

Antimicogramma per *Aspergillus* species complex nel laboratorio clinico: come eseguirlo, quando eseguirlo e come interpretarlo

Esther Manso,^{1,2} Claudio Farina,^{1,3} Stefano Andreoni,^{1,4} Elisabetta Blasi,^{1,5} Marco Conte,^{1,6} Paolo Fazii,^{1,7} Gianluigi Lombardi,^{1,8} Silvana Sanna^{1,9}

¹Comitato di Studio per la Micologia (CoSM), Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Milano, Italy; ²Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, Italy; ³USC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera "Papa Giovanni XXIII", Bergamo, Italy; ⁴Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria "Maggiore della Carità di Novara", Italy; ⁵Dipartimento di Medicina Diagnostica, Clinica e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy; ⁶Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera Specialistica dei Colli "Monaldi-Cotugno-CTO", Napoli, Italy; ⁷Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Civile "Santo Spirito", Pescara, Italy; ⁸Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Azienda Ospedaliera "Niguarda - Ca' Granda", Milano, Italy; ⁹Servizio di Microbiologia Clinica, Azienda Ospedaliera-Universitaria "Sassari", Italy

Summary

Antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species complex in the Clinical Laboratory: how to do it, when to do it, and how to interpret it.

The emergence of drug resistance in fungal pathogens has a profound impact on human health given limited number of antifungal drugs. Antifungal resistance in *Aspergillus* spp. infection can be encountered in the antifungal drug-exposed patient due to selection of intrinsically resistant species or isolates with acquired resistance belonging to species that are normally susceptible. Resistance to triazoles is not common in *Aspergillus* spp., however, triazole resistance in

A. fumigatus appears to be increasing in several European countries in recent years and can be clinically relevant. The Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing have developed breakpoints and epidemiological cutoff values that are now established for *Aspergillus* spp. Clinical microbiology laboratories will be employed commercial susceptibility assays, rather than reference broth microdilution methods and comparative studies are particularly important.

Introduzione

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 stipti 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

Correspondence: Esther Manso, Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, Via Conca 71, 60126 Ancona, Italy.
Tel.: +39.071.596.3098 - Fax: +39.071.596.3261.
E-mail: e.manso@ospedaliriuniti.marche.it

Key words: antifungal susceptibility testing, EUCAST, CLSI, *Aspergillus*, Sensititre YeastOne, Etest.

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

©Copyright E. Manso et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Microbiologia Medica 2014; 29:4889
doi:10.4081/mm.2014.4889

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

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'antimicrogramma di *Aspergillus*?

Gli organismi internazionali preposti alla standardizzazione hanno codificato le procedure per l'esecuzione dei test di sensibilità mediante due metodiche: i) microdiluzione in brodo in micropiastra [CLSI M38-A2 (2008); EUCAST Edef 9.1, (2008), BP (vs. 7.0, 12-8-2014)]; ii) disco-diffusione [CLSI M51-A (2010)].

È 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. pseudofischeri* 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. quadrilineata* 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 microdiluzione 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*.

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.

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 compresi nei limiti segnalati nella Tabella 3, secondo la metodica utilizzata.

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

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

	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	2-5×10 ⁵	0.4-5×10 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

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

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

Antifungino, specie	EUCAST (v 7.0) BPC			CLSI (2011) ECV
	S	I	R	WT
Itraconazolo				
<i>A. flavus</i>	≤1	2	>2	≤1
<i>A. fumigatus</i>	≤1	2	>2	≤1
<i>A. nidulans</i>	≤1	2	>2	≤1
<i>A. niger</i>	IE*	IE*	IE*	≤2
<i>A. terreus</i>	≤1	2	>2	≤1
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	≤2
Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
Voriconazolo				
<i>A. flavus</i>	IE	IE	IE	≤1
<i>A. fumigatus</i>	≤1	2	>2	≤1
<i>A. nidulans</i>	IE	IE	IE	≤2
<i>A. niger</i>	IE	IE	IE	≤2
<i>A. terreus</i>	IE	IE	IE	≤1
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	≤2
Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
Posaconazolo				
<i>A. flavus</i>	IE*	IE*	IE*	≤0.5
<i>A. fumigatus</i>	≤0.12	0.25	>0.25	≤0.5
<i>A. nidulans</i>	IE*	IE*	IE*	≤1
<i>A. niger</i>	IE*	IE*	IE*	≤1
<i>A. terreus</i>	≤0.12	0.25	>0.25	≤0.5
<i>A. versicolor</i>	-	-	-	≤4
Specie non-correlate	IE	IE	IE	-
AMB				
<i>A. flavus</i>	IE**	IE**	IE**	≤2
<i>A. fumigatus</i>	≤1	2	>2	≤2
<i>A. nidulans</i>	*	-	**	-
<i>A. niger</i>	≤1	2	>2	≤2
<i>A. terreus</i>	-	-	-	≤4
Specie non-correlate	IE	IE	IE	-

S, sensibile; I, intermedio; R, resistente; IE, dati insufficienti per determinare il *breakpoint*. *I valori di ECV per queste specie sono generalmente 1 diluizione superiori rispetto a *A. fumigatus*. **Non ci sono i *breakpoint* perché i dati di MIC disponibili per stabilire l'ECV sono troppo limitati.

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

Antifungino	<i>Paecilomyces variotii</i> ATCC MYA 3630	<i>A. flavus</i> ATCC 204304		<i>A. fumigatus</i> 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

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: i) ceppi isolati da pazienti infetti in terapia prolungata con gli azoli e/o, ii) isolamento ricorrente di *Aspergillus* spp. e iii) 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: 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: 54-9.
4. ECDC. 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-Flörl C. Susceptibility testing in *Aspergillus* species complex. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 49-53.
10. Mortensen KI. 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.