

## Έλεγχος ευαισθησίας υφομυκήτων: *Aspergillus*

Ιωσήφ Μελετιάδης, Ph. D.  
Επικ. Καθηγητής Μικροβιολογίας

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας,  
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν»,  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τηλ: 210-583-1909, Email: jmeletiadis@med.uoa.gr

## Αντιμυκητικά φάρμακα

**Κυτταρική μεμβράνη (εργοστερόλη)**  
- Πολυένια → αμφοτερικίνη Β  
- Αζόλες → φλουконаζόλη, ιτρακοναζόλη, ποσακοναζόλη, βορικοναζόλη, ισαβουκοναζόλη

**Νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA)**  
- 5-φθοριοκυτοσίνη  
Olorofim (F901318)

**Κυτταρικό τείνωμα (β-D-γλυκαν συνθετάση)**  
Εχινοκανδίνες → κασποφουγκίνη, ανιτυλαφουγκίνη, μικαφουγκίνη  
Rezafungin (CD101), Ibrexafungerp (SCY079)

Ειδροσώσης VL-2397

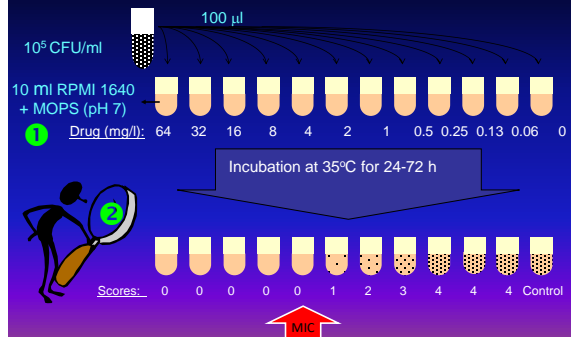
Atlas of Fungal Infections, Richard Diamond Ed. 1999, Introduction to Medical Mycology, Merck and Co. 2001

## Γιατί πρέπει να ελέγχουμε την ευαισθησία των μυκήτων?

- Διαφορετικά προφίλ ευαισθησίας  
- μεταξύ στελεχών, μεταξύ ειδών
- Μεταβαλλόμενη επιδημιολογία λοιμώξεων  
- νέα είδη με ενδογενή αντοχή  
- επίκτητη αντοχή ευαίσθητων ειδών
- Πολλά φάρμακα – περισσότερες επιλογές  
- Βελτιστοποίηση θεραπείας
- Ανακάλυψη νέων φαρμάκων
- Πρόβλεψη κλινικού αποτελέσματος

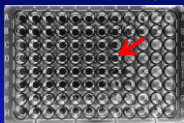
Tunali et al. Expert Opin Emerg Drugs. 2006;11(2):291-300.  
Maertens et al. Crit Care Med. 2002;30:81-81.

## Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (ΕΑΣ) Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

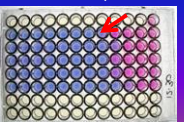


## Δοκιμασίες ευαισθησίας

Μικροαραιώσεις σε ζωμό  
(πρότυπες μεθοδολογίες κατά CLSI και EUCAST)



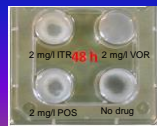
Χρωματρικές  
Yeast one, XTT



Διάχυση σε άγαρ  
(δισκία, διαβαθμισμένες ταινίες)



Διάλυση σε άγαρ



MIC= Minimal Inhibitory Concentration

ΕΑΣ= Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση

## Μέθοδοι αναφοράς

### CLSI

- M27-A3 Broth micro/macro-dilution for yeasts
- M38-A2 Broth Micro/macro-dilution for moulds
- M44-A2 Disk diffusion for yeasts
- M51-A Disk diffusion for moulds

### EUCAST

- E.def. 7.3 Broth microdilution for yeasts
- E.def. 9.3 Broth microdilution for moulds
- E.Def. 10.1 Agar screening method for azole resistance in *Aspergillus fumigatus*

### Πρότυπες μέθοδοι μικροαραιώσεων σε ζωμό για υφομύκητες

Πρωτόκολλο	CLSI M38-A3	EUCAST-E.Def 9.3
Τύπος μικροπλάκας	U-shaped 96-well plate	Flat-bottom 96-well plate
Θρεπτικό μέσο	RPMI1640+ MOPS pH 7.0 0.2% glucose	RPMI1640+ MOPS pH 7.0+ <b>2% γλυκόζη</b>
Διαλύτης	DMSO, 1%	DMSO, <b>0.5%</b>
Θερμοκρασία	35-37°C	
Εναιώρημα (CFU/ml)	1% Tween20, Θολερότητα 0.5-2.5 10 <sup>4</sup> (1-3x10 <sup>3</sup> για δερματόφυτα)	<b>0.1% Tween20, Αμοκτυ/μετρο</b> (Θολερότητα για <i>Aspergillus</i> ) <b>0.5-2.5x10<sup>5</sup></b>
Επίωση	24h για Zygomycetes 48h για <i>Aspergillus</i> και ληπούς υφομύκητες 72h για <i>Scedosporium</i>	
Ανάγνωση	Οπτική με την βοήθεια μεγεθυντικού καθρέπτη	Οπτική (φωτομετρικά)
MIC Endpoints- % αναστολής	100% (AMB, και αζόλες), MEC (εχινοκανδίνες) 50%/80% (FLU, FC, KET, PCO, GRIS, TB)	

### Οπτική ανάγνωση μικροπλάκων μεθοδολογία EUCAST

Χρήση ασπράουρου χαρτί

Μικροσκοπική παρατήρηση

Growth control ANI 0.06mg/ml

EUCAST E DEF 9.3

### Πρότυπα στελέχη για εσωτερικό έλεγχο ποιότητας

European Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST AFST)

Routine and extended internal quality control for antifungal susceptibility as recommended by EUCAST

Version 2.0, valid from 22<sup>nd</sup> of June, 2018

Routine quality control	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258 *																																				
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Antifungal Agent</th> <th colspan="2">MIC (mg/L) <sup>b</sup></th> </tr> <tr> <th>Target</th> <th>Range</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Amphotericin B</td> <td>0.25-0.5</td> <td>0.125-1.0</td> </tr> <tr> <td>Anidulafungin</td> <td>0.03</td> <td>0.015-0.06</td> </tr> <tr> <td>Caspofungin</td> <td>NA<sup>a</sup></td> <td>NA<sup>a</sup></td> </tr> <tr> <td>Fluconazole</td> <td>32.0</td> <td>16.0-64.0</td> </tr> <tr> <td>Flucytosine</td> <td>2.0</td> <td>1.0-4.0</td> </tr> <tr> <td>Isoavuconazole</td> <td>0.03</td> <td>0.015-0.06</td> </tr> <tr> <td>Itraconazole</td> <td>0.06</td> <td>0.03-0.125</td> </tr> <tr> <td>Micafungin</td> <td>0.06</td> <td>0.03-0.125</td> </tr> <tr> <td>Voriconazole</td> <td>0.06-0.125</td> <td>0.03-0.25</td> </tr> <tr> <td>Posaconazole</td> <td>0.03</td> <td>0.015-0.06</td> </tr> </tbody> </table>	Antifungal Agent	MIC (mg/L) <sup>b</sup>		Target	Range		Amphotericin B	0.25-0.5	0.125-1.0	Anidulafungin	0.03	0.015-0.06	Caspofungin	NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	Fluconazole	32.0	16.0-64.0	Flucytosine	2.0	1.0-4.0	Isoavuconazole	0.03	0.015-0.06	Itraconazole	0.06	0.03-0.125	Micafungin	0.06	0.03-0.125	Voriconazole	0.06-0.125	0.03-0.25	Posaconazole	0.03	0.015-0.06
Antifungal Agent		MIC (mg/L) <sup>b</sup>																																			
Target		Range																																			
Amphotericin B		0.25-0.5	0.125-1.0																																		
Anidulafungin		0.03	0.015-0.06																																		
Caspofungin		NA <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>																																		
Fluconazole		32.0	16.0-64.0																																		
Flucytosine		2.0	1.0-4.0																																		
Isoavuconazole		0.03	0.015-0.06																																		
Itraconazole		0.06	0.03-0.125																																		
Micafungin		0.06	0.03-0.125																																		
Voriconazole		0.06-0.125	0.03-0.25																																		
Posaconazole	0.03	0.015-0.06																																			
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019																																					
<i>Candida albicans</i> CNM-CL F8555																																					
<i>Candida krusei</i> CNM-CL-3403																																					
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305																																					
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304																																					
<i>Aspergillus flavus</i> CNM-CM-1813																																					
<i>A. fumigatus</i> SSI-4524																																					
<i>A. fumigatus</i> SSI-5586																																					

http://www.euCAST.org/

### Φωτομετρική ανάγνωση μικροπλάκων μεθοδολογία EUCAST για *Aspergillus spp.*

Απορρόφηση στα 490nm

	PRC	ISAVU	VOR	ITR	TEBU	Kontrol
A	0.103	0.103	0.102	0.118	0.1	0.778
B	0.099	0.096	0.101	0.105	0.103	0.856
C	0.095	0.094	0.096	0.099	0.11	0.694
D	0.101	0.105	0.101	0.096	0.137	0.699
E	0.098	0.106	0.102	0.11	0.796	0.762
F	0.089	0.158	0.151	0.127	0.975	0.58
G	0.107	0.884	0.948	0.526	0.877	0.8
H	0.804	0.838	0.878	0.907	0.878	0.775
MIC	0.06	0.25	0.25	0.25	1	1

Ποσοστά ανάπτυξης

	PRC	ISAVU	VOR	ITR	TEBU	Kontrol
A	0%	0%	0%	2%	0%	100%
B	-1%	-1%	0%	0%	0%	100%
C	-1%	-1%	-1%	-1%	1%	100%
D	0%	1%	0%	-1%	6%	100%
E	-1%	0%	0%	0%	106%	100%
F	-2%	9%	8%	4%	139%	100%
G	1%	92%	134%	68%	123%	100%
H	172%	117%	123%	126%	123%	100%
MIC	0.0523	0.25	0.25	0.25	1	1

Endpoints:  
<10% απορρόφηση OD<sub>490</sub>

Συμφωνία:  
92-99% με την οπτική ανάγνωση

Σφάλματα:  
0% πολύ μεγάλα (VME), <3% μεγάλα (ME)  
<6% μικρά (MIE)

New E. Def 9.4

Meletiadis et al, CMI 2016

### Ελάχιστη Αποτελεσματική Συγκέντρωση (minimal effective concentration, MEC) κατά CLSI εχινοκανδινών έναντι υφομυκήτων

Caspofungin (μg/mL)

32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.13 0.06 0.03 No

MEC

- No traditional MIC (complete inhibition of growth)
- The Minimum Effective Concentration (MEC) reflects morphological Effects
- CLSIM38A: MIC endpoint → prominent reduction of growth (50%)

Kurtz et al. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38(7):1480-1489.

### Ελάχιστη Αποτελεσματική Συγκέντρωση (minimal effective concentration, MEC) κατά EUCAST εχινοκανδινών έναντι υφομυκήτων

Εναιώρημα

10<sup>6</sup> CFU/ml

10<sup>4</sup> CFU/ml

10<sup>3</sup> CFU/ml

10<sup>2</sup> CFU/ml

Οπτική ανάγνωση

Φωτομετρική ανάγνωση

## XTT assay for echinocandin EUCAST AFST of *Aspergillus* spp

1. EUCAST E.Def 9.3 for 24h
2. Add XTT/MEN 400mg/l+6.25μM
3. Incubate for 1h, read at 450/630nm

**Susceptible isolate**

ANI→

MIC→

CAS→

**Resistant isolate**

ANI→

MIC→

CAS→

Colorimetric concentration-effect curves

% of metabolic activity

Anidulafungin concentration (mg/L)

- *A. fumigatus* (MEC=0.015)
- *A. flavus* (MEC=0.125)
- *A. terreus* (MEC=0.004)
- *A. niger* (MEC=0.015)
- *A. fumigatus* (MEC=32)

Meliadis JAC2020

## CLSI μέθοδοι με δισκία διάχυσης σε άγαρ

### Για υφομύκητες (M51A)

Parameter	Comment
Test medium	Plain Mueller-Hinton agar
Test medium pH	7.2-7.4
Stock inoculum preparation	Stock inoculum suspension from 7-day cultures grown on potato dextrose agar and adjusted spectrophotometrically (530 nm) to an optical density ranging from 0.09 to 0.30 (1x10 <sup>6</sup> CFU/ml)
Inoculum size	0.4-5.5 × 10 <sup>6</sup> cfu/ml
Temperature and incubation time	25°C For <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , and <i>Aspergillus niger</i> : 24 h For zygomycetes: 16-24 h For other moulds: 24-72 h
Disk content	Amphotericin B: 10 μg → Μόνο για Ζυγομύκητες Caspofungin: 5 μg Itraconazole: 10 μg → Όχι για Ζυγομύκητες Posaconazole: 5 μg Voriconazole: 1 μg
Measurement of zone inhibition	Measure to the nearest whole millimeter at the point at which there is prominent reduction in growth (80%) For caspofungin, ignore microcolonies inside the zone of inhibition For triazoles, ignore hyphal filaments bending over the inhibition zone and slight trailing around the edge
Tentative in vitro breakpoints	Triazoles and caspofungin: R ≤ 13 mm (MIC or MEC ≤ 4 mg/l); I = 14-16 mm (MIC or MEC = 2 mg/l); S ≤ 17 mm (MIC or MEC ≤ 1 mg/l) Amphotericin B: R ≤ 12 mm (MIC ≤ 4 mg/l); I = 13-14 mm (MIC = 2 mg/l); S ≤ 15 mm (MIC ≤ 1 mg/l)
Reference-control strains	<i>Paeclomyces variotii</i> ATCC, MYA-3630, <i>Candida krusei</i> ATCC, MYA-6258

VME 10-30%

Espiner-Hingrol et al. Curr Fungal Infect Rep 2012

## Μέθοδος διάλυσης σε άγαρ κατά EUCAST για αζόλες και *Aspergillus*

New E. Def 10.2

- Απλή διαδικασία
  - Ενοφθαλμισμός 25μl κονιδίων 0.5 McFarland
- Γρήγορο αποτέλεσμα
  - Επώαση στους 35-37°C για 48 ώρες (ανάπτυξη στις 24h→αντοχή)
- Ευκόλη ανάγνωση
  - Οπτική παρατήρηση για παρουσία ανάπτυξης κάθε βαθμού
  - 86%–99% συμφωνία μεταξύ παρατηρητών και κέντρων
- ✓ Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 99% (95%–100%) στην ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών μόνο με έλεγχο σε ITC/VRC
- Δυνατότητα ενσωμάτωσης 3<sup>ου</sup> φαρμάκου
- ✓ Ανίχνευση αντοχής μικών αποικιών 5S:1R

***A. fumigatus* G54W**

***A. fumigatus* TR34/L98H**

Arendrup et al JAC 2016

## Μέθοδος διάλυσης σε άγαρ κατά EUCAST για εχικονανδίνες και *Aspergillus*

New E. Def 10.2

**Πολυκεντρική μελέτη (3 κέντρα)**

- 4 well assay (0.25 mg/L anidulafungin, 1 mg/L caspofungin and 0.125 mg/L micafungin)
- 40 WT isolates (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* + 4 non-WT *A. fumigatus*)

- ✓ All centres successfully discriminated non-WT and WT strains even after 24 h (100% sensitivity/specificity).
- ✓ Anidulafungin produced the clearest endpoints.

***A. fumigatus* NWT DPL1035homo**

CAS

ANI

MIC

GC

		48h incubation	
		Caspofungin (1 mg/l)	Drug-free control
<i>A. fumigatus</i> (S)	compact colony		
	fluffy colony		
<i>A. fumigatus</i> (R)	fluffy colony		
	fluffy colony		

## Εμπορικά τεστ για υφομύκητες

- Χρωματομετρική μέθοδος μικροαραιώσεων
  - Sensititre YeastOne
- Ταίνιες με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις φαρμάκων
  - Etest, MTS

## Sensititre YeastOne

**SENSITITRE<sup>®</sup> YeastOne [YO10]**  
Microbroth dilution MIC test

Drug	MIC (μg/ml)
+ve control	0.06
Andul 0.015-8	0.125
Mica 0.008-8	0.125
Caspo 0.008-8	0.125
SFC 0.06-64	0.125
Posa 0.008-8	0.125
Vori 0.008-8	0.125
Itra 0.015-16	0.25
Flu 0.125-256	32

*Candida krusei*

- CLSI-based colorimetric MBD assay
  - Alamar blue indicator
  - 0.5 McF initial inoculum
  - RPMI with 0.2% glucose
  - Round bottom wells
  - 24-48 h incubation, 35°C incubation
  - Up to 9 antifungals (YO10)
  - Minimal QC, Long shelf life, easy to set up

GC Low → High

Drug concentrations

Red = growth, Purple = growth inhibition, Blue = no growth

Candida → Azoles, Echinocandins, FC Amphotericin B



## Εργαστηριακός έλεγχος ευαισθησίας υφομυκήτων

*Fusarium* spp.

**Sensititre YeastOne**

**EUCAST E.Def 9.2**

Species	Test method	Range	Mode(s)	% EA
<i>A. fumigatus</i> (21)	SYO	0.06 to 1	1	100
	CLSI	=0.03 to 2	1	
<i>A. flavus</i> (19)	SYO	0.06 to 0.125	0.125	100
	CLSI	=0.03 to 0.25	0.125	
<i>A. terreus</i> (12)	SYO	0.06 to 0.125	0.06	100
	CLSI	=0.03 to 0.25	0.25	

\* υπέρ

## Εργαστηριακός έλεγχος ευαισθησίας με Sensititre YeastOne αζόλες και ασπέργιλλος

Σύγκριση CLSI με Sensititre YeastOne για αζόλες και *Aspergillus* (10 ανεξλεκτικά στελέχη)

TABLE 2 Comparison of *in vitro* activities of posaconazole, voriconazole, and itraconazole tested against *Aspergillus* species by SYO and CLSI methods<sup>a</sup>

Species (no. of isolates tested) <sup>b</sup>	Test method	MIC (μg/ml)			VRC			ITC		
		Range	Mode(s)	% EA	Range	Mode(s)	% EA	Range	Mode(s)	% EA
<i>A. fumigatus</i> (21)	SYO	0.06 to 1	1	100	0.125 to >8	0.25	100	0.125 to >8	0.25	95.2
	CLSI	=0.03 to 2	1		0.06 to >8	0.125		0.25 to >8	1	
<i>A. flavus</i> (19)	SYO	0.06 to 0.125	0.125	100	0.125 to 1	0.25	100	0.03 to 0.25	0.06	94.7
	CLSI	=0.03 to 0.25	0.125		0.06 to 0.25	0.125		0.06 to 0.5	0.125	
<i>A. terreus</i> (12)	SYO	0.06 to 0.125	0.06	100	0.06 to 0.25	0.125	100	0.06 to 0.25	0.125	91.7
	CLSI	=0.03 to 0.25	0.25		0.06 to 0.125	0.06		0.125 to 0.5	0.25	

Κατηγορική συμφωνία = 94-98%

Οπτική παρατήρηση παρουσία ανάπτυξης κάθε βοθρίου ανεξάρτητα του χρώματος

Mello AAC 2017

## Εργαστηριακός έλεγχος ευαισθησίας υφομυκήτων

Εχινοκανδίνες και ασπέργιλλος

*A. flavus*

*A. fumigatus* susceptible

*A. fumigatus* resistant

*A. terreus*

Συμφωνία=0/24/23% για CAS και 67/88/0% για MCF για τα 3 είδη

x MEC  
Slopi JCM 2017

## Etest για υφομύκητες

Blood, CSF, sterile body fluids, and tissues, aseptic/sterile, primary and antimicrobial trials.

**Agar Medium:** RPM2 - 2% plasma + MDPH agar for all agents.  
**Alternative:** When using other media, a modified version may be used; refer to QC to assess MIC values for QC and adjust as needed.  
**Important:** This is a commercial Etest strip, not for the product (antibiotic) and product QC. To ensure that quality specifications are met, contact QC to verify the use of media and buffer volume growth 5.0 μg volume with Yeast One.  
**Incubation:** 1.5 h at 37°C for *Aspergillus* spp. and 1 h at 37°C for *Fusarium* and *Trichoderma* spp.  
**Incubation:** 37°C (use in specially labeled plastic bags) within 24-72h, depending on the genus.  
**Guidelines:**  
*Aspergillus* spp.: 16-24h  
*Fusarium* spp.: 15°C-24-48h followed by auto temperature for another 24-48h  
*Trichoderma* spp.: 16-24h  
 For other species, extend incubation time as needed and inspect plates daily for growth and presence of an inhibition ellipse.

Package insert, product labels, Cusum Information Sheet (CIS 905), Etest Technical Guide (ETG-010), Media Incubation Instructions, Reading and Trouble Shooting charts and Etest reference list.

*C. glabrata*  
Etest C-29414<sup>®</sup>

*A. terreus*  
Etest C-29414<sup>®</sup>

*A. fumigatus*  
Etest C-29414<sup>®</sup>

**Reading**

1. Reading time is genus dependent, e.g. 18-24 hours is sufficient for *Aspergillus* spp. since longer incubation gives overgrowth.
2. Precise by reading plates after varying periods of 1 to 3 days to become familiar with growth and endpoint appearance.
3. Make the first MIC reading at 20-24 hours and the second at 48 hours. Slow growers may require up to 72 hours or longer before enough growth is obtained.
4. Read the MIC where the inhibition ellipse intersects the MIC scale.
5. Ignore filaments bending over into the ellipse, usually caused by overgrowth when incubation is prolonged.

Ευαισθησία σε αυξημένη έκθεση (EAE) Susceptible increased exposure (I) Αναφέρεται στο αντιμικρογράμμα

Περιοχή τεχνικής αβεβαιότητας (ΠΤΑ) Area of Technical Uncertainty (ATU) ΔΕΝ Αναφέρεται στο αντιμικρογράμμα

## Etest για υφομύκητες

TABLE 2 Essential agreement between CLSI microdilution and Etest results

Species	Essential agreement (%) <sup>a</sup>				
	AMB	VCZ	POS	CSP	MCF
<i>A. fumigatus</i> (n = 24)	99	95	89 <sup>b</sup>	96	100
<i>A. flavus</i> (n = 29)	97	100	83 <sup>b</sup>	100	100
<i>A. terreus</i> (n = 25)	16 <sup>b</sup>	100	64 <sup>b</sup>	96	100
<i>A. niger</i> (n = 12)	100	100	83 <sup>b</sup>	100	100
<i>A. nidulans</i> (n = 8)	100	100	14 <sup>b</sup>	57 <sup>b</sup>	
<i>A. versicolor</i> (n = 6)	100	100	100	89 <sup>b</sup>	100
<i>Mucoromycetina</i> (n = 35)	91	100	94	100	100
<i>Fusarium</i> spp. (n = 34)	94	100	100	100	100
<i>S. apiospermum</i> (n = 20)	80 <sup>b</sup>	90	80	63 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>
<i>S. proliferans</i> (n = 5)	100	100	100	100	100
<i>P. blazium</i> (n = 30)	100	100	97	100	100
<i>P. variotii</i> (n = 4)	100	100	100	50 <sup>b</sup>	100
<i>Sporidiobolus</i> spp. (n = 8)	75 <sup>b</sup>	100	100	43 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Essential agreement was within 2.2 dilutions. AMB, amphotericin B; VCZ, voriconazole; POS, posaconazole; CSP, caspofungin; MCF, micafungin.

<sup>b</sup> Essential agreement of <90% for MIC/MEC values obtained with the Etest and BMD methods.

TABLE 3 Proposed recommendations for use of the Etest method for antifungal susceptibility testing of molds

Drug	<i>Aspergillus</i> spp.	Non- <i>Aspergillus</i> spp. <sup>a</sup>
Amphotericin B	Yes; exception: <i>A. terreus</i>	Yes; exceptions: <i>S. apiospermum</i> and <i>Sporidiobolus</i> spp.
Voriconazole	Yes; caveat: ability to detect azole-resistant isolates not yet proven	Yes
Posaconazole	No (or use with extreme caution); lower MICs with Etest vs BMD	Yes
Caspofungin/micafungin	Yes; exception: <i>A. nidulans</i> (poor agreement with BMD for this species, which demonstrated MICs across the testing range)	Yes; exceptions: <i>S. apiospermum</i> , <i>P. variotii</i> , and <i>Sporidiobolus</i> spp. (poor agreement with BMD for these species, which demonstrated MICs across the testing range)

<sup>a</sup> *Mucoromycetina*, *Fusarium* spp., *S. apiospermum*, *S. proliferans*, *P. blazium*, *P. variotii*, and *Sporidiobolus* spp.

Lamoth JCM 2015

## Αναθέρωση ορισμών EUCAST

1. Το κλινικό όριο «Ε» σχετίζεται με την καθιερωμένη δοσολογία του φαρμάκου
2. Η ενδιάμεση ευαισθησία «I» σημαίνει:
  - Μειωμένη ευαισθησία που μπορεί να ξεπεραστεί με αυξημένη έκθεση στο φάρμακο λόγω
    - i. συγκέντρωσης του φαρμάκου στην εστία της λοίμωξης
    - ii. αλλαγής δοσολογικού σχήματος
  - Ουδέτερη ζώνη (buffer zone) για την αποφυγή μεγάλων και πολύ μεγάλων σφαλμάτων

Ευαισθησία σε αυξημένη έκθεση (EAE) Susceptible increased exposure (I) Αναφέρεται στο αντιμικρογράμμα

Περιοχή τεχνικής αβεβαιότητας (ΠΤΑ) Area of Technical Uncertainty (ATU) ΔΕΝ Αναφέρεται στο αντιμικρογράμμα

## Νέα κλινικά όρια ευαισθησίας για *Aspergillus spp.*

Antifungal agent	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>			<i>A. niger</i>			<i>A. terreus</i>		
	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	S ≤	R >	ATU	
Amphotericin B	—	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	
Isoconazole <sup>(a)</sup>	1	2	2 <sup>(b)</sup>	1	2	2 <sup>(b)</sup>	0.25	0.25	—	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	
Itraconazole <sup>(a)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	
Posaconazole <sup>(a)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	0.125	0.25	0.25	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	0.125	0.25	0.25	
Voriconazole <sup>(a)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	1	1	2 <sup>(b)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	1 <sup>(c)</sup>	

- d. **Isoconazole**. If voriconazole wildtype, report as isavuconazole S
- g. **Itraconazole**. Report as R with the following comment: In some clinical situations (non-invasive infections forms) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured.
- i. **Posaconazole**. If S to itraconazole: report as S with the comment: The MIC is 0.25 mg/L and thus one dilution above the S breakpoint due to overlapping wt and non-wt populations.  
If not S to itraconazole: report as R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs.
- j. **Voriconazole**. Report as R with the following comment: In some clinical situations (non-invasive infections forms) voriconazole can be used provided sufficient exposure is ensured.

Arendrup Clin Microbiol Infect. 2020

## Επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας κατά EUCAST για υφομύκητες

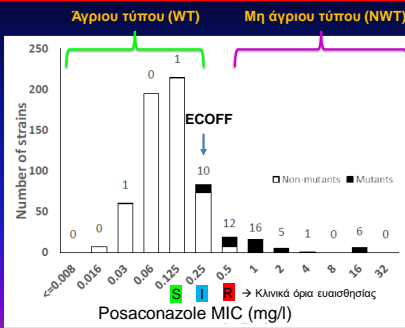
Table 5 Summary table of current EUCAST ECOFFs (WT ≤; mg/L, in blue) and susceptibility breakpoints (S ≤; mg/L, in black) for *Aspergillus* species, and *Fusarium* species. Tentative ECOFFs are indicated in brackets

Drug	Species						
	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Fusarium (Gibberella) fujikuroi</i> SC	<i>Fusarium solani</i> SC
Amphotericin B	WT ≤	4	1	[4]	[0.5]	8	[8]
	S ≤	—	1	—	1	—	[8]
Isavuconazole	WT ≤	2	2	0.25	4	1	—
	S ≤	1	1	0.25	ND	1	—
Itraconazole	WT ≤	1	1	1	4	0.5	—
	S ≤	1	1	1	ND	1	—
Posaconazole	WT ≤	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	—
	S ≤	ND	0.125	ND	ND	0.125	—
Voriconazole	WT ≤	2	1	1	2	2	—
	S ≤	ND	1	1	ND	ND	—

Περισσότερα επιδημιολογικά όρια (ECV) από CLSI

Espinel-Ingroff. Rev. Iberoam. Micro. 2016;33(2):63-75

## Επιδημιολογικό όριο ευαισθησίας ποσακοναζόλης έναντι *A. fumigatus*



Espinel-Ingroff AAC 2018

## Εν κατακλείδι.....

- ✓ Οι πρότυπες μεθοδολογίες απαιτούν **μεγάλη εξειδίκευση και εμπειρία** για την εφαρμογή τους
  - Οι πρότυπες γρήγορες δοκιμασίες ανίχνευσης αντοχής (screening test) είναι πιο εύκολα εφαρμόσιμες
- ✓ Κλινικά όρια ευαισθησίας υπάρχουν **μόνο για συγκεκριμένα φάρμακα και είδη *Aspergillus***
  - Προσοχή στα αναθεωρημένα κλινικά όρια και ειδικά στην ΠΤΑ
- ✓ Για τα υπόλοιπα είδη και φάρμακα **δεν μπορεί να γίνει κλινική αξιολόγηση** της ευαισθησίας παρά μόνο η κατηγοριοποίησή τους σε άγριου τύπου και μη άγριου τύπου με βάση επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας

**Μη άγριου τύπου επιτόξεως**  
Στέλεχος με φαινοτυπικά ανιχνεύσιμη ανιχνεύσιμη αντοχή → R

**Άγριου τύπου**  
Στέλεχος χωρίς φαινοτυπικά ανιχνεύσιμη αντοχή → S ή R  
Χρήση κλινικών ορίων ευαισθησίας για παρόμοια είδη *Aspergillus*

- ✓ Προσοχή στην εφαρμογή κλινικών ορίων ευαισθησίας κατά EUCAST σε εμπειρικά τεστ που **δεν δίνουν παραρμόσιμους τιμές MIC**

