micropiastre dopo 24 ore di incubazione.

Antifungino	***Candida krusei* ATCC 6258**		***Candida parapsilosis* ATCC 22019**	
	EUCAST	***CLSI***	***EUCAST***	***CLSI***
Amfotericina B	0.12–1	0.5-2.	0.12–1	0.25-2
5-Fluorocitosina	1–4	4-16	0.12–0.5	0.06-0.25
Fluconazolo	16–64	8-64	0.5–2	0.5-4
Itraconazolo	0.03–0.12	0.12-1	0.03–0.12	0.06-0.5
Voriconazolo	0.03–0.25	0.06-0.5	0.015–0.06	0.016-0.12
Posaconazolo	0.015–0.06	0.06-0.5	0.015–0.06	0.03-0.25
Caspofungina	NA	0.12-1	NA	0.25-1
Anidulafungina	≤0.06	0.03-0.12	0.25-1	0.25-2
Micafungina	NA	0.12-0.5	NA	0.5-2

Tabella 3.- *Intervalli di MIC accettabili (μg/mL) degli antifungini con i ceppi di controllo di qualità secondo le metodiche EUCAST e CLSI (lettura alle 24 ore)*
NA, Non disponibile

Quale corrispondenza hanno i metodi standardizzati con i sistemi commerciali per testare la sensibilità di *Candida?*

Dopo la standardizzazione dell'antimicogramma e la definizione dei *breakpoint*, si è reso necessario l'uso di metodiche più pratiche e meno complesse da utilizzare nella *routine* diagnostica, ma che devono essere validate per l'utilizzo nei laboratori clinici. Sono disponibili diverse tecniche commerciali che mostrano una elevata correlazione con i risultati dei *test* di riferimento e sono già in uso in molti laboratori clinici. Il Comitato di Studio per la Micologia (CoSM) dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) considera unicamente i tre sistemi per i quali sono disponibili le certificazioni FDA per almeno alcune delle molecole saggiate: il metodo "Sensititre YeastOne®"(ThermoFisher Inc), l' "Etest®" (bioMérieux s.a.) e "Vitek 2"® (bioMérieux s.a.).

Una delle maggiori criticità in questo tipo di valutazione è rappresentata dal numero poco significativo di ceppi resistenti, per ogni combinazione specie-antifungino. Inoltre, i cambiamenti significativi dei valori CBP per gli azoli e per le echinocandine possono impattare in modo notevole sui sistemi commerciali in corso di valutazione: tali sistemi

furono infatti sviluppati quando i valori di CBP erano ritenuti più alti e quando non si conoscevano ancora i valori di ECV.

Per ritenere un sistema commerciale correlabile ad una delle metodiche standardizzate (CLSI o EUCAST) vanno confrontati i valori delle MIC_{50} del sistema commerciale considerato con quelli di MIC_{50} proposti da CLSI e da EUCAST, per ogni specie di *Candida* (la MIC_{50} riflette la sensibilità della specie). I CBP del sistema commerciale in valutazione possono essere adottati solo se le MIC corrispondono a quelle del metodo di riferimento. I *test* commerciali devono essere considerati come tecniche di *screening* per determinare i ceppi che mostrano una MIC elevata agli antifungini.

I risultati discrepanti con i metodi commerciali devono essere confermati mediante procedure di riferimento particolarmente per i ceppi con valori di MIC *borderline*/resistenti (1).

In particolare:

YeastOne®

CLSI e YeastOne sono metodiche comparabili per testare la sensibilità di *Candida* spp. agli antifungini (26). La concordanza di categoria (S-I-R) tra CLSI e YeastOne, risulta essere pari a: fluconazolo 89,2%; anidulafungina 98.3%; caspofungina 93.6%; micafungina 99.6%. Le principali discordanze, sempre *minor error*, sono per *C. parapsilosis* e fluconazolo (40%) e *C. krusei* e caspofungina (29.7%) (26).

Buona concordanza è stata riscontrata per amfotericina B (97.4%-97.9%) e 5-fluorocitosina (96%-95.2%), rispettivamente con CLSI e con EUCAST, ma non ci sono studi dettagliati ripartiti per specie (13). L'armonizzazione assoluta tra EUCAST e CLSI per fluconazolo, itraconazolo e pressoché assoluta per voriconazolo permette di interpretare queste molecole con i CBP proposti da EUCAST/CLSI.

In assenza di *breakpoints* clinici specifici con il metodo YeastOne, sono stati determinati i *cutoff* epidemiologici di fluconazolo, itraconazolo, posaconazolo, voriconazolo, echinocandine, AMB e 5-fluorocitosina, per sei specie di *Candida* e questi valori possono essere utili come tentativo per monitorare l'emergenza di resistenze quando la metodica utilizzata è il YeastOne. Gli ECV proposti con YeastOne erano uguali o concordanti entro 2 doppie diluizioni a quelli del CLSI. La principale differenza è stata osservata per *C. tropicalis* dove l'ECV alla anidulafungina era 3 diluizioni più alto con il metodo YeastOne (9,10). La *performance* del metodo YeastOne per caspofungina è stata valutata in ceppi di *C. glabrata* con mutazioni *fks.* Nei pazienti con infezione invasiva da ceppi di *C. glabrata* con mutanti *fks* prominenti e MIC alla caspofungina ≥0.5 mg/L, il fallimento terapeutico con echinocandine è risultato del 100% (5/5 casi), invece in presenza di mutanti *fks* meno prominenti e MIC alla

caspofungina ≤ 0.25 mg/L il fallimento terapeutico con echinocandine è risultato del 20% (1/5 casi) (8). In uno studio multicentrico con la metodica YeastOne, eseguita di *routine* in 8/9 ospedali, la valutazione della sensibilità alle echinocandine ha evidenziato la riduzione della variabilità interlaboratorio delle MIC di tutte le echinocandine, inclusa la caspofungina contro *Candida* spp, diversamente da quanto osservato per quest'ultima con le metodiche di riferimento CLSI e EUCAST. Gli autori suggeriscono che l'utilizzo del metodo YeastOne potrebbe superare la variabilità delle MIC della caspofungina osservata con i metodi di riferimento (17).

Etest®

Buona concordanza è stata rilevata tra CLSI ed EUCAST per amfotericina B (>97%) e gli azoli (>95%), ma non ci sono studi ripartiti per specie (13).

L' Etest, utilizzato nel laboratorio clinico, mostra una concordanza complessiva per AMB, fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo, 5-fluorocitosina e caspofungina, con il metodo di riferimento EUCAST pari al 71%, che è più elevata per voriconazolo (86.6%) e più bassa per itraconazolo (59.6%) (15).

L'Etest ha dimostrato una buona correlazione complessivamente con la metodica CLSI per le echinocandine (32). Per caspofungina l'interpretazione può essere effettuata secondo CLSI per *C. albicans, C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, ma non ha alcuna corrispondenza né per *C. glabrata* né per *C. krusei* (rischio di indicarle erroneamente come resistenti) (4). Per le echinocandine, non esistono a tutt'oggi lavori comparativi tra la metodica EUCAST e l'Etest.

Vitek2®

La concordanza (entro ± 2 diluizioni) tra CLSI e Vitek 2® è > 95% per i triazoli, fluconazolo e voriconazolo, l'AMB e la 5-fluorocitosina ed i risultati sono comparabili a quelli del ottenuti con le metodiche proposte da CLSI e da EUCAST (13,22,28).

In uno studio multicentrico recente, applicando gli ultimi valori di *breakpoint* al fluconazolo per specie di *Candida* previsti da CLSI, la concordanza con la metodica CLSI è stata del 94% con discordanze pari al 0.3% di *very major errors* e 2.6% di *major errors* (28). Ciò non si verifica, però, per le echinocandine. In uno studio di confronto della sensibilità alla caspofungina per ceppi con mutazioni *fks* tra la nuova *card* di Vitek2, AST-Y06 Yeast, e la metodica *standard* del CLSI, il metodo Vitek2 ha misidentificato circa il 20% dei ceppi con mutazioni *fks* interpretandoli come sensibili, mentre solo <4% dei ceppi *fks* sono risultati sensibili con la metodica CLSI. Tale problema è riconducibile al fatto che con il metodo Vitek2 è impossibile discriminare in *C. glabrata* i ceppi sensibili dagli intermedi perché i

breakpoints non sono inclusi nel *range* di determinazione del Vitek2 stesso (MIC di <0.25 a >4 mg/L) (6).

Quando eseguire l'antimicogramma per *Candida*?

Per guidare la terapia è raccomandato eseguire i *test* di sensibilità sui ceppi isolati da forme invasive, nei pazienti immunocompromessi, nei casi di fallimento terapeutico, su ceppi "*breakthroug*" oppure in caso di una precedente terapia antifungina.
In particolare, in accordo con la letteratura, si raccomanda di testare alcuni antifungini per *Candida* spp. nelle seguenti occasioni (27):

Di routine:

- Testare FLUCONAZOLO, ANIDULAFUNGINA e MICAFUNGINA in *C. glabrata* da siti profondi
- Può essere utile testare FLUCONAZOLO, ANIDULAFUNGINA e MICAFUNGINA in altre specie ma generalmente la sensibilità è prevedibile per specie
- Utilizzare CBP o ECV per l'interpretazione appropriata
- Considerare reazione crociata completa tra FLUCONAZOLO e gli altri azoli per *C. glabrata*

Candidosi delle mucose:

- Non è necessario determinare di routine la sensibilità agli AZOLI, ma solo in caso di mancata risposta terapeutica a questi farmaci.

Infezione invasiva e fallimento clinico alla terapia iniziale:

- Considerare l'esecuzione del test di sensibilità per AMB, 5-FC, FLUCONAZOLO, VORICONAZOLO, ANIDULAFUNGINA e MICAFUNGINA
- Si raccomanda di consultare con un microbiologo con esperienza.

Infezioni da specie con elevato tasso di resistenza intrinseca o acquisita

- Test non necessario quando si conosce la resistenza intrinseca: *C. lusitaniae* e AMB; *C. krusei* e fluconazolo, 5-FC; *C. guilliermondii* e anidulafungina e micafungina
- Con tassi elevati di R acquisita, monitorare la resistenza, in caso di fallimento terapeutico:*C. glabrata* e fluconazolo, AMB, anidulafungina e micafungina; *C. rugosa* e AMB, fluconazolo, anidulafungina e micafungina; *C. krusei* e AMB; *C. guilliermondii* e AMB

Nuove opzioni terapeutiche:

- Obbligatorio in caso di esposizione precedente a fluconazolo o echinocandine

Nelle vulvovaginiti recidivanti (RVVC) da *C. albicans* la correlazione clinica con i valori di MIC di fluconazolo è difficile da stabilire in quanto gli isolati, nella maggior parte dei casi recidivanti, sono molto sensibili al fluconazolo stesso. In particolare i *test* di sensibilità che precisano i valori di MIC non sono indicati per le donne con RVVC ma unicamente in caso di *breakthrough*, di recidive frequenti o di infezioni refrattarie, dato che è possibile che tra le cause del fallimento terapeutico ci sia quella dovuta ad una diminuita sensibilità al fluconazolo. Sia gli azoli, sia l'AMB non sono comunque efficaci nella terapia delle candidosi da *C. glabrata* e neanche in caso di *C. albicans* con ridotta sensibilità agli azoli, indipendentemente dal risultato del test di sensibilità eseguito con una metodica standardizzata (16,33).

Conclusioni a proposito di *Candida* spp.

Si riportano alcuni punti essenziali, alla base delle raccomandazioni prospettate dal CoSM-AMCLI:

1. prioritaria rispetto all'esecuzione dei *test* di sensibilità è l'identificazione del lievito isolato in coltura: essa è assolutamente obbligatoria;
2. è opportuno eseguire i *test* di sensibilità solo in casi particolari di infezione fungina: in caso di forme invasive, in caso di infezione in soggetti immunodepressi, oppure in caso di fallimento terapeutico, su ceppi *breakthroug* ovvero se una precedente terapia antifungina ha fallito clinicamente. Caso a sé è quello rappresentato dalle candidosi genitali, per le quali l'esecuzione dei *test* di sensibilità deve essere riservata solo quando siano coinvolti ceppi fungini *breakthrough*, ovvero in caso di infezioni refrattarie o di recidive frequenti;
3. l'esecuzione dei *test* di sensibilità deve essere eseguita solo se è possibile effettuare, per ogni seduta analitica, gli opportuni controlli di qualità in accordo con le prescrizioni delle linee-guida degli organismi internazionali di standardizzazione. In caso contrario è opportuno astenersi dall'esecuzione dei *test*, ma è consigliato al contrario rivolgersi a Centri di referenza che possano provvedere, in modo centralizzato, alla realizzazione delle prove in accordo con le indicazioni degli organismi internazionali di standardizzazione;
4. nel rispetto di quanto sopra ricordato ed in attesa di una conclusiva armonizzazione delle proposte di standardizzazione, è possibile utilizzare nei laboratori periferici i *kit* commerciali validati FDA (Sensititre Yeast One®; Etest®, Vitek2®) che garantiscono livelli di assoluta affidabilità e di sostanziale equivalenza con i metodi *standard*

descritti da CLSI e da EUCAST, con le limitazioni segnalate per le singole specie secondo la metodica e l'antifungino.

5. pare opportuno raccomandare ai laboratori di Microbiologia Clinica di adeguarsi alle indicazioni interpretative proposte da EUCAST/CLSI per AMB e azoli. Per le echinocandine, la maggior parte degli studi sono stati eseguiti in confronto della metodica CLSI e pare più opportuno che con la metodica Sensititre YeastOne® siano utilizzati i nuovi *breakpoint* del CLSI, fino a che non siano disponibili valori di *breakpoint* propri della metodica commerciale. E' indispensabile, comunque, riportare in ogni caso sul referto il criterio internazionale cui è stato fatto riferimento;
6. per quanto concerne le echinocandine, nessun metodo è attendibile per la caspofungina: desumere il risultato dall'anidulafungina o micafungina;

Bibliografia

1. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M. EUCAST and CLSI: How to assess in vitro susceptibility and clinical resistance. Curr Fungal Infect Rep 2012; 6:229-234.
2. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clin Infect Dis 2013; 56:1724-32.
3. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document E.Def 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agent for yeast. Edef 7.2 (EUCAST-AFST). Clin Microbiol Infect 2012; 18:E246-7.
4. Arendrup MC, Pfaller MA; the Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: Risk of misclassification of susceptible isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised caspofungin CLSI breakpoints. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:3965-8.
5. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? Curr Opin Infect Dis 2014; 27:484-492.
6. Astvad KM, PerlinDS, Johansen HK et al. Evaluation of Caspofungin Susceptibility Testing by the New Vitek 2 AST-YS06 Yeast Card Using a Unique Collection of *FKS* Wild-Type and Hot Spot Mutant Isolates, Including the Five Most Common *Candida* Species. Antimicrob Agents Chemother, 2013; 57:177-182.
7. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP (2008) *Candida lusitaniae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. Med Mycol 2008; 46: 541–6.
8. Beyda ND, John J, Alam MJ et al. *FKS* mutants *Candida glabrata*: Risk factors and outcomes in patients with candidemia. Clin Infect Dis 2014; 59:819-25.
9. Cantón E, Pemán J, Hervás D et al. Comparison of three statistical methods for establishing tentative wild-type population and epidemiological cutoff values for echinocandins, amphotericin B, flucytosine, and six *Candida* specie as determined by the colorimetric YeastOne method. J Clin Microbiol 2012; 50:3921-6.
10. Cantón E, Pemán J, Iñiguez C et al. Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* specie as determined by the colorimetric Sensititre YeastOne method. J Cl Microbiol 2013; 51:2691-5
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition*. M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2) Wayne, PA: CLSI, 2008.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; fourth informational supplement* M27-S4, 4th ed. Wayne, PA, CLSI, 2012

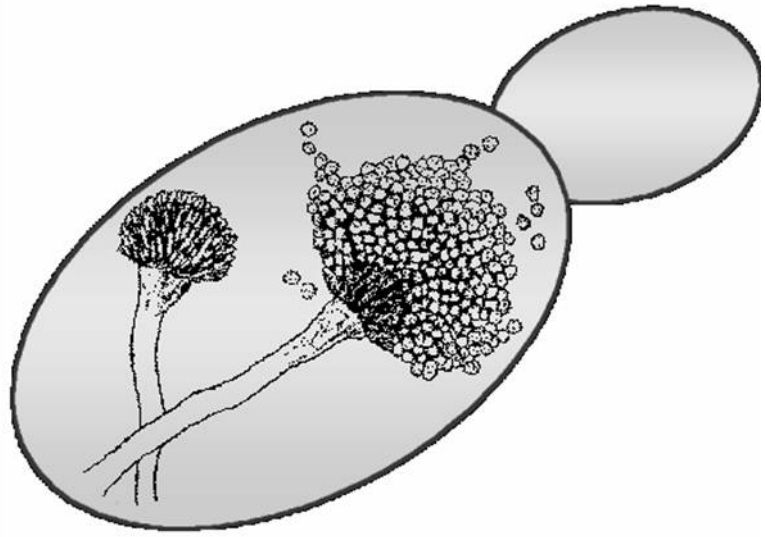
13. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A., Alastruey-Izquierdo A et al. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. J Clin Microbiol 2010; 48:1782-6.
14. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Gómez-López A et al. Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. Enferm Infect Microbiol Clin 2013; 31 (Suppl 1):53-8.
15. Dannaoui E, Paugam, Develoux M et al. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. Clin Microbiol Infect 2010; 16:863–9.
16. Danby CS, Boikov D, Rautemaa-Richardson R et al. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:1403-6.
17. Eschenauer GA, Nguyen MH, Shoham S et al. Real-world experience with echinocandin MICs against *Candida* species in a multicenter study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58:1897-1906.
18. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA et al. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? Antimicrob Agents Chemother 2013; 57:5836-42.
19. EUCAST definitive document E.DEF 9.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agent for yeast. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) http://www.eucast.org
20. EUCAST AFST breakpoints and RDs for antifungal agents (*Candida* and *Aspergillus*) (v 7.0), 14-08-2014. http://www.eucast.org
21. Lackner M, Tscherner M, Schaller M et al. Position and number of FKS mutation in *Candida albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibilities to echinocandins treatment. Antimicrob Agents Chemother, 2014; 58:3626-35.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW et al. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole agains *Candida* spp. J Clin Microbiol 2007; 45:3522-8.
23. Pfaller AM, Castanheira M, Diekema DJ et al. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2010; 48:1592-9
24. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, et al. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for Testing Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole by Use of Epidemiological Cutoff Values. J Clin Microbiol 2011; 49:845-50.
25. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2012; 50:1199-1203.
26. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, et al. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 73:365-8.
27. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. J Clin Microbiol 2012; 50:2846-56.

28. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW et al. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. Diagnos Microbiol Infect Dis 2013; 77:37-40.
29. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN et al. Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretative criteria. J Clin Microbiol 2014; 52:3223-9.
30. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW et al. Multicenter Evaluation of the New Vitek 2 Yeast Susceptibility Test Using New CLSI Clinical Breakpoints for Fluconazole. J Clin Microbiol 2014; 52:2126-30.
31. Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ et al. Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretative criteria. J Clin Microbiol 2014; 52:108-114.
32. Pham CD, Iqbal N, Bolden CB et al. Role of *FKS* mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58:4690-6.
33. Shahid Z et Sobel JD. Reduced fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2009; 64:354-6.
34. Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al. The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candididasis due to *Candida glabrata.* Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:4862-9.
35. Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al. Anidulafungin and micafungin minimum inhibitory concentration breakpoints are superior to caspofungin for identifying *FKS* mutant *Candida glabrata* and echinocandin resistance. Antimicrob Agent Chemother 2013; 57:6361-5.

Antimicogramma per *Aspergillus*

Guida pratica

A cura del CoSM
(Comitato di Studio per la Micologia)



AMCLI
associazione
microbiologi
clinici italiani

Comitato di Studio per la Micologia (CoSM)

Coordinatore Comitato: Dott. Stefano Andreoni

Segretario: Dott. Gianluigi Lombardi

Membri ordinari: Dott. Claudio Farina
Dott. Marco Conte
Dott. Paolo Fazii
Dott.ssa Esther Manso
Dott.ssa Silvana Sanna
Prof.ssa Elisabetta Blasi

Antimicogramma per *Aspergillus* species complex nel Laboratorio Clinico: come farlo, quando farlo e come interpretarlo (01-01-2015)

A cura del CoSM - Comitato di Studio per la Micologia

Aspergillus

Aspergillus è coinvolto in diverse forme di patologie umane e colpisce sia soggetti immunocompromessi [aspergillosi acuta invasiva (neutropenici con malattie ematologiche maligne, trapiantati d'organo solido, trapiantati di midollo allogenico, AIDS, ecc)] che pazienti non immunodepressi [aspergillosi cronica invasiva (BPCO in terapia steroidea, fibrosi cistica, malattia granulomatosa cronica, ecc.), oltre a forme localizzate (aspergilloma) e forme allergiche]. In uno studio prospettico di sorveglianza sulla presenza di *Aspergillus* nel tratto respiratorio, la frequenza maggiore di isolamenti è stata osservata nei pazienti con fibrosi cistica (55%), in pazienti con BPCO (13%) ed in pazienti con malattie ematologiche maligne (7%). Di questi pazienti il 18% erano ricoverati in Terapia Intensiva (10).

Le forme invasive sono caratterizzate da elevata mortalità ed inoltre è stata recentemente segnalata in letteratura la comparsa di ceppi di *A. fumigatus*, la specie più comune che causa infezioni nell'uomo, resistenti ai triazoli (8,9,13). Questi stipiti sembrano particolarmente diffusi in Europa, compresa l'Italia (11) forse per l'uso degli azoli in agricoltura (4). Per questi motivi si è recentemente evidenziata la necessità di eseguire i *test* di sensibilità. Dal punto di vista epidemiologico, poco si sa sulla prevalenza della resistenza nelle infezioni da *Aspergillus*: in parte ciò è dovuto al fatto che la maggior parte dei laboratori non esegue questi *test* di *routine*, in parte perché molti laboratori hanno anche difficoltà nell'identificazione corretta della specie aspergillare. I ceppi di *A. fumigatus* WT sono sensibili agli azoli attivi contro le muffe ed alle echinocandine. Tuttavia, *A. fumigatus* complex include più di 30 sottospecie che non possono essere differenziate morfologicamente da *A. fumigatus*. Alcune di queste sono state isolate dall'uomo e mostrano resistenza intrinseca ad uno o più antifungini (1). Inoltre è stata osservata la resistenza intrinseca all'AMB in ceppi di *A. terreus* e anche in *A. flavus* ed altre specie poco comuni (3). Un certo numero di queste specie meno frequenti di *Aspergillus,* sono resistenti anche agli azoli e, in alcuni casi, anche alle echinocandine.

Attualmente esistono dei *test* standardizzati a livello internazionale sia da parte di EUCAST che di CLSI per studiare la sensibilità agli antifungini (AMB e azoli), così come sono disponibili i criteri interpretativi, i *cutoff* epidemiologici (ECV) e *breakpoint* clinici (CBP) utili per ottimizzare la terapia. Il ruolo principale dei *test in vitro* è la rilevazione di una resistenza, indicante la mancata efficacia di un determinato antifungino.

Quali sono le tecniche di riferimento per l'antimicogramma di *Aspergillus*?:

Gli organismi internazionali preposti alla standardizzazione hanno codificato le procedure per l'esecuzione dei test di sensibilità mediante due metodiche:

- Microdiluizione in brodo in micropiastra
  - CLSI M38-A2 (2008)
  - EUCAST Edef 9.1, (2008), BP (vs. 7.0 , 12-8-2014)
- Disco-diffusione
  - CLSI M51-A (2010)

E' utile identificare la specie di *Aspergillus*?

L'identificazione accurata della specie è obbligatoria per gli stipiti clinicamente importanti.

- Alcune specie di *A. fumigatus* complex sono resistenti agli azoli (A. *lentulus*, *A. pseudofisheri* e *A. fumigatiaffinis*) e all'AMB (*A. lentulus* e *A. fumigatiaffinis*)
- Alcune specie di *Aspergillus* diverse da *fumigatus* sono resistenti ad alcuni antifungini: *A. terreus* presenta resistenza intrinseca all'AMB; *A. qudrilineata* è resistente a caspofungina; *A. calidioustus* mostra resistenza intrinseca agli azoli ed a caspofungina, mentre *A. niger* può manifestare resistenza acquisita agli azoli.

Attualmente, sia per EUCAST che per CLSI, l'interpretazione dei risultati (ECV e CBP) è specie-dipendente.

EUCAST vs CLSI

Come si osserva nella tabella 1, le due metodiche standardizzate di microdiluizione in brodo, proposte da CLSI (2) e da EUCAST (12), differiscono nella quantità di glucosio presente nel terreno e nell'inoculo fungino (10 volte superiore nell'istruzione operativa proposta da EUCAST), nella tipologia dei pozzetti della micropiastra (a fondo piatto piuttosto che ad "U"), per le modalità di standardizzazione dell'inoculo (spettrofotometrica con CLSI e con camera emocitometrica con EUCAST) e per la concentrazione di DMSO (0.5% con EUCAST e 1% con CLSI).

Entrambe le metodiche introducono il concetto di *Minimum Effective Concentration* (MEC) per la lettura delle echinocandine: punto di transizione dalle ife normali alla comparsa di ife aberranti, che si evidenziano per la comparsa di granulazioni o *clusters* sul fondo dei pozzetti delle micropiastre, non sempre facili da vedere e che spesso richiede l'osservazione al microscopio. La lettura della MEC è considerata difficile anche per gli

esperti ed EUCAST indica che non ci sono ancora metodi affidabili per lo studio della sensibilità delle muffe alle echinocandine.

Per quanto attiene all'interpretazione, EUCAST (6) ha stabilito i CBP e CLSI i CVP (2014) a seconda del valore del *cutoff* epidemiologico delle principali specie di *Aspergillus*

	EUCAST (Edef 9.1)	**CLSI (M38-A2)**
Terreno di coltura	RPMI 1640 + 2% glucosio	RPMI 1640 + 0.2% glucosio
Buffer	MOPS, pH 7.0 ± 0.1	MOPS, pH 7.0 ± 0.1
Concentrazione DMSO	0.5%	1%
Inoculo	2-5 x 10^5	0.4-5 x 10^3
Standardizzazione dell'inoculo	Camera emocitometrica	Spettrofotometricamente
Piastre	Celle a fondo piatto	Celle ad "U"
Tempo di incubazione	48 ore	46-50 ore
Lettura	Visiva	Visiva
End point	Totale inibizione (MIC) per azoli e polieni MEC per echinocandine	Totale inibizione (MIC) per azoli e polieni MEC per echinocandine

Tabella 1.- Comparazione delle due metodiche standardizzate CLSI M38-A2 vs EUCAST Edef 9.1

La lettura per AMB e gli azoli - a differenza di quella dei lieviti - va eseguita alla concentrazione più bassa dove non si osserva crescita. Ad oggi EUCAST ha stabilito i CBP solo per AMB e gli azoli (itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo) per alcune specie di *Aspergillus.*

Nella tabella 2 sono messi a confronto i valori di CBP con la metodica EUCAST e i valori di ECV del CLSI.

Antifungino	**Specie**	**EUCAST (v 7.0) BPC**			**CLSI (2011) ECV**
		S	**I**	**R**	**WT**
Itraconazolo	*A. flavus*	≤1	2	>2	≤1
	A. fumigatus	≤1	2	>2	≤1
	A. nidulans	≤1	2	>2	≤1
	A. niger	IE[1]	IE[1]	IE[21]	≤2
	A. terreus	≤1	2	>2	≤1
	A. versicolor	-	-	-	≤2
	Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
Voriconazolo	*A. flavus*	IE	IE	IE	≤1
	A. fumigatus	≤1	2	>2	≤1
	A. nidulans	IE	IE	IE	≤2
	A. niger	IE	IE	IE	≤2
	A. terreus	IE	**IE**	IE	≤1
	A. versicolor				≤2
	Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
Posaconazolo	*A. flavus*	IE[1]	IE[1]	IE[1]	≤0.5
	A. fumigatus	≤0.12	0.25	>0.25	≤0.5
	A. nidulans	IE[1]	IE[1]	IE[1]	≤1
	A. niger	IE[1]	IE[1]	IE[1]	≤1
	A. terreus	≤0.12	0.25	>0.25	≤0.5

	A. versicolor	-	-	-	≤4
	Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
AMB*	*A. flavus*	IE[2]	IE[2]	IE[2]	≤2
	A. fumigatus	≤1	2	>2	≤2
	A. nidulans	Nota[2]		Nota[2]	
	A. niger	≤1	2	>2	≤2
	A. terreus	-	-	-	≤4
	Specie non-correlate	IE	IE	IE	

Tabella 2.- CBP EUCAST e ECV CLSI (2011) (www.clsi.org) a confronto

*Nota[1]: I valori di ECV per queste specie sono generalmente 1 diluizione superiori rispetto a *A. fumigatus.*

*Nota[2]: Non ci sono i *breakpoint* perché i dati di MIC disponibili per stabilire l'ECV sono troppo limitati.

Per studiare la *performance* rispetto alla qualità del *test* (reagenti, terreno, inoculo e procedura) si raccomanda l'uso di ceppi per il controllo di qualità. EUCAST raccomanda, tra gli altri, i ceppi *A. fumigatus* ATCC 204305 ed *A. flavus* ATCC 204304. CLSI raccomanda, tra altri, l'uso dei ceppi *Paecilomyces variotii* ATCC MYA 3630 e *A. flavus* ATCC 204304. I valori di MIC ottenuti con questi ceppi devono essere compressi nei limiti segnalati nella tabella 3, secondo la metodica utilizzata.

Antifungino	*Paecilomyces variotii ATCC MYA 3630*	*A. flavus ATCC 204304*		*A. fumigatus ATCC 204305*
	CLSI	*EUCAST*	*CLSI*	*EUCAST*
Amfotericina B	1-4	0.5-2	0.5-4	0.25-1
Itraconazolo	0.06-0.5	0.12-0.5	0.25-0.5	0.12-0.5
Voriconazolo	0.015-0.12	0.5-2	0.5-4	0.25-1
Posaconazolo	0.03-0.25	0.12-0.5	0.06-0.5	0.03-0.25

Tabella 3.- *Intervalli di MIC accettabili (µg/mL) degli antifungini con i ceppi di controllo di qualità secondo le metodiche EUCAST e CLSI*

Quale corrispondenza hanno i metodi standardizzati con i sistemi commerciali per testare la sensibilità di *Aspergillus?*

È disponibile una discreta varietà di prodotti commerciali come l'Etest® (ThermoFisher Inc), Sensititre YeastOne® (bioMérieux s.a.) nonché pannelli per la disco diffusione: la maggior parte di questi test non sono però stati validati per l'antimicogramma di *Aspergillus*, anche se la maggior parte di questi metodi esprime una stima del valore di MIC entro tre doppie diluizioni, nel confronto dei metodi standardizzati.

- Etest® è un metodo appropriato per determinare la resistenza *in vitro* per itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo. Una migliore correlazione per AMB e l'itraconazolo si ha quando la lettura viene eseguita a 24 h, piuttosto che a 48 h, o quando sia visibile una crescita sufficiente. Per voriconazolo e posaconazolo 24 o 48 h. Punti di vista divergenti

per quanto riguarda l'amfotericina B. Le MICs dell'amfotericina B possono cambiare sostanzialmente a seconda della durata del periodo di incubazione (24 *vs* 48 h) (5).

- Sensititre YeastOne®: per *Aspergillus* spp. la *performance* è stata stabilita solo per amfotericina B, itraconazolo e voriconazolo. Sono state osservate leggere discrepanze in quanto si sono osservate MIC più alte con Sensititre YeastOne®. Per *A. flavus* la concordanza è però più bassa con itraconazolo e voriconazolo (7).
- La disco-diffusione è un metodo facile ma a volte i risultati sono contraddittori, se comparata alla microdiluizione in brodo. La correlazione è bassa per l'amfotericina B.

Quando eseguire l'antimicogramma per *Aspergillus*?

Secondo le diverse esperienze cliniche, il *test* di sensibilità agli antifungini di *Aspergillus* dovrebbe essere eseguito o per ottimizzare la terapia del singolo paziente o per finalità epidemiologiche. È raccomandato eseguire la MIC se il micete è stato isolato da materiale biologico in caso di infezioni profonde in pazienti sottoposti a terapia antifungina, in caso di fallimento terapeutico, quando la specie isolata è rara e/o emergente oppure in caso di particolari specie per le quali esiste il sospetto che possano essere resistenti o meno sensibili agli antifungini (9). I *test* di sensibilità agli antifungini possono essere inoltre eseguiti a fini epidemiologici.

Conclusioni

Identificare accuratamente la specie di *Aspergillus*

- In particolare in caso di:
  - ceppi isolati da pazienti infetti in terapia prolungata con gli azoli e/o
  - isolamento ricorrente di *Aspergillus* spp. e
  - nei ceppi isolati da pazienti con aspergillosi invasiva ed infezione con specie rare di *Aspergillus*.
- Metodiche standardizzate: EUCAST, CLSI (MBD) non sono ideali per la *routine* diagnostica (tecnicamente sono laboriose e richiedono esperienza) e sono raccomandate per laboratori specializzati.
- Non conviene testare i ceppi con elevata resistenza intrinseca (*A. terreus* e amfotericina B) ma determinare la MIC all'amfotericina B può essere utile in alcune specie come *A. flavus*.

Bibliografia

1. Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl.6):42-8.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of filamentous fungi. Approved standard.* M38-A2. Wayne PA. CLSI 2008.
3. Cuenca-Estrella M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. Clin Microbiol Infect 2014;20 (Suppl 6):54-9.
4. European Centre for Diseases Prevention and Control. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. Stockholm: ECDC; 2013.
5. Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. J Clin Microbiol 2002; 40:2101-7.
6. EUCAST AFST breakpoints and RDs for antifungal agents (*Candida* and *Aspergillus*) (v 7.0), 14-08-2014. http://www.eucast.org
7. Guinea J, Peláez T, Alcalá L et al. Comparison of Sensititre YeastOne with the NCCLS M38-A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56:53-5.
8. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis 2009; 15:1068-76
9. Lass-Florl C. Susceptibility testing in *Aspergillus* species complex. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl 6): 49-53.
10. Mortensen K.I. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30:1355-63.
11. Prigitano A, Vernier V, Cogliati M et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Northern Italy, May 2011 to June 2012. Euro surveil 2014; 19:pii=20747. www.eurosurveillance.org
12. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S et al. EUCAST definitive document E DEF 9.1: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentration of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect 2008; 14:982-4.
13. Van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. Clin Infect Dis 2013; 57:513-20.