

EUCAST-CLSI: differenze analitiche ed interpretative per i lieviti

EUCAST-CLSI for yeast: differences in methods and interpretation

Summary

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing have recently published standards for determining the susceptibility of fermentative yeast to antifungals. Both methods are based on broth dilution and methodological differences include glucose concentration, inoculum size, shape of microtitre wells (flat or round) and end-point reading (visual or spectrophotometric). EUCAST have published Clinical Breakpoints for Fluconazole and Voriconazole but not for echinocandins for the principal yeast species.

Lo Cascio G. CLSI - EUCAST for yeast: differences in methods and interpretation. *Trends Med* 2010; 10 (4):225-228.

©2010 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Key words:

**EUCAST-CLSI for yeast
yeast susceptibility tests
antifungals**

L'antimicogramma, così come l'antibiogramma, ha l'ambizioso obiettivo di a) guidare il clinico nella scelta del protocollo terapeutico più adeguato, b) fornire allarmi circa l'insorgenza di resistenze anomale il più precocemente possibile, c) dare informazioni sull'identificazione di specie, confermandola o meno, secondo l'evidenza di meccanismi di resistenza innata, d) fornire dati epidemiologici utili alla gestione della terapia empirica. La storia dell'antimicogramma è però più recente. Comincia nel 1982 quando si formò il primo comitato per la standardizzazione dell'antimicogramma dell'allora NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) (figura 1). Nel 1992 si ha la pubblicazione del primo documento provvisorio (M27-P) per l'esecuzione del saggio di sensibilità agli antimicotici in diluizione in brodo. In tale documento viene stabilito il tipo di terreno da utilizzare, RPMI-1640, con un'inoculo di $0,5-2,5 \times 10^3$

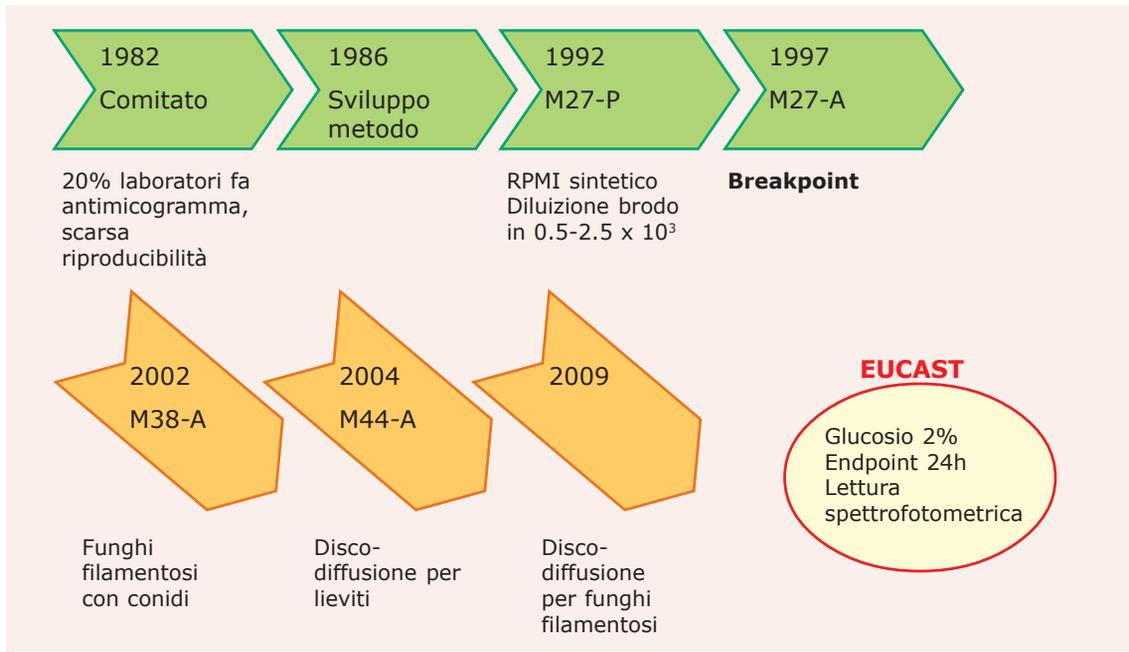
UFC/ml, con incubazione di 24-48h e lettura visiva. Nel 1997 viene approvato il primo documento definitivo (M27-A)¹ in cui vengono pubblicati i breakpoints per l'interpretazione della MIC di fluconazolo e itraconazolo nelle categorie di Sensibile, Sensibile-Dose Dipendente e Resistente. Solo nel 2002 si ha il primo documento approvato per la standardizzazione del saggio agli antimicotici per i funghi filamentosi produttori di conidi (M38-A)².

Contemporaneamente si sviluppa in Europa l'EUCAST AFST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Antifungal Susceptibilities Testing), che nel 2007 pubblica sul WEB i primi Breakpoint Clinici per Fluconazolo e nel 2008 quelli per Voriconazolo. Il metodo viene pubblicato nel 2008³ e le principali differenze rispetto al CLSI (tabella 1) consistono: nella quantità di glucosio presente nell'RPMI 1640, nella quantità di cellule usate per l'inoculo,



Giuliana Lo Cascio

Servizio di Microbiologia, virologia e immunologia
Policlinico G.B Rossi
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona
P.le Scuro, 10
37134 Verona
Tel. +39-045-8124682 - E-mail:
giuliana.locascio@ospedaleuniverona.it

Figura 1. Breve storia dell'antimicogramma.

nella modalità di lettura del risultato e nella utilizzazione di micro piastre a fondo piatto o a fondo tondo.

Nel documento CLSI M27-S3 del 2008 vengono stabiliti i criteri interpretativi delle MIC ottenute con il metodo in Microdiluzione per i principali antimicotici oggi sul mercato (tabella 2), comprese le echinocandine. I criteri interpretativi per i saggi di sensibilità agli antimicotici in agar diffusione vengono pubblicati nel settembre 2009 nel documento CLSI M44-A2 ed M44-S3. I breakpoint clinici (BPC) stabiliti dall'EUCAST sono notevolmente diversi da quelli CLSI (tabella 3), in particolare EUCAST pone il BPC di Sensibilità per Fluconazolo $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ e quello di Resistenza $\geq 4 \mu\text{g/ml}$, mentre per Voriconazolo $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ e quello di Resistenza $> 0.125 \mu\text{g/ml}$. Inoltre EUCAST specifica i BPC correlandoli alla specie fungina, pertanto su *Candida krusei* per Voriconazolo e su *Candida glabrata* non stabilisce alcun BPC non rilevando eviden-

ze scientifiche sufficienti a definirne alcuno. Non sono ancora stati definiti BPC per altre molecole oltre Fluconazolo e Voriconazolo, e collegandosi al sito www.EUCAST.org è possibile vedere la distribuzione delle MIC nelle diverse specie di lieviti; novità di EUCAST è la definizione di un nuovo parametro,

l'ECOFF (Epidemiological Cut-Off), MIC al di sotto della quale non dovrebbero esistere ceppi con meccanismi di resistenza. Per quanto riguarda le Echinocandine, Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina, vi sono al momento studi di comparazione CLSI e EUCAST per le diverse tecniche di allestimento del-

Tabella 1. Differenze fra i metodi CLSI ed EUCAST per i Lieviti.

CLSI	EUCAST
METODICA Macro - Microdiluzione Fondo tondo	Microdiluzione Fondo piatto
TERRENO RPMI con 0.2% glucosio	RPMI con il 2% di glucosio
INOCULO $0,5-2,5 \times 10^3$ CFU/mL	$1-5 \times 10^5$ CFU/mL
INCUBAZIONE 24-48 ore	24 ore
LETTURA Visiva	Spettrofotometrica
BREAKPOINTS Triazoli, flucitosina, echinocandine	Fluconazolo, voriconazolo

Tabella 2. CLSI M27-S3 (2008), M44-S3 (2009): criteri interpretativi dei saggi di suscettibilità agli antimicotici, metodo in micro diluizione in brodo e metodo in agar-diffusione.

Farmaco	Sensibile		Sensibile Dose Dipendente		Intermedio		Resistente	
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	mm	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	mm	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	mm	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	mm
Fluconazolo	≤ 8	≥ 19	16-32	15-18			> 64	≤ 14
Itraconazolo	$\leq 0,125$	ND	0,25-0,5	ND			≥ 1	ND
Voriconazolo	≤ 1	≥ 17	2	14-16			≥ 4	≤ 13
5-Fluorocitosina	≤ 4	ND			8-16	ND	≥ 32	ND
Anidulafungina	≤ 2	ND	ND	ND			≥ 2 (non suscettibile)	ND
Caspofungina	≤ 2	ND	ND	ND			≥ 2 (non suscettibile)	ND
Micafungina	≤ 2	ND	ND	ND			≥ 2 (non suscettibile)	ND

Tabella 3. Interpretazione dei risultati dei saggi *in vitro* per *Candida* spp. Secondo EUCAST EDef 7.1.

	Fluconazolo	Voriconazolo
<i>Candida albicans</i>	$\leq 2S/\geq 4R$	$\leq 0.125S/ > 0.125R$
<i>Candida tropicalis</i>	$\leq 2S/\geq 4R$	$\leq 0.125S/ > 0.125R$
<i>Candida parapsilosis</i>	$\leq 2S/\geq 4R$	$\leq 0.125S/ > 0.125R$
<i>Candida glabrata</i>	EI	EI
<i>Candida krusei</i>	Resistenza innata	EI
NON specie correlabile	$\leq 2S/\geq 4R$	ND

EI: Evidenza insufficiente dei dati per giustificare l'uso del farmaco per infezioni causate da queste specie.
ND: Non determinati per scarsità dei dati e variabilità cinetica della molecola

l'antimicogramma⁴, che evidenzerebbero come metodi che danno la migliore "performance" l'Agar diluizione con RPMI-2G (RPMI con Glucosio al 2%) ed il metodo EUCAST Edef 7.1. I BPC per le Echinocandine sono in corso di pubblicazione e pertanto al momento non sono disponibili. In conclusione si evidenzia che per EUCAST rimangono ancora da definire i Breakpoints Clinici specie-specifici per tutte le classi di antimicotici, informazione ormai necessaria per dare risposte utili al Clinico, che oggi ha a disposizione una scelta diversificata per il trattamento

delle micosi invasive. E' comunque evidente che i Breakpoint Clinici di EUCAST sono tendenzialmente più bassi di quelli attualmente stabiliti da CLSI.

La valutazione delle diverse metodologie con cui è possibile eseguire il saggio di sensibilità *in vitro* agli antimicotici ha evidenziato che nessun metodo è perfetto. CLSI, EUCAST con RPMI -2G, ed e-test sono metodi appropriati a rilevare in buona percentuale anche meccanismi di resistenza non espressi completamente, risultati meno confortanti si hanno invece con l'agar-diffusione. E' stato anche

effettuata una valutazione del metodo automatizzato Vitek⁵ che evidenzia un buon livello di correlazione con il metodo EUCAST (ICC-intraclass correlation coefficient: >95%).

L'interpretazione ragionata dell'antimicogramma deve condurre il clinico ed il microbiologo al trattamento più appropriato possibile considerando il paziente, la patologia, il patogeno e la sua sensibilità *in vitro*, nello sforzo di evitare l'insorgenza di resistenze in specie fungine epidemiologicamente sensibili, e l'emergenza di specie fungine "naturalmente" resistenti. **TiM**

Bibliografía

1. **National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. NCCLS M27-A. NCCLS, Wayne, PA.
2. **National Committee for Clinical and Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. NCCLS M38-A. NCCLS, Wayne, PA.
3. **Rodriguez-Tudela, JL, Arendrup MC, Barchiesi F, et al.** EUCAST Definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeast. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:398-405.
4. **Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, et al.** Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species: Comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, Disk Diffusion, and Agar Dilution Methods with RPMI and IsoSensitest Media. *AAC* 2010; 54:426-439.
5. **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. *JCM* 2010; 48:1782-1786.