



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση *in vitro* μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας της *Candida auris* στα αντιμυκητικά φάρμακα. Προσδιορισμός φυσικού πληθυσμού των διαφορετικών κλάδων *Candida auris* με μεθόδους αναφοράς και εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες

ΛΕΒΕΝΤΑΚΗ ΣΕΒΑΣΤΗ (19678144)

ΠΑΧΟΥΛΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (19678253)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΣΙΩΠΗ ΜΑΡΙΑ, Ph.D., ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION MEDICAL LABORATORIES SCIENCE

DISSERTATION

Evaluation of different methods for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida auris*. Determination of wild-type populations of different clades of *Candida auris* with reference and commercial assays

LEVENTAKI SEVASTI (19678144)

PACHOULIS IOANNIS (19678253)

SUPERVISOR: SIOPI MARIA, Ph.D., ACADEMIC SCHOLAR

ATHENS 2024

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Σιώπη Μαρία

Μπελούκας Απόστολος

Βογιατζάκη Χρυσάνθη

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Λεβεντάκη Σεβαστή του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 19678144 και Παχούλης Ιωάννης του Πέτρου, με αριθμό μητρώου 19678253, φοιτητές του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνουμε ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Υπογραφή

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου (Π.Γ.Ν.) «Αττικόν».

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μας σε όσους συνέβαλαν και στήριξαν αυτή την προσπάθεια.

Πρώτα από όλα, οφείλουμε ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα της παρούσας πτυχιακής, Δρ. Μαρία Σιώπη, για την άψογη συνεργασία, τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς επίσης την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μας παρείχε στο διάστημα εκπόνησης αυτής της πτυχιακής.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Σπύρο Α. Πουρνάρα (Διευθυντή Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.), καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Ιωσήφ Μελετιάδη (Υπεύθυνος Τμήματος Μυκητολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.) που μας προσέφεραν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε την έρευνα αυτή.

Επιπλέον, ευχαριστούμε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», για το άριστο κλίμα συνεργασίας, και ιδιαίτερα την Υπ. Δρ. Μαρία-Ιωάννα Μπερεδάκη, για την καθημερινή συμπαράσταση και βοήθεια που μας παρείχε.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλουμε στους συγγενείς και φίλους μας που μας στήριξαν σε αυτό το ερευνητικό ταξίδι, καθώς και για τη βαθειά κατανόηση που έδειξαν αυτό το διάστημα.

Αυτή η εργασία αποτελεί καρπό συνεργασίας όλων όσων μας βοήθησαν και στήριξαν, αλλά κυρίως της κοινής προσπάθειας που καταβάλαμε και εμπιστοσύνης που δείξαμε ο ένας στον άλλον.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	III
Summary.....	V
Συνοτομογραφίες.....	VII
Γενικό μέρος	
1. Η <i>Candida auris</i> ως αναδύομενη παγκόσμια απειλή	
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Φυλογενετική και διακριτές ιδιότητες της <i>C. auris</i>	5
1.3 Το γονιδίωμα της <i>C. auris</i>	7
1.4 Ανάδυση και παγκόσμια διασπορά της <i>C. auris</i>	8
1.5 Επιδημιολογία κρουσμάτων από <i>C. auris</i>	12
1.6 Λοιμογονικότητα της <i>C. auris</i>	22
1.7 Αντοχή της <i>C. auris</i> στα αντιμυκητικά.....	23
1.8 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για λοιμώξεις από <i>C. auris</i>	28
2. Εργαστηριακή διάγνωση της <i>C. auris</i>	
2.1 Ταυτοποίηση.....	30
2.2 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας σε αντιμυκητικούς παράγοντες.....	31
2.2.1 Πρότυπη μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό.....	35
2.2.2 Εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι.....	40
Ειδικό μέρος	
Σκοπός.....	50
3. Υλικά και μέθοδοι	
3.1 Κλινικά στελέχη.....	51

3.2 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με CLSI/EUCAST BMD.....	51
3.3 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με SYO.....	60
3.4 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με MTS.....	63
3.5 Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με Vitek 2.....	65
3.6 Ανάλυση.....	67
4. Αποτελέσματα	
4.1 Προφίλ της <i>in vitro</i> ευαισθησίας στα αντιμυκητικά σύμφωνα με τη μέθοδο αναφοράς CLSI BMD.....	69
4.2 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και EUCAST BMD.....	75
4.3 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και SYO.....	84
4.4 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και MTS.....	92
4.5 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και Vitek 2.....	100
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	
5.1 CLSI BMD έναντι EUCAST BMD.....	108
5.2 CLSI BMD έναντι SYO.....	112
5.3 CLSI BMD έναντι MTS.....	114
5.4 CLSI BMD έναντι Vitek 2.....	116
Συμμετοχή σε δράσεις διάχυσης μελέτης.....	125
Βιβλιογραφία.....	126
Παραρτήματα.....	141

Περίληψη

Η *C. auris* είναι ένα αναδυόμενο και συχνά πολυανθεκτικό παθογόνο σε διαφορετικές κατηγορίες αντιμυκητικών, καθιστώντας τον έλεγχο αντιμυκητικής ευαισθησίας ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών αποφάσεων. Επί του παρόντος, δεν έχουν καθοριστεί κλινικά ή επιδημιολογικά όρια ειδικά για το είδος. Ωστόσο, το προφίλ ευαισθησίας της *C. auris* ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το γεωγραφικό εντοπισμό και συγκεκριμένα τον κλάδο. Οι συγκριτικές αξιολογήσεις, τόσο των πρότυπων μεθοδολογιών μικροαραίωσης ζυμού CLSI και EUCAST, όσο και των ευρέως χρησιμοποιούμενων εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών, είναι ελάχιστες και βασίζονται σε δεδομένα απόδοσης περιορισμένου αριθμού στελεχών που ανακτήθηκαν από περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές. Επομένως, στην παρούσα πτυχιακή αξιολογήθηκαν διαφορετικές μεθοδολογίες ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας, δύο πρότυπες (CLSI και EUCAST) και τρεις εμπορικά διαθέσιμες (Sensititre YeastOne, MIC test strips και Vitek 2) έναντι 100 μοριακά χαρακτηρισμένων κλινικών στελεχών *C. auris* παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής και από τους πέντε κλάδους, με σκοπό, αφενός τη σύγκριση των ποσοστών συμφωνίας και των κατανομών MIC μεταξύ των μεθόδων και αφετέρου τον προσδιορισμό WT πληθυσμού για την εκάστοτε μέθοδο.

Ο έλεγχος της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά (αμφοτερικίνη Β, φλουκοναζόλη, ποσακοναζόλη, βορικοναζόλη, ιτρακοναζόλη, ισαβουκοναζόλη, ανιντουλαφουγκίνη, μικαφουγκίνη, κασποφουγκίνη και φλουκυτοσίνη) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εκάστοτε μεθοδολογίας και προσδιορίστηκαν επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας για όλους του συνδυασμούς *C. auris*-αντιμυκητικού παράγοντα. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν την ομοιόμορφη ευαισθησία στην αμφοτερικίνη Β και αντίσταση στη φλουκοναζόλη, καθώς επίσης και τη μεταβλητή επίκτητη αντοχή σε άλλες αζόλες και εχινοκανδίνες. Η μέθοδος Sensititre YeastOne θα μπορούσε να αποκλείσει ή να προβλέψει επακριβώς τα ποσοστά αντοχής για τα αντιμυκητικά φλουκοναζόλη, ανιντουλαφουγκίνη και μικαφουγκίνη έναντι στελεχών *C. auris*. Ωστόσο, υπερεκτιμήθηκε η αντίσταση στην αμφοτερικίνη Β και στην κασποφουγκίνη, όταν χρησιμοποιήθηκαν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC, τονίζοντας ότι τα αντίστοιχα MICs θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Αντίθετα, η μέθοδος MIC test strips παρουσίασε υψηλότερα MICs για τις αζόλες και τη φλουκυτοσίνη, σε σύγκριση με τη μέθοδο CLSI. Φαίνεται πως η μέθοδος MIC test strips θα μπορούσε να προβλέψει με

ακρίβεια την αντίσταση στη φλουκοναζόλη και στις εχινοκανδίνες μεταξύ στελεχών *C. auris*. Ωστόσο, υπερεκτίμησε την αντίσταση στην αμφοτερικίνη Β όταν χρησιμοποιήθηκαν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για προσεκτική ερμηνεία. Τέλος, το σύστημα Vitek 2 επέτρεψε τη σωστή κατηγοριοποίηση όλων των R στις εχινοκανδίνες στελεχών *C. auris*. Αντίθετα, η ευαισθησία της *C. auris* στη φλουκοναζόλη και την αμφοτερικίνη Β θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή σύμφωνα με δοκιμαστικά όρια των CDC, εάν το σύστημα Vitek 2 χρησιμοποιείται για την καθοδήγηση θεραπευτικών αποφάσεων. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα από μεμονωμένα εργαστήρια παγκοσμίως για τους επίσημους προσδιορισμούς των ECVs/ECOFFs.

Λέξεις κλειδιά: *Candida auris*, μέθοδος αναφοράς μικροαραίωσης σε ζωμό, ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, Sensititre YeastOne, Vitek 2, έλεγχος αντιμυκητικής ευαισθησίας, ανώτατη οριακή τιμή WT

Summary

C. auris is an emerging and frequently multidrug-resistant pathogen to different classes of antifungals, rendering antifungal susceptibility testing crucial for optimizing treatment decisions. Currently, species-specific clinical or epidemiological breakpoints have not yet been established. Nevertheless, *C. auris* susceptibility patterns can vary significantly with geography and specifically by clade. Head-to-head comparisons of the reference CLSI and EUCAST broth microdilution methodologies and widely used commercially available assays are limited and rely on testing a limited number of isolates recovered from restricted geographic areas. Therefore, in this thesis, different antifungal susceptibility testing methodologies, two standard (CLSI and EUCAST) and three commercially available (Sensititre YeastOne, MIC test strips and Vitek 2) were evaluated against 100 genetically distinct clinical strains, belonging to all 5 *C. auris* clades, with the aim, on the one hand, of comparing the agreement rates and MIC distributions between the methods and, on the other hand, of determining the population WT for each method.

The *in vitro* susceptibility profile to antifungals (amphotericin B, fluconazole, posaconazole, voriconazole, itraconazole, isavuconazole, anidulafungin, micafungin, caspofungin and flucytosine) was determined according to the protocol of each methodology and epidemiological cut-off values were defined for all *C. auris*-antifungal combinations. Our findings highlight uniform amphotericin B susceptibility, fluconazole resistance and variable acquired resistance to other azoles and echinocandins. Sensititre YeastOne could accurately exclude or predict fluconazole, anidulafungin and micafungin resistance among *C. auris* isolates. Nevertheless, it overestimated amphotericin B and caspofungin resistance when colorimetric MICs, as per the CDC's breakpoint, were used underscoring that the respective MICs need to be interpreted with caution. On the contrary, the MIC test strips method generated higher MICs than CLSI for azoles and flucytosine. It could accurately predict fluconazole and echinocandin resistance among *C. auris* isolates. Nevertheless, it overestimated amphotericin B resistance when the CDC's breakpoint was used underscoring the need for cautious interpretation. The Vitek 2 allowed correct categorization of all echinocandin-resistant *C. auris* isolates. On the contrary, the susceptibility of *C. auris* to fluconazole and amphotericin B should be interpreted with caution as per the CDC's breakpoint, if the Vitek 2 is used to guide therapeutic decisions. However, more data generated by individual laboratories worldwide are required for

official epidemiological cut-off value determinations.

Key words: *Candida auris*, reference broth microdilution, gradient concentration strip, Sensititre YeastOne, Vitek 2, antifungal susceptibility testing, wild type upper limit value

Συντομογραφίες

Σύντμηση	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
AFST	Antifungal susceptibility testing	Έλεγχος <i>in vitro</i> ευαισθησίας στα αντιμυκητικά
AMB	Amphotericin B	Αμφοτερικίνη Β
AFG	Anidulafungin	Ανιντουλαφουγκίνη
BMD	Broth microdilution	Μικροαραίωση σε ζυμό
CA	Categorical agreement	Κατηγορική συμφωνία
CAS	Caspofungin	Κασποφουγκίνη
CBPs	Clinical breakpoints	Κλινικά όρια
CDC	Centers for disease control and prevention	Κέντρα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
CLSI	Clinical and laboratory standards institute	Ινστιτούτο κλινικών και εργαστηριακών προτύπων
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EA	Essential agreement	Βασική συμφωνία
ECVs/ECOF Fs	Epidemiological cut-off values	Επιδημιολογικά όρια
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing	Ευρωπαϊκή επιτροπή για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά
5FC	Flucytosine	Φλουκυτοσίνη
FDA	Food and drug administration	Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ
FLC	Fluconazole	Φλουκοναζόλη
GC	Growth control	Θετικός μάρτυρας ελέγχου της ανάπτυξης
I	Intermediate	Ευαίσθητο σε αυξημένη έκθεση
ISA	Isavuconazole	Ισαβουκοναζόλη
ITC	Itraconazole	Ιτρακοναζόλη
MaE	Major error	Σημαντικό λάθος
MALDI-ToF MS	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry	Φασματοφωτομετρία μάζας με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης

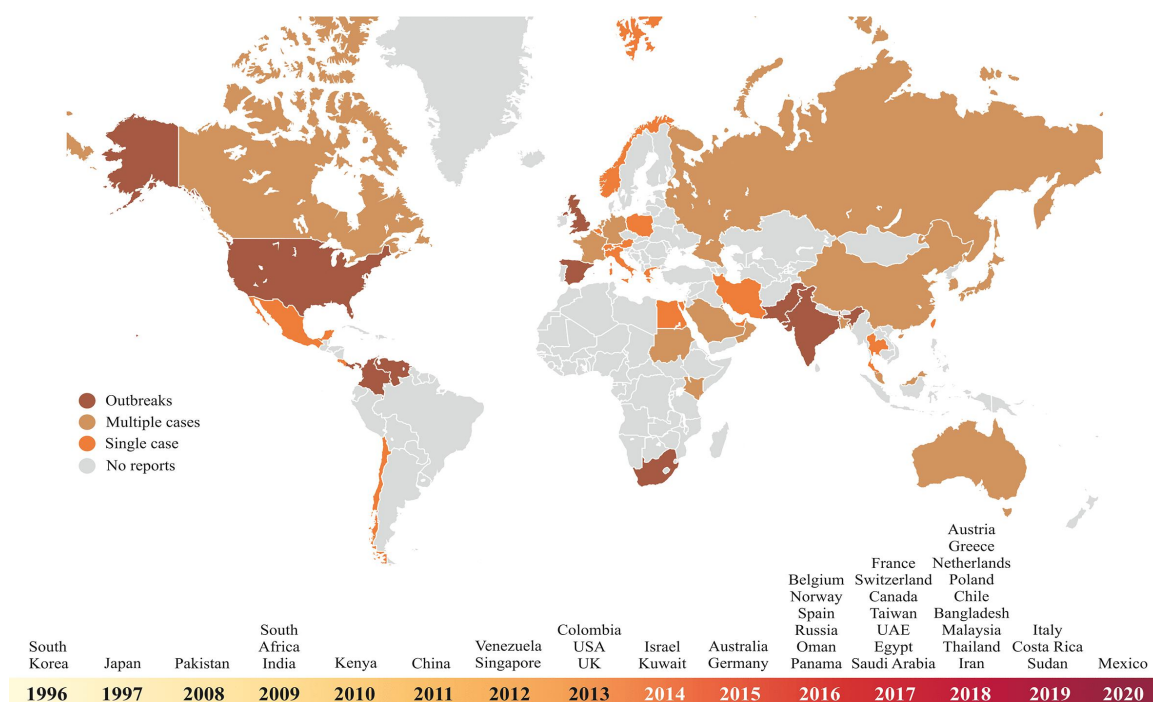
MDR	Multidrug-resistant	Πολυ-ανθεκτικό
MFG	Micafungin	Μικαφουγκίνη
MIC	Minimum inhibitory concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MTS	MIC test strips	
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDR	Pandrug-resistant	Παν-ανθεκτικό
PK/PD	Pharmacokinetic/pharmacodynamic	Φαρμακοκινητική/Φαρμακοδυναμική
POS	Posaconazole	Ποσακοναζόλη
R	Resistant	Ανθεκτικό
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
S	Susceptible	Ευαίσθητο
STR	Short tandem repeats	Μικρές διαδοχικές επαναλήψεις
SYO	Sensititre YeastOne	
VmE	Verry major error	Πολύ σημαντικό λάθος
VRC	Voriconazole	Βορικοναζόλη
WGS	Whole genome sequencing	Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος
WT	Wild type	Άγριου τύπου
WT-ULV	WT upper limit value	Ανώτατη οριακή τιμή WT
ΔΑ		Δεν αναφέρεται
EE/EOX		Ευρωπαϊκή ένωση/Ευρωπαϊκός οικονομικός χώρος
HΠΑ		Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής
ΜΕΘ		Μονάδα εντατικής θεραπείας
ΔΠ		Δεν προσδιορίστηκε

Γενικό μέρος

1. Η *Candida auris* ως αναδυόμενη παγκόσμια απειλή

1.1 Εισαγωγή

Η *C. auris* απομονώθηκε πρώτη φορά το 2009 από τον έξω ακουστικό πόρο 70χρονης νοσηλευόμενης ασθενούς στην Ιαπωνία [1], εξού και η ονομασία του είδους (*auris* = αυτί στα λατινικά). Αναδρομικές μελέτες έδειξαν ότι προϋπήρχε ως αίτιο σηψαιμίας ήδη από το 1996 (Νότια Κορέα) [1], αλλά δεν μπορούσε να αναγνωριστεί με τα τότε διαθέσιμα εργαστηριακά μέσα ταυτοποίησης [1]. Εκτοτε, κλινικά στελέχη *C. auris* εντοπίστηκαν στην Ινδία [2], των οποίων η διασπορά ήταν ραγδαία, στη συνέχεια στις ηπείρους της Αφρικής και της Αμερικής [3], [4], και αργότερα στην Ευρώπη και στην Αυστραλία [5], [6].



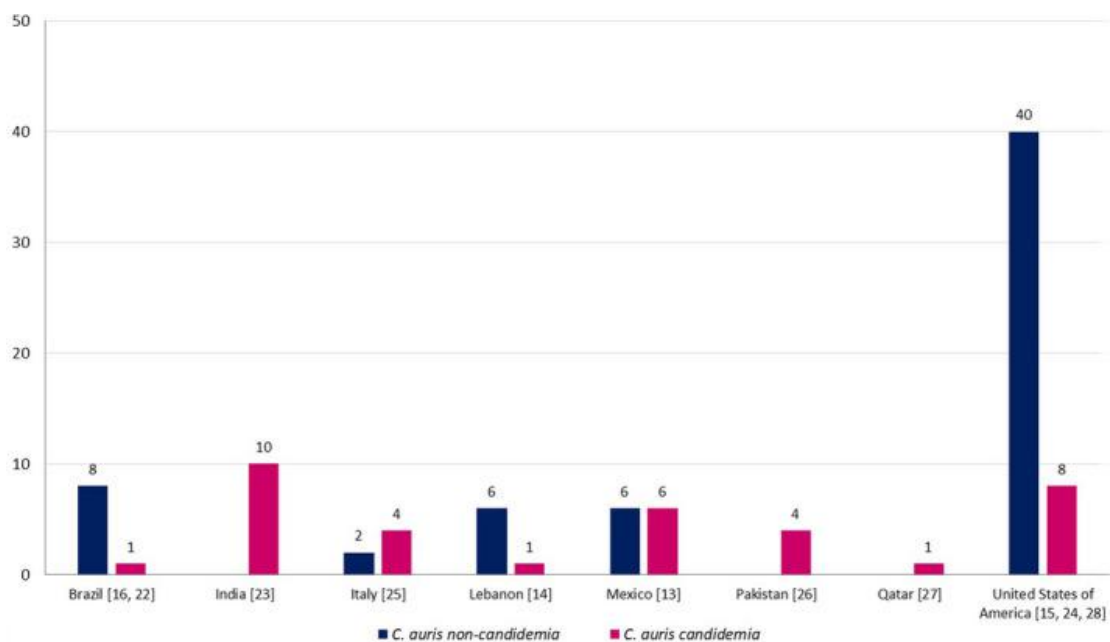
Εικόνα 1. Η εμφάνιση και η εξάπλωση της *C. auris*. Παγκόσμιος χάρτης απεικόνισης των χωρών όπου έχει απομονωθεί *C. auris* και χρονοδιάγραμμα πρώτης απομόνωσης του παθογόνου σε αυτές από το 1996 έως το 2020, δείχνοντας σχεδόν ταυτόχρονη εμφάνισή του στην Ασία, στην Αφρική και στη Νότια Αμερική μεταξύ 2008 και 2013. Οι περισσότερες χώρες έχουν καταγράψει πολλαπλά κρούσματα σε περισσότερα από ένα ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης, με ορισμένες από αυτές να δηλώνουν συρροές κρουσμάτων, ενώ άλλες έχουν αναφέρει μόνο μεμονωμένα κρούσματα χωρίς περαιτέρω μετάδοση [7].

Η *C. auris* είναι ένας ταχέως αναδύομενος παθογόνος ζυμομύκητας, του οποίου η εμφάνιση έχει συσχετιστεί με απειλητικές για τη ζωή διεισδυτικές λοιμώξεις και πολυάριθμες επιδημίες σε εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης ανά τον κόσμο. Ανησυχητικά, οι βαρέως πάσχοντες νοσηλευόμενοι ασθενείς με συστηματική λοίμωξη από *C. auris* διατρέχουν υψηλό κίνδυνο θνητότητας σε ποσοστό της τάξης του 60% [8], το οποίο αγγίζει το 70% σε περιστατικά μυκηταιμίας [9]. Διάφοροι είναι οι παράγοντες που έχουν συμβάλει στην αναγνώρισή της ως κρίσιμη υγειονομική απειλή. Ενδεικτικά, πολλές εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης παγκοσμίως τέθηκαν υπό έλεγχο, λόγω της έλλειψης εξειδικευμένου εργαστηριακού εξοπλισμού που απαιτείται για την ορθή ταυτοποίησή της [10]. Σημειωτέον, η λανθασμένη ταυτοποίησή της δύναται να οδηγήσει σε ακατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών. Επιπλέον, η ικανότητά της να αποικίζει εύκολα το δέρμα, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα επιβίωσής της στο άψυχο νοσοκομειακό περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, έχουν προκαλέσει συρροές κρουσμάτων σε μονάδες υγειονομικής περίθαλψης παγκοσμίως [11]. Επιπροσθέτως, σε αντίθεση με άλλα *Candida* spp., η *C. auris* είναι συχνά πολυ-ανθεκτική (multidrug-resistant, MDR) σε αντιμυκητικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη για τη θεραπεία διεισδυτικών λοιμώξεων από *Candida* spp., ενώ έχουν ακόμη αναφερθεί και παν-ανθεκτικά (pandrug-resistant, PDR) κλινικά στελέχη [12]. Αξίζει να σημειωθεί ότι περιστατικά επίκτητης αντοχής κατά τη διάρκεια θεραπείας έχουν επίσης περιγραφεί [12], ένα χαρακτηριστικό ιδιαίτερα ανησυχητικό που απαιτεί διαρκή επαγρύπνηση λαμβάνοντας υπόψη το περιορισμένο διαθέσιμο οπλοστάσιο αντιμυκητικών παραγόντων.

<i>Candida</i> spp.	Patients at Risk/Risk Factors	Rate of Resistance	Therapy
<i>C. albicans</i>	All patients	Fluconazole: 0.1–0.4% Echinocandins: 0–0.1% Amphotericin B: rare	<ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1) Fluconazole, 800 mg then 400 mg (2) Liposomal amphotericin B, 3–5 mg/kg/day (3)
<i>C. parapsilosis</i>	ICU patients Neonates Vascular catheter	Fluconazole: 0.6 up to 53% Echinocandins: 0–0.1% Amphotericin B: rare	<ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1) Fluconazole, 800 mg then 400 mg (2)
<i>C. glabrata</i>	Older age Diabetes Cancer Hematological malignancies Stem cell transplantation Azole prophylaxis	Fluconazole: 2.6–10.6% Echinocandins: 0%–2.8% Amphotericin B: rare	Fluconazole and voriconazole are not recommended for frequent azoles resistance <ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1) Liposomal amphotericin B, 3–5 mg/kg/day (3)
<i>C. tropicalis</i>	Corticosteroid therapy Hematological malignancies Stem cell transplantation	Fluconazole: 1.1–37.8% Echinocandins: 0–1.3% Amphotericin B: rare	<ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1) Fluconazole, 800 mg then 400 mg (2) Liposomal amphotericin B, 3–5 mg/kg/day (3)
<i>C. krusei</i>	Corticosteroid therapy Hematological malignancies Stem cell transplantation Azole prophylaxis	Fluconazole: innately Echinocandins: 0–0.7% Amphotericin B: rare	Fluconazole is not recommended for frequent azoles resistance <ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1) Liposomal amphotericin B, 3–5 mg/kg/day (3) Voriconazole (4)
<i>C. auris</i>	Diabetes Cancer Hematological malignancies ICU patients Invasive procedures	Fluconazole: 15.4–90% Voriconazole: 50% Echinocandins: 2–8% Amphotericin B: 15–30%	<ul style="list-style-type: none"> Echinocandins (1)

Εικόνα 2. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καντινταιμίας από διαφορετικά *Candida* spp., ποσοστά ανοχής σε διαθέσιμους αντιμυκητικούς παράγοντες και ενδεδειγμένη θεραπεία [13].

Δεδομένων των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών της, παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων *C. auris* διεθνώς κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, ιδιαίτερα σε ασθενείς που νοσηλεύονταν σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) [14]. Το γεγονός ότι οι ασθενείς της ΜΕΘ είναι ιδιαίτερα εύάλωτοι σε λοιμώξεις, σε συγκερασμό με τις δυσκολίες που επέφερε η έκτακτη υγειονομική κρίση στην εύρυθμη λειτουργία των νοσηλευτικών ιδρυμάτων, ενδεχομένως αποτέλεσαν πρόσφορο έδαφος για την εκτεταμένη διασπορά του συγκεκριμένου παθογόνου τη δεδομένη χρονική περίοδο [15].



Εικόνα 3. Περιστατικά καντινταιμίας από *C. auris* σε ασθενείς με COVID-19 σε διάφορες χώρες (ροζ ράβδοι). Δεδομένα από 11 μελέτες που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της πανδημίας [15].

Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια η *C. auris* θεωρείται σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι το πρώτο και μέχρι στιγμής μοναδικό μυκητικό παθογόνο που έχει ταξινομηθεί ως επείγουσα απειλή για την υγεία από τα κέντρα για τον έλεγχο και την πρόληψη νοσημάτων (centers for disease control and prevention, CDC) ήδη από το 2019 [16]. Επιπλέον, δεν αποτέλεσε έκπληξη το γεγονός ότι συμπεριλήφθηκε στην ομάδα κρίσιμης προτεραιότητας των υπεύθυνων για συστηματικές λοιμώξεις μυκήτων που ανακοινώθηκαν πρόσφατα από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας [17].



WHAT YOU NEED TO KNOW

- *C. auris*, first identified in 2009 in Asia, has quickly become a cause of severe infections around the world.
- *C. auris* is a concerning drug-resistant fungus:
 - Often multidrug-resistant, with some strains (types) resistant to all three available classes of antifungals
 - Can cause outbreaks in healthcare facilities
 - Some common healthcare disinfectants are less effective at eliminating it
 - Can be carried on patients' skin without causing infection, allowing spread to others

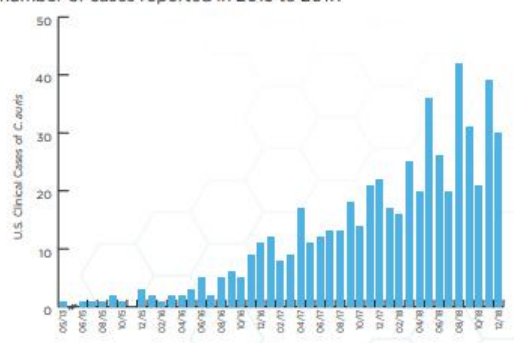
Data represents U.S. cases only. Isolates are pure samples of a germ.



U.S. Department of Health and Human Services
Centers for Disease Control and Prevention

CASES OVER TIME

C. auris began spreading in the United States in 2015. Reported cases increased 318% in 2018 when compared to the average number of cases reported in 2015 to 2017.

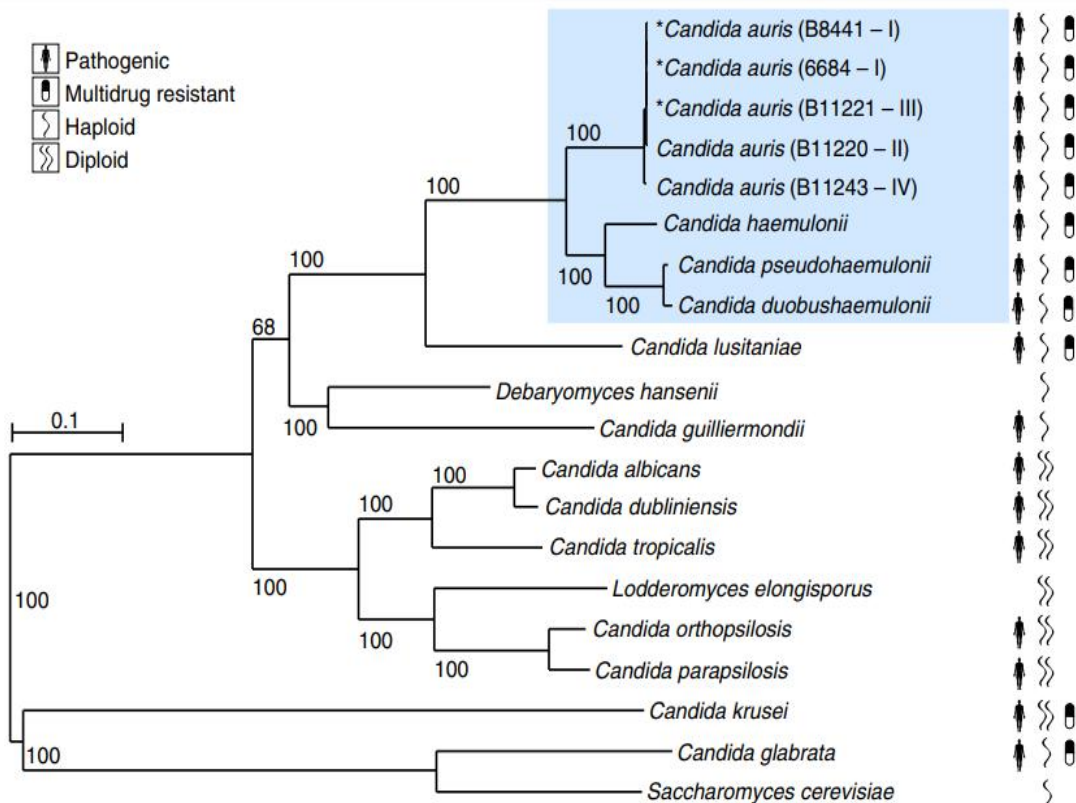


Εικόνα 4. Έκθεση απειλών αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των CDC, 2019 [16].

Η εμφάνιση της *C. auris* ξεκίνησε το 2009 και έκτοτε τέθηκε γρήγορα στο προσκήνιο, όχι μόνο των ιατρικών περιοδικών, αλλά και στα πρωτοσέλιδα των μέσων μαζικής ενημέρωσης, απασχολώντας έντονα την επιστημονική και δημόσια κοινότητα [1], [18]. Κρούσματα *C. auris* έχουν πλέον αναφερθεί σε 6 ηπείρους [19]. Εντούτοις, καθώς η ταυτοποίηση του είδους παρουσιάζει δυσκολίες και απαιτεί ειδικές εργαστηριακές τεχνικές, ο πραγματικός επιπολασμός του παραμένει εν μέρει άγνωστος, ιδίως σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Ορισμένα κλινικά στελέχη *C. auris* είναι ανθεκτικά (resistant, R) και στις τρεις κύριες κατηγορίες αντιμυκητικών παραγόντων, καθιστώντας τις αντίστοιχες λοιμώξεις δυσίατες, γεγονός που αναδεικνύει το σημαίνοντα ρόλο της διενέργειας αξιόπιστου ελέγχου της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά (antifungal susceptibility testing, AFST) στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη. Η έγκαιρη και η έγκυρη ανίχνευση της *C. auris* είναι υψίστης σημασίας για τον περιορισμό της νοσοκομειακής μετάδοσής της.

1.2 Φυλογενετική και διακριτές ιδιότητες της *C. auris*

Η *C. auris* ανήκει στον κλάδο *Candida/Clavispora* της οικογένειας *Metschnikowiaceae* της τάξης των *Saccharomycetales* και μπορεί να προϋπήρχε ως φυτικό σαπρόφυτο [20]. Μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης υπέδειξαν ότι το πιο στενά συγγενικό της είδος είναι η *C. haemulonii*, ακολουθούμενη από την *C. pseudohaemulonii* [21]. Αν και προηγούμενοι ερευνητές είχαν αναφέρει ότι η *C. auris* ενδεχομένως να σχετίζεται στενότερα με τις *C. heveicola* και *C. ruelliae* [1], αυτό δεν μπορεί μέχρι στιγμής να επαληθευτεί δεδομένης της μιας και μοναδικής απομόνωσης των συγκεκριμένων ειδών το 2008 [22], [23].



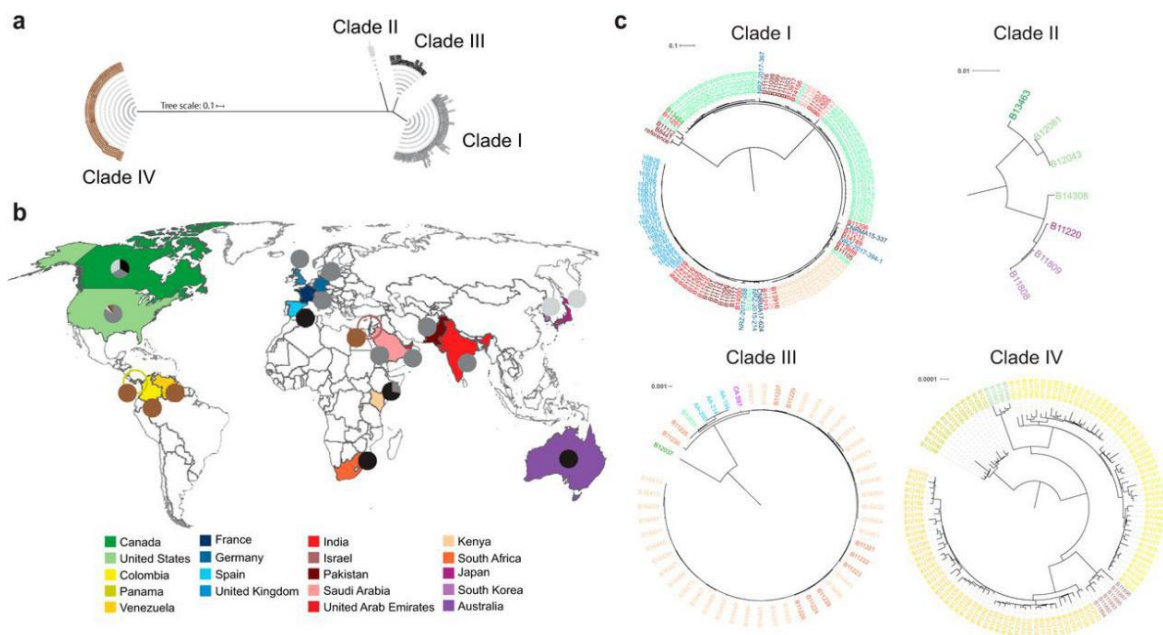
Εικόνα 5. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ της *C. auris* και συγγενικών ειδών [21].

Το πρώτο απομονωθέν κλινικό στέλεχος *C. auris* έφερε ορισμένα διακριτά χαρακτηριστικά που το έκαναν να ξεχωρίζει από τους πιο κοντινούς φυλογενετικά συγγενείς του και δικαιολογούσαν τον ορισμό ενός νέου *Candida* spp. Σε αυτά περιλαμβανόταν η ικανότητά του να αναπτύσσεται έστω και αργά στους 42°C, σε αντίθεση με τις *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii* και *C. heveicola*. Επιπλέον, δε σχημάτιζε ψευδοϋφές, εν αντιθέσει με τις *C. heveicola*, *C. ruelliae* και τα είδη του συμπλέγματος *C. haemulonii*. Τέλος, υπέδειξε μειωμένη δυνατότητα αφομοίωσης διαφόρων πηγών άνθρακα (αιθανόλη, 1-αραβινόζη, γαλακτόζη, γλυκερίνη, κελλοβιόζη,

κιτρικό οξύ, σαλικίνη και Ι-σορβόζη), ενώ η *C. ruelliae* μπορούσε να αφομοιώσει όλες τις προαναφερθείσες ως πηγή άνθρακα [1].

1.3 Το γονιδίωμα της *C. auris*

Χάρη στην τεχνολογική πρόοδο των τελευταίων ετών, μελέτες αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS) στελεχών *C. auris* παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής υπέδειξαν ότι το είδος χωρίζεται σε τέσσερις διακριτούς φυλογενετικά κλάδους [21], [24]. Αρχικά, τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις γεωγραφικά εντοπισμένους κλάδους, συγκεκριμένα τους κλάδους I (νότιας Ασίας), II (ανατολικής Ασίας), III (νότιας Αφρικής) και IV (νότιας Αμερικής), ενώ πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν στελέχη από το Ιράν που ανήκουν σε έναν ξεχωριστό πέμπτο (V) κλάδο [25]–[27].



Εικόνα 6. Παγκόσμια κατανομή των διαφορετικών κλάδων της *C. auris*. (α) Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών ολόκληρου του γονιδιώματος 304 στελεχών που συγκεντρώνονται σε τέσσερις (I-IV) διακριτούς κλάδους. (β) Χάρτης απεικόνισης της διασποράς στελεχών διαφορετικών κλάδων ανά χώρα. (γ) Φυλογενετικό δέντρο του εκάστοτε κλάδου [24].

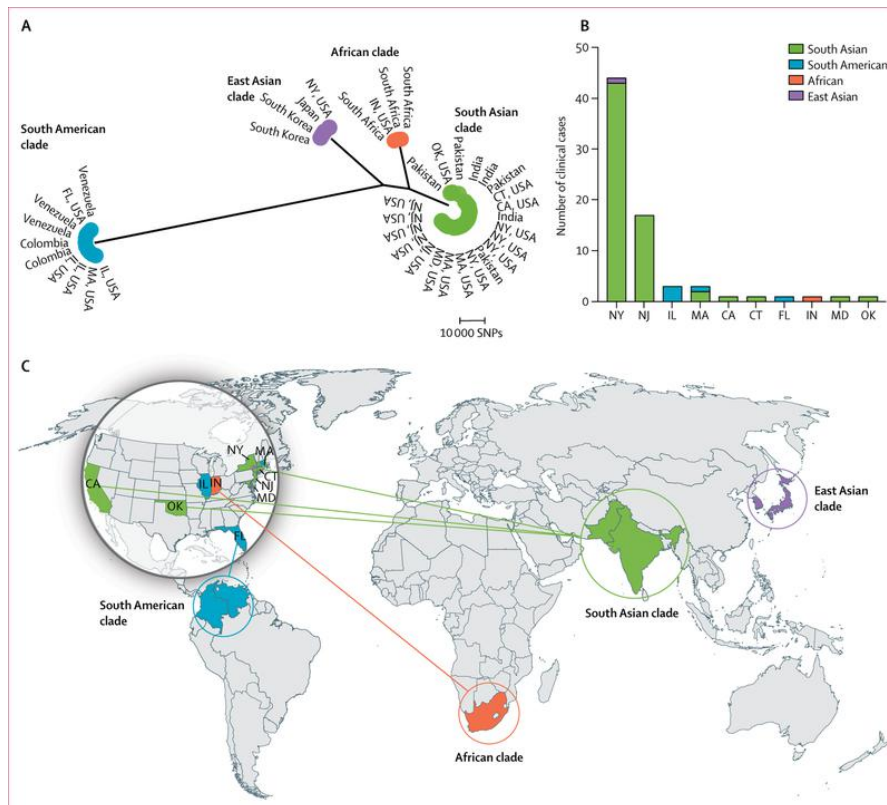
Το μέγεθος του γονιδιώματος της *C. auris* κυμαίνεται από 12,1 έως 12,7 Mb και ο αριθμός των γονιδίων κωδικοποίησης πρωτεϊνών είναι μεταξύ 5.288 και 5.601. Το μιτοχονδριακό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid, DNA) της έχει μήκος ~27

kb και περιέχει 15 κωδικοποιητικές αλληλουχίες, 2 τύπους ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέος (ribonucleic acid, RNA) και 32 τύπους μεταφορικού RNA [21], [25]. Ερευνητές χαρτογράφησαν τα 7 χρωμοσώματα στελεχών *C. auris* διαφορετικών κλάδων (I-IV) και εντόπισαν ότι έχουν υποστεί χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, όπως αναστροφές και μετατοπίσεις γονιδιωματικών περιοχών χιλιάδων βάσεων μεταξύ των κλάδων I και III. Συγχρόνως, έδειξαν ότι το γονιδίωμα στελεχών που ανήκουν στον κλάδο II είναι περισσότερο αναδιαταγμένο, περιέχοντας 2 αναστροφές και 9 μετατοπίσεις, σε σύγκριση με αυτά των κλάδων I, III και IV [21], [28].

Οι κλάδοι I-IV της *C. auris* είναι γενετικά παρόμοιοι μεταξύ τους. Ειδικότερα, οι κλάδοι II και III εμφανίζουν υψηλή γενετική ομοιότητα (99,3%), ενώ και οι τέσσερις κλάδοι μοιράζονται ένα μέσο όρο γενετικής ομοιότητας ίσο με 98,7% υποδηλώνοντας μία στενή εξελικτική σχέση μεταξύ τους. Μελέτες που εστίασαν στην ποσοτικοποίηση της γενετικής παραλλαγής στον πληθυσμό της *C. auris*, υπολόγισαν την ποικιλότητα σε όλο το γονιδίωμα ανιχνεύοντας πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου. Παρατηρήθηκε ότι η γενετική ποικιλότητα εντός του κλάδου I είναι πολύ χαμηλή (0,00050), δηλαδή οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων αυτού του κλάδου είναι αρκετά όμοιες μεταξύ τους, ενώ οι κλάδοι III και IV έχουν ελαφρώς υψηλότερη γενετική ποικιλότητα (0,00079 και 0,00075, αντίστοιχα) [21].

1.4 Ανάδυση και παγκόσμια διασπορά της *C. auris*

Το γονιδίωμα κλινικών στελεχών αποκαλύπτει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο η *C. auris* εξαπλώνεται μεταξύ ηπείρων, εντός χωρών, ακόμη και εντός διαφορετικών θαλάμων νοσοκομείων, αλλά και με την πάροδο του χρόνου. Ενδεικτικά, οι Chow et al. συνέλεξαν 133 στελέχη *C. auris* από δέκα πολιτείες των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (ΗΠΑ) και με WGS υπέδειξαν την εισροή στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους στη χώρα κατά την περίοδο 2013-2017 [29].

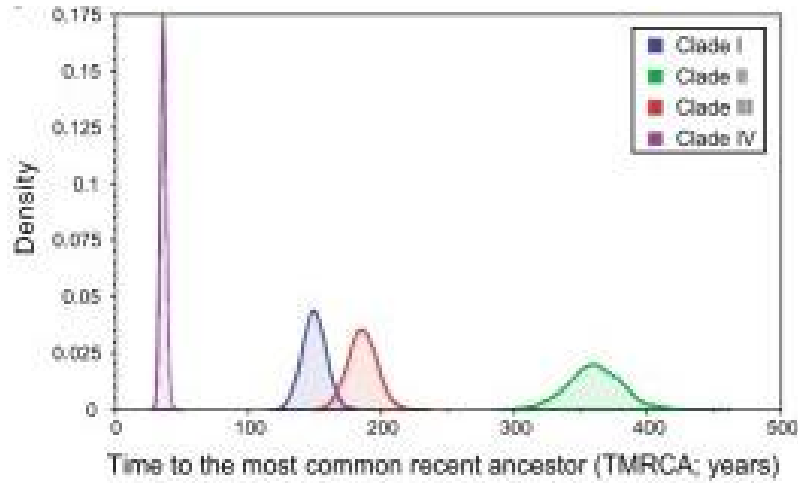


Εικόνα 7. Κατανομή διαφορετικών κλάδων της *C. auris* εντός των ΗΠΑ κατά την περίοδο 2013-2017 [29].

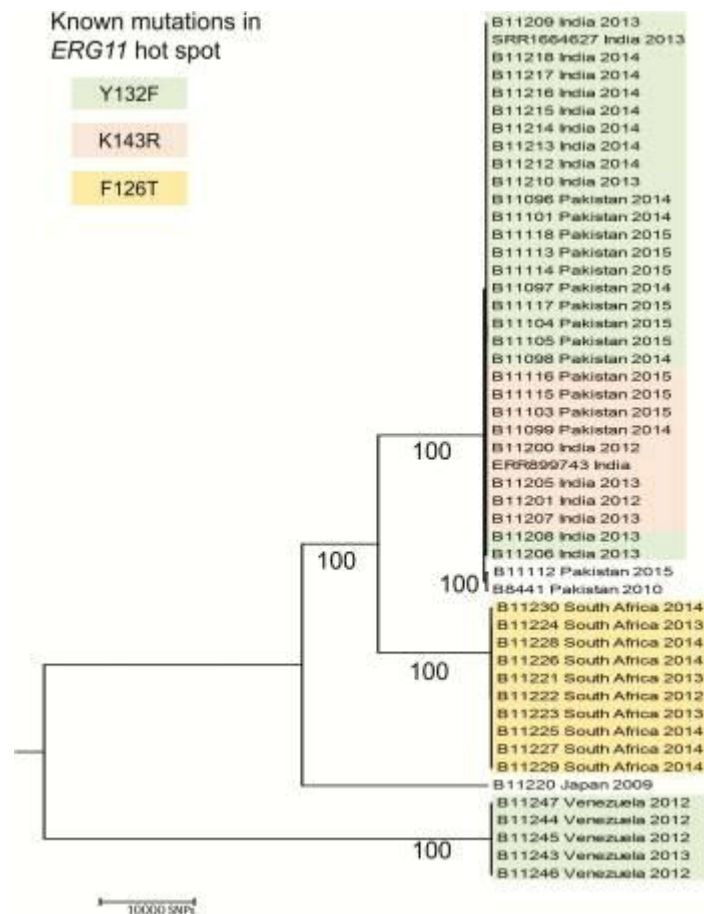
Εντούτοις, τα προαναφερθέντα ευρήματα πολλαπλών εισροών δεν είναι μοναδικά για τις ΗΠΑ. Τα κρούσματα στην Ευρώπη και στην Αυστραλία έχουν επίσης αποδοθεί στην εισαγωγή στελεχών από άλλες ηπείρους. Χαρακτηριστικά, οι Hamprecht et al. έδειξαν μέσω WGS πως 6 κρούσματα *C. auris* που εντοπίστηκαν στη Γερμανία, κατά την περίοδο 2015-2017, ήταν ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί στο παρελθόν στο εξωτερικό και είχαν εισαχθεί σε νοσοκομεία της Γερμανίας για συνέχιση της ιατρικής περίθαλψης. Οι ασθενείς είχαν μολυνθεί με διαφορετικά στελέχη, εκ των οποίων 5 ανήκαν στον κλάδο I και ένα στον κλάδο III. Ανησυχητικά, η ολοένα αυξανόμενη εξάπλωση της *C. auris* πιθανότατα θα οδηγήσει στο να χάσει το είδος τη μέχρι στιγμής ξεχωριστή φυλογεωγραφική δομή του [30].

Η εξελικτική πορεία της παγκόσμιας διασποράς της *C. auris* έχει οριοθετηθεί μέσω γονιδιωματικών αναλύσεων πληθυσμού. Συγκεκριμένα, ο κλάδος II φάνηκε να είναι ο παλαιότερος χρονολογικά εμφανιζόμενος κλάδος, η παρουσία του οποίου χρονολογείται στα 360 χρόνια πριν. Από την άλλη πλευρά, ο κλάδος IV είναι ο νεότερος χρονολογικά και η εμφάνισή του χρονολογείται μόλις στα 38 χρόνια πριν. Στελέχη που ανήκουν στους κλάδους I και III χρονολογούνται στα 149 και στα 186 χρόνια πριν, αντίστοιχα, ωστόσο

αντοχή στα αντιμυκητικά έχουν εμφανίσει μόλις τα τελευταία 37 χρόνια [24]. Η ταυτόχρονη εμφάνιση πολλών διαφορετικών κλάδων σε διαφορετικά μέρη του κόσμου σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα [31], χρίζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος.



Εικόνα 8. Χρονολογική σειρά εμφάνισης των κλάδων I-IV της *C. auris* [24].

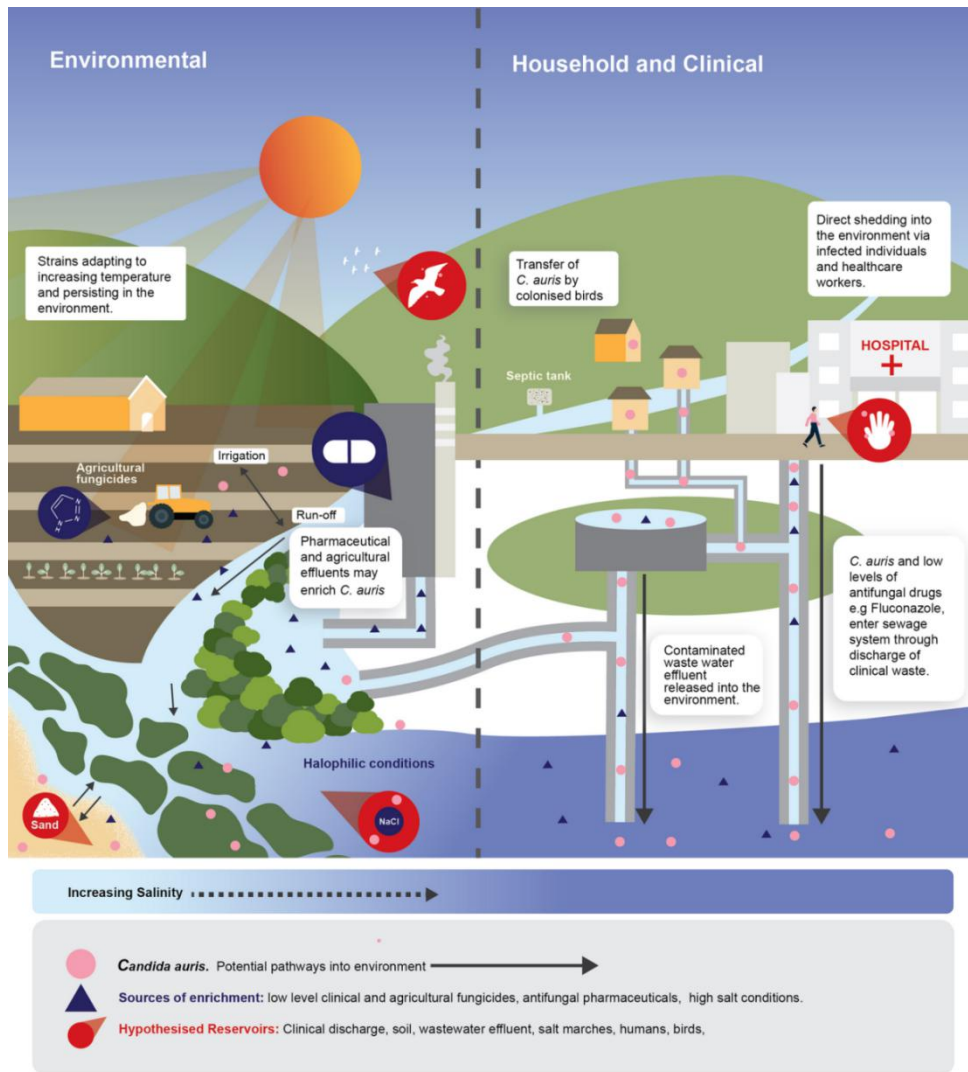


Εικόνα 9. Η ταυτόχρονη εμφάνιση και διασπορά των κλάδων I-IV της *C. auris* σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές παγκοσμίως [31].

Επί του παρόντος, η οικολογική θέση της *C. auris* δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στους πιο στενούς φυλογενετικά συγγενείς της περιλαμβάνονται η *C. ruelliae*, η οποία έχει απομονωθεί από άνθη του είδους *Ruellia*, και η *C. haemulonii* που μπορεί με τη σειρά της να προκαλέσει λοιμώξεις, αλλά συγχρόνως αποικίζει τη γαστρεντερική οδό και το δέρμα των θαλάσσιων ζώων. Ως εκ τούτου, η *C. auris* δύναται να έχει μια περιβαλλοντική θέση σε φυτά ή/και υδρόβια οικοσυστήματα [1].

Είναι πιθανό ο άνθρωπος να έχει εισβάλλει στην έμβια ή άβια θέση «κατοικίας» του εν λόγω μύκητα, επιτρέποντας του να αποικίζει πλέον σε μεγαλύτερο βαθμό τους ανθρώπινους ιστούς. Ορισμένες από τις ενέργειες που θα μπορούσαν να φέρουν τον άνθρωπο πιο κοντά στην *C. auris*, είναι η αποψίλωση των δασών, η επέκταση της γεωργικής γης και η διατάραξη του παράκτιου οικοσυστήματος [32]. Ταυτόχρονα, τα ταξίδια, το εμπόριο ή άλλοι ανθρωπογενείς παράγοντες, ενδεχομένως να οδήγησαν στην παγκόσμια διασπορά της *C. auris* [33]. Συνεπώς, η αυξημένη ανθρώπινη επαφή με τις οικολογικές θέσεις στις οποίες ανευρίσκεται η *C. auris*, επιτρέπει την εισαγωγή της σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης.

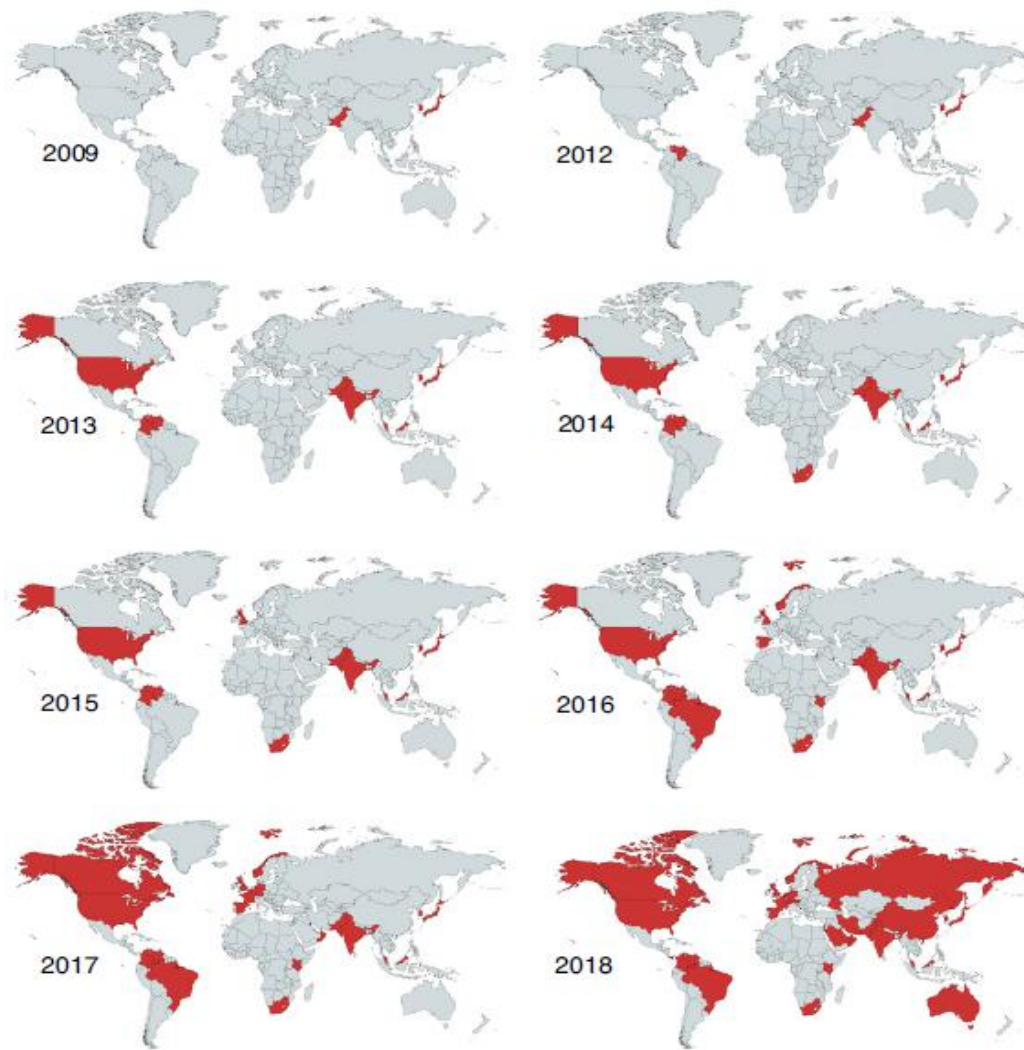
Ένα άλλο χαρακτηριστικό της *C. auris* που ευνοεί τη μετάδοσή της είναι ότι μπορεί να αναπτυχθεί έστω και αργά στους 42°C. Η θερμοαντοχή αυτή της επιτρέπει να προκαλεί διεισδυτικές λοιμώξεις στον άνθρωπο, καθώς και να επιζεί ως αποικιστής στο δέρμα ζώων, συμπεριλαμβανομένων των πτηνών, τα οποία μπορούν να χρησιμεύσουν ως δεξαμενές για την έμμεση μετάδοση *Candida* spp. στον άνθρωπο. Το εν λόγω χαρακτηριστικό της οδήγησε στην υπόθεση ότι η εμφάνισή της μπορεί να συνδέεται με την κλιματική αλλαγή. Η *C. auris* είναι, επίσης, σε θέση να επιβιώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, και κατ' επέκταση να ανευρίσκεται σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας, όπως λίμνες, θάλασσες και ιδρώτας [34]–[36].



Εικόνα 10. Πιθανές οδοί για την εισαγωγή της *C. auris* στο περιβάλλον [32].

1.5 Επιδημιολογία κρουσμάτων από *C. auris*

Από την αρχική απομόνωσή της το 2009, η *C. auris* παρουσιάζει πλέον εκτεταμένη διασπορά με την καταγραφή κρουσμάτων σε 6 ηπείρους [19]. Σημειωτέον, ανησυχητικά είναι τα ολοένα αυξανόμενα δεδομένα που υποδεικνύουν πως η πανδημία COVID-19 άνοιξε το δρόμο στην εξάπλωση του εν δυνάμει MDR στα αντιμυκητικά παθογόνου στο νοσοκομειακό περιβάλλον σε παγκόσμια κλίμακα [14].

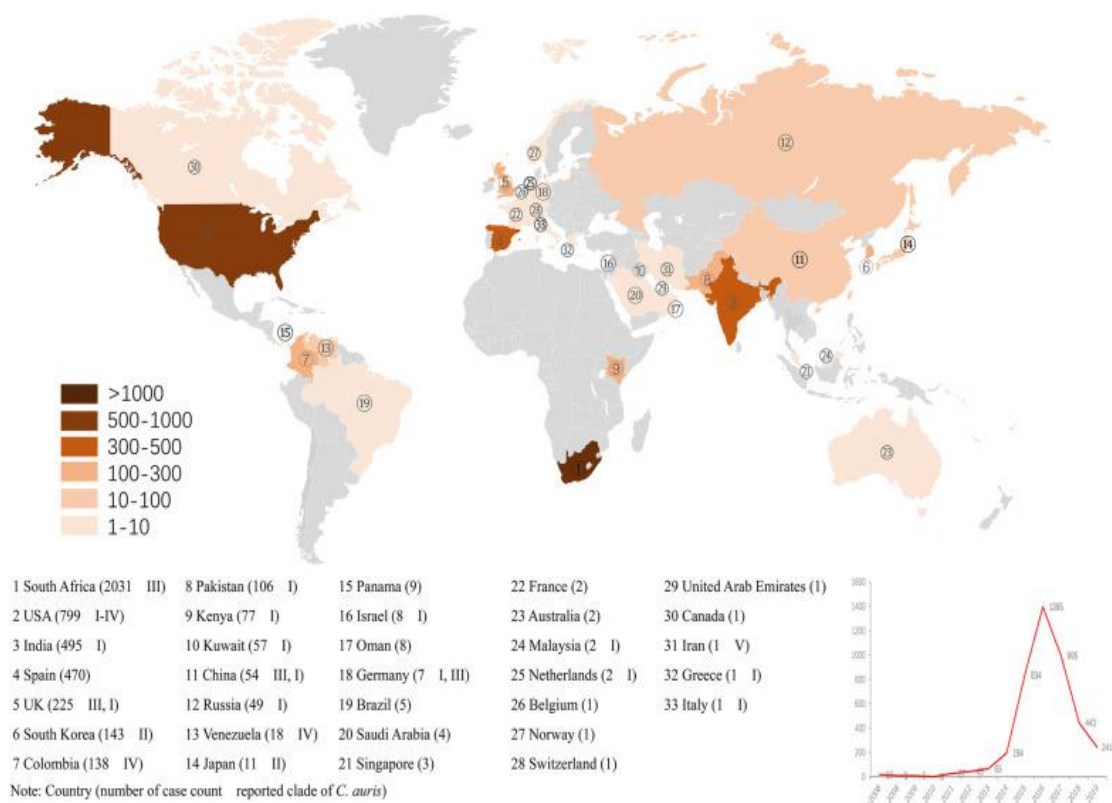


Εικόνα 11. Χρονοδιάγραμμα της παγκοσμίως διευρυνόμενης ανίχνευσης της *C. auris* [19].

- **Παγκόσμια επιδημιολογία**

Η σύγχρονη επιδημιολογική εικόνα των κρουσμάτων *C. auris* σε παγκόσμια κλίμακα παρουσιάζει κενά, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη κάποια συστηματική ανασκόπηση που να περιλαμβάνει διεθνή δεδομένα για το χρονικό διάστημα της πανδημίας COVID-19. Συγκεκριμένα, η πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση αφορούσε στην καταγραφή 4.733 περιστατικών σε 33 χώρες παγκοσμίως στο διάστημα 2009-2019. Τα αποτελέσματα της κατέδειξαν τους κλάδους I και III ως τους πιο επικρατείς, με τα περισσότερα αναφερόμενα κρούσματα και την υψηλότερη γεωγραφική κατανομή, ενώ οι κλάδοι II και IV ήταν υπεύθυνοι για τοπική ενδημικότητα. Το ομαδοποιημένο ποσοστό αδρής θνητότητας ασθενών με λοίμωξη από *C. auris* υπολογίστηκε στο 39%, το οποίο ανήλθε στο 45% σε περίπτωση μυκηταιμίας [9]. Ωστόσο, η αναφερόμενη αριθμητική

μείωση των κρουσμάτων μετά από το 2016 [9], πιθανώς να αναιρείται, καθώς τα μετέπειτα χρόνια (2020-2022) δημοσιεύονται πολυάριθμες αναφορές σε επίπεδο χωρών που σημειώνουν είτε τα πρώτα τους κρούσματα είτε αύξηση στη συχνότητα εμφάνισής τους, όπως περιγράφονται στη συνέχεια.



Εικόνα 12. Παγκόσμιος χάρτης με την καταγραφή κρουσμάτων *C. auris* (πάνω), ακριβής αριθμός κρουσμάτων ανά χώρα παρουσιαζόμενα με φθίνουσα σειρά (αριστερά) και ετήσια επιδημιολογική καμπύλη καταγραφής τους (δεξιά) ως και το 2019 [9].

• Ασία

Σύμφωνα με την πρόσφατη ανασκόπηση των Thatchanamoorthy et al. αναφορικά με την επιδημιολογία των λοιμώξεων από *C. auris* στην Ασία στο διάστημα 1996-2021, καταγράφηκαν συνολικά 1.325 περιστατικά, εκ των οποίων 405 μυκηταιμίες, σε 20 χώρες [37]. Ενδεικτική είναι η επίδραση της πανδημίας COVID-19 στη διασπορά του παθογόνου, με μια μελέτη από το Ισραήλ να αναφέρει εκρηκτική αύξηση των κρουσμάτων *C. auris* την τελευταία διετία σε εθνικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, μόλις 24 περιστατικά (~4/έτος) εντοπίστηκαν σε 7 νοσοκομεία το διάστημα 2016-2020 έναντι 120 περιστατικών σε 13 νοσοκομεία και εγκαταστάσεις μακροχρόνιας φροντίδας τη χρονιά 2021 ($p=0,00015$), με την ίδια εικόνα να συνεχίζεται και το πρώτο εξάμηνο του 2022 [38]. Αξίζει να σημειωθεί

ότι στις πρόσφατες καταγραφές καντινταιμίας από *C. auris* ανήκει και το πρώτο κρούσμα στην Τουρκία (Κωνσταντινούπολη) το 2021, το οποίο περιορίστηκε επιτυχώς [39].

- **Αφρική**

Η καταγραφή επιδημιολογικών δεδομένων για την ήπειρο της Αφρικής αποτελεί σε γενικά πλαίσια ιδιαίτερα απαιτητικό έργο. Ενδεικτικά, το μεγαλύτερο ποσοστό των μονάδων υγείας στις χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής είναι αμιγώς ιδιωτικές, δηλαδή λαμβάνουν χρηματοδότηση είτε από τους ίδιους τους ασθενείς είτε μέσω δωρεών. Επιπλέον, το 1/3 του πληθυσμού της Αφρικής δεν έχει τη δυνατότητα υγειονομικής περίθαλψης εξαιτίας της διαβίωσης σε συνθήκες ακραίας φτώχειας. Συγχρόνως σημαντικές είναι οι προκλήσεις όσον αφορά τη διαθεσιμότητα φαρμάκων, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς καταλήγουν να νοσηλεύονται σε προχωρημένα στάδια μιας νόσου δεδομένου ότι οι εγκαταστάσεις πρωτοβάθμιας υγειονομικής περίθαλψης παρουσιάζουν ανεπάρκεια υποδομών και δεξιοτήτων [40]. Ο πληθυσμός της αφρικανικής ηπείρου μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα ευάλωτος σε λοιμώξεις από *C. auris* λόγω της ύπαρξης υψηλού ποσοστού ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, κυρίως ασθενών που πάσχουν από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας. Μέχρι στιγμής, τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα για περιστατικά *C. auris* στην Υποσαχάρια Αφρική προέρχονται κυρίως από την Κένυα και τη Νότια Αφρική, χώρες με πρόσβαση τόσο σε διαγνωστικές μεθόδους μυκητικών λοιμώξεων, όσο και σε φάρμακα για την περίθαλψή τους, με σχετικά προηγμένα συστήματα υγειονομικής φροντίδας. Επομένως, η ύπαρξη κρουσμάτων θεωρείται πολύ πιθανή και σε άλλες χώρες της ηπείρου, αλλά χωρίς τη δυνατότητα εντοπισμού και επιτήρησής τους [40].

Η πρώτη λοίμωξη από *C. auris* στην Αφρική εντοπίζεται το 2009 στη Νότια Αφρική. Συγκεκριμένα, το προαναφερθέν κλινικό στέλεχος είχε αρχικά ταυτοποιηθεί λανθασμένα με συμβατικές μεθόδους ως *C. haemulonii*, ωστόσο το 2014 ταυτοποιήθηκε σωστά με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών όταν παρουσιάστηκαν ακόμη τέσσερα κρούσματα *C. auris* στη χώρα. Στο διάστημα 2012-2016 στη Νότια Αφρική, καταγράφηκαν 931 και 114 περιστατικά *C. auris* σε ιδιωτικά και δημόσια νοσοκομειακά ιδρύματα, αντίστοιχα [41]. Μια μελέτη ενός κέντρου στην Κένυα υπέδειξε πως η *C. auris* ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας του 38% των καντινταιμιών την περίοδο 2010-2016 [42]. Πρόσφατα απομονώθηκαν τα πρώτα τέσσερα κλινικά στελέχη *C. auris* στη Δυτική Αφρική,

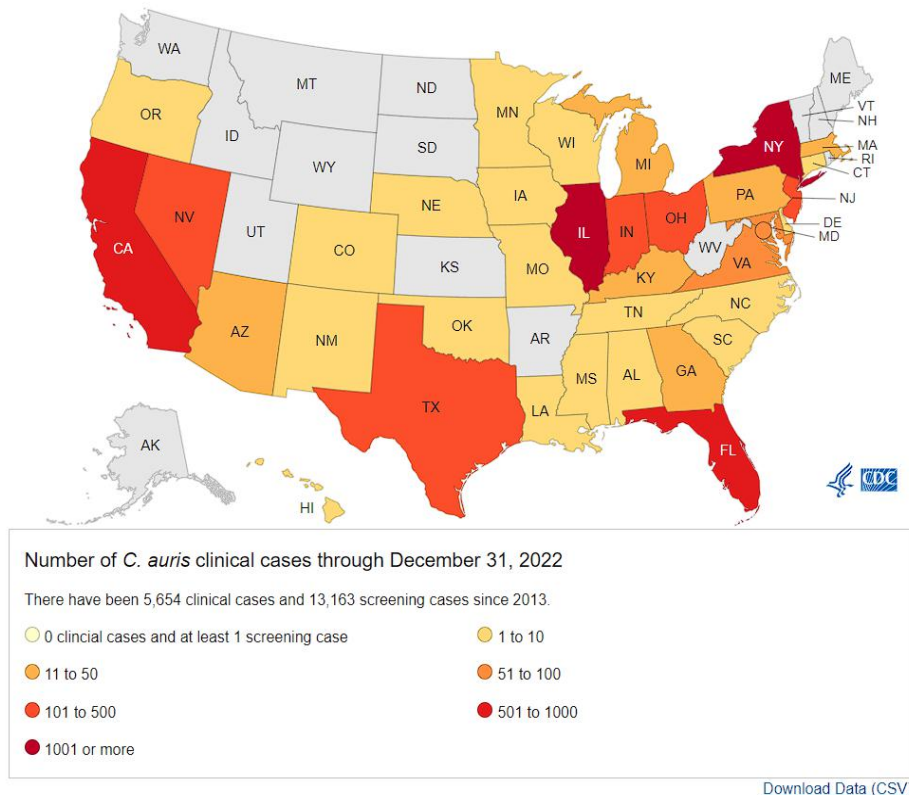
συγκεκριμένα στη Νιγηρία, τα οποία είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί με φαινοτυπικές μεθόδους ως non-*albicans* *Candida* spp., γεγονός που ενέτεινε το φόβο για περισσότερες τέτοιες περιπτώσεις στη χώρα, καθώς δεν είναι διαθέσιμες οι εργαστηριακές τεχνικές που απαιτούνται για την ορθή ταυτοποίηση του είδους. Σημειωτέον, τα προαναφερθέντα στελέχη άνηκαν στους κλάδους I και IV, με την παρουσία διαφορετικών κλάδων να συνηγορεί υπέρ της αναγκαιότητας ενεργής επιτήρησης των μυκητικών λοιμώξεων [43]. Τέλος, μια μελέτη ενός κέντρου στην Αλγερία κάνει λόγο για 7 στελέχη, τα οποία είχαν απομονωθεί την περίοδο 2017-2019, όμως μόλις πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν μοριακά ως *C. auris* [44].

- **Βόρεια Αμερική**

Κρούσματα *C. auris* στη Βόρεια Αμερική καταγράφονται για πρώτη φορά το 2016 στις ΗΠΑ, αμέσως μετά στον Καναδά (2017) και κατά την περίοδο της πανδημίας COVID-19 στο Μεξικό (2020) [45]. Σύμφωνα με την πρόσφατη επιδημιολογική αναφορά των CDC, τα περιστατικά λοιμώξεων από *C. auris* στις ΗΠΑ διπλασιάστηκαν μεταξύ 2019 και 2021 (44% έναντι 95%), ενώ μέχρι το τέλος του 2021 κρούσματα είχαν καταγραφεί σε 36/50 πολιτείες, με το συνολικό αριθμό τους να ανέρχεται στα 10.683 (3.270 λοιμώξεις και 7.413 αποικισμοί). Η δραματική αυτή αύξηση θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί στις κακές γενικές πρακτικές πρόληψης και ελέγχου λοιμώξεων στις μονάδες υγειονομικής περίθαλψης, καθώς και στη γενικότερη καταπόνηση του συστήματος υγείας κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19 [46]. Το υψηλό καταγεγραμμένο ποσοστό αδρής θνητότητας (34%) ασθενών με λοίμωξη από *C. auris* στις ΗΠΑ, το οποίο αγγίζει το 47% σε περίπτωση μυκηταιμίας, κρούει τον κώδωνα του κινδύνου [47]. Με γνώμονα τα προαναφερθέντα, τα CDC θέσπισαν πρόσφατα μια υπηρεσία πληροφοριών για την επιδημιολογική επιτήρηση των κρουσμάτων *C. auris* στις ΗΠΑ, αποσκοπώντας συγχρόνως στην αξιολόγηση των στρατηγικών πρόληψης και στην ενημέρωση ορθών πρακτικών για την προάσπιση της δημόσιας υγείας [48].

Make a selection from the filters to change the visualization information.

All years



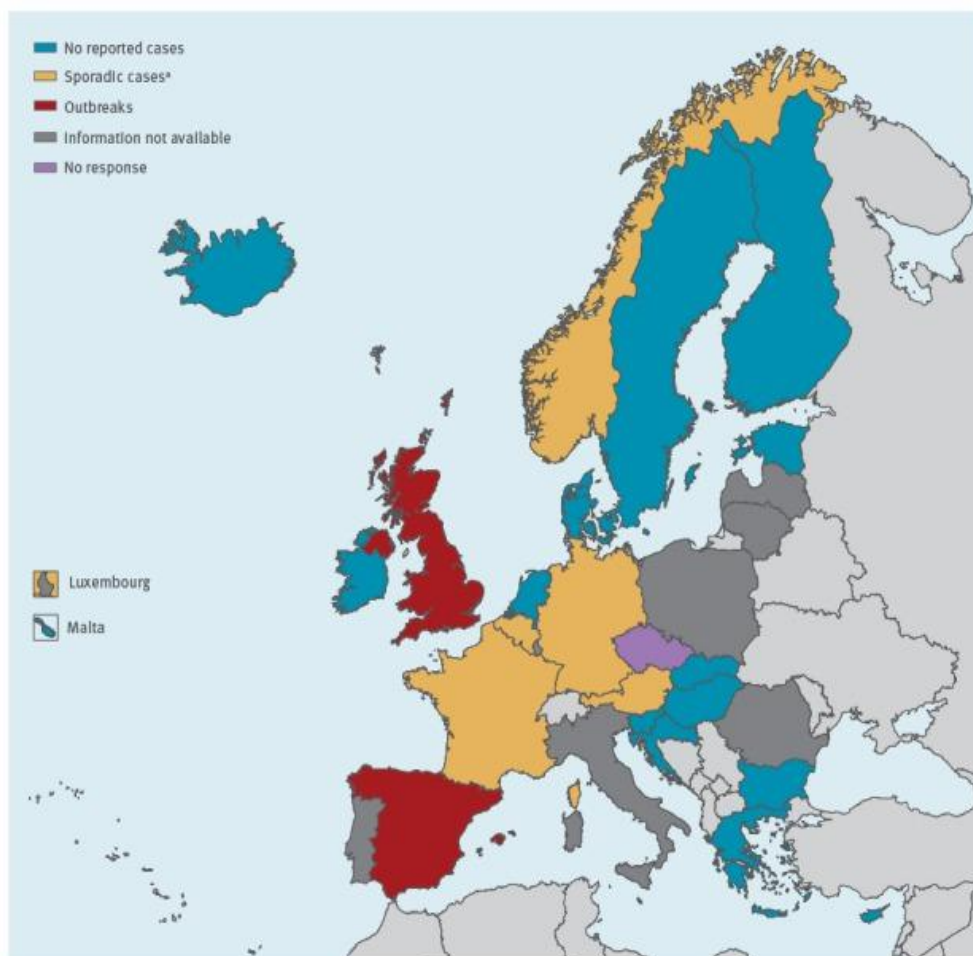
Εικόνα 13. Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων *C. auris* στις διάφορες πολιτείες των ΗΠΑ έως τις 31 Δεκεμβρίου 2022 [48].

• **Νότια Αμερική**

Σύμφωνα με τα στοιχεία του παναμερικανικού οργανισμού υγείας, η πρώτη συρροή κρουσμάτων *C. auris* στη Νότια Αμερική σημειώθηκε το 2012 στη Βενεζουέλα, ενώ τα επόμενα χρόνια ακολούθησε καταγραφή περιστατικών στην Κολομβία (2015), στον Παναμά (2017), στην Κόστα Ρίκα και στη Χιλή (2019), και στη διάρκεια της πανδημίας COVID-19 στη Βραζιλία, στη Γουατεμάλα και στο Περού (2020) [45]. Ανησυχητικές είναι οι αλλαγές στην επιδημιολογική εικόνα με την πάροδο του χρόνου, με την Κολομβία να καταγράφει αξιοσημείωτη αύξηση στη γεωγραφική εξάπλωση, στον αριθμό νέων περιστατικών και στα ποσοστά αντοχής των κλινικών στελεχών στη φλουконаζόλη (flucanazole, FLC) μεταξύ 2015 και 2020 [49], ενώ στη Βραζιλία παρατηρείται αυξημένη ικανότητα των απομονωθέντων στελεχών να σχηματίζουν βιοϋμένια [50].

- **Ευρώπη**

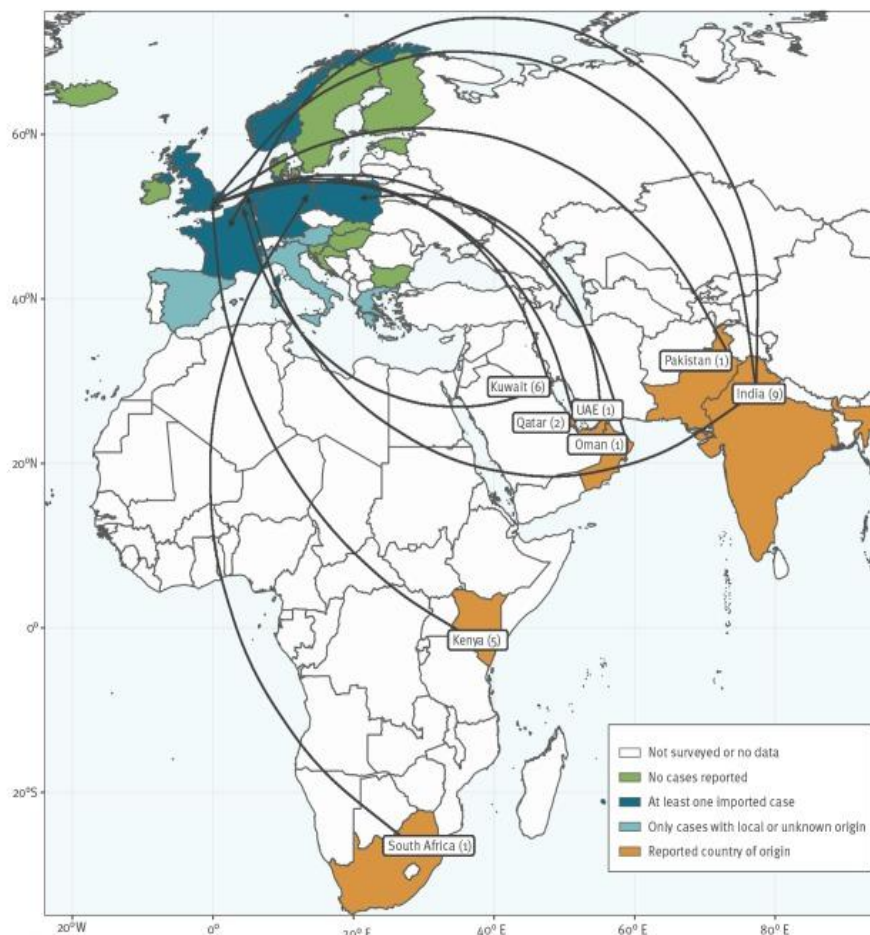
Σύμφωνα με έρευνα του ευρωπαϊκού κέντρου πρόληψης και ελέγχου νοσημάτων καταγράφηκαν 620 περιστατικά *C. auris* στις χώρες της ευρωπαϊκής ένωσης και του ευρωπαϊκού οικονομικού χώρου (ΕΕ/ΕΟΧ) κατά την πενταετία 2013-2017, με την πλειονότητά τους να προέρχονται από τέσσερις μεγάλες συρροές κρουσμάτων. Συγκεκριμένα, κρούσματα αναφέρθηκαν σε μόλις 7 χώρες: στην Ισπανία ($n=388$), στο Ηνωμένο Βασίλειο ($n=221$), στη Γερμανία ($n=7$), στη Γαλλία ($n=2$), στο Βέλγιο ($n=1$), στη Νορβηγία ($n=1$) και ένα κρούσμα στην Αυστρία τον Ιανουάριο του 2018 [51].



Εικόνα 14. Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων *C. auris* ($n=620$) σε χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ στο διάστημα 2013-2017 [51].

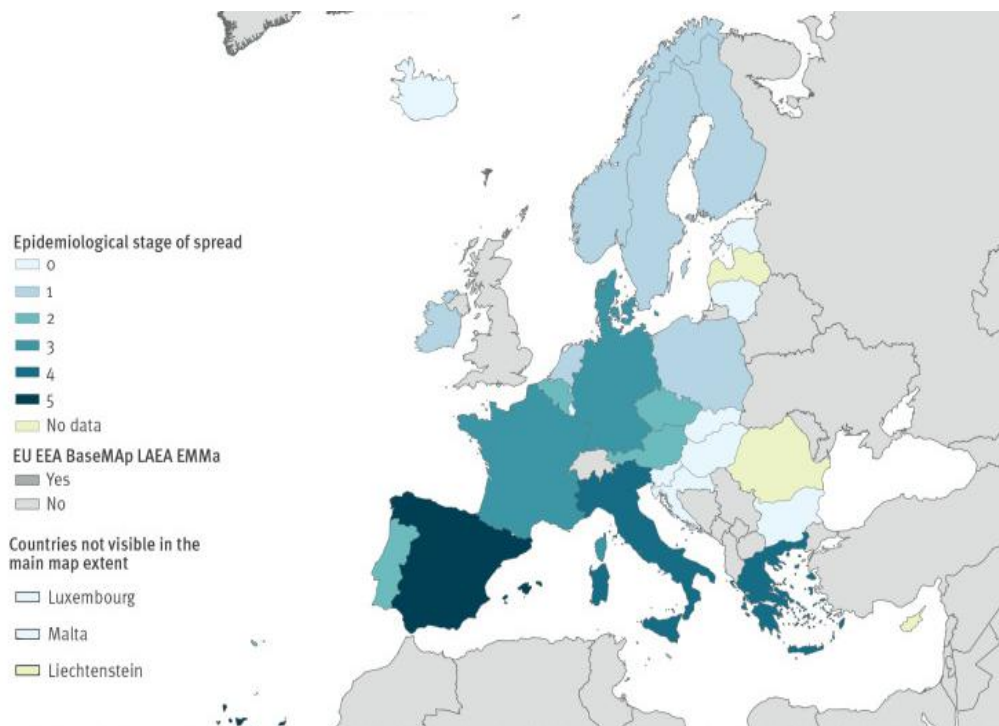
Τα επόμενα δύο έτη (2018-2019), ο συνολικός αριθμός των καταγραφών έφτασε στα 349. Η Ελλάδα, η Ολλανδία και η Πολωνία σημείωσαν τα πρώτα περιστατικά και ο αριθμός των χωρών της ΕΕ/ΕΟΧ με καταγεγραμμένα κρούσματα ανήλθε πλέον στο 10, με

την Ισπανία και το Ηνωμένο Βασίλειο να εξακολουθούν να κρατούν το προβάδισμα. Από το σύνολο των κρουσμάτων, τα 324 (93%) αποκτήθηκαν στη χώρα εντοπισμού τους, τα 19 (5%) θεωρήθηκαν εισαγόμενα, λόγω ιστορικού νοσηλείας των ασθενών σε χώρες με καταγεγραμμένα κρούσματα, ενώ σε 6 (2%) ο τρόπος επαφής με το παθογόνο παρέμεινε άγνωστος. Τα 19 εισαγόμενα κρούσματα καταγράφηκαν από τον Ιανουάριο 2018 έως το Μάιο 2019, εκ των οποίων τα 8 εισάχθηκαν από την Ινδία, 4 από την Κένυα, 2 από το Κατάρ και από 1 από το Κουβέιτ, το Ομάν, το Πακιστάν, τη Νότια Αφρική και τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα. Πριν από αυτήν την περίοδο, με αρχή τον Ιανουάριο 2013, τα καταγεγραμμένα κρούσματα με προέλευση εκτός ΕΕ/ΕΟΧ αριθμούσαν μόλις τα 7 (1 από Ινδία, 1 από Κένυα και 5 από Κουβέιτ) [52].



Εικόνα 15. Γεωγραφική κατανομή και προέλευση κρουσμάτων *C. auris* ($n=26$) σε χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ στο διάστημα Ιανουάριος 2013-Μάιος 2019 [52].

Στη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, 8 χώρες κατέγραψαν 335 κρούσματα *C. auris* για το έτος 2020. Ανησυχητικά, ο αριθμός των περιστατικών διπλασιάστηκε (655) την επόμενη χρονιά. Συγκεκριμένα, το 2021 αναφέρθηκαν περιστατικά σε 13 χώρες, εκ των οποίων σε 5 (Γαλλία, Γερμανία, Δανία, Ελλάδα και Ιταλία) σημειώθηκαν συνολικά 14 συρροές κρουσμάτων, ενώ η Ισπανία ανέφερε τοπική ενδημικότητα. Στη διετία 2020-2021 προστέθηκαν στη λίστα των χωρών της ΕΕ/ΕΟΧ με καταγεγραμμένα κρούσματα *C. auris* η Τσεχία, η Σουηδία, η Ιταλία, η Ιρλανδία, η Φιλανδία και η Δανία. 11 χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ (Βουλγαρία, Εσθονία, Ισλανδία, Κροατία, Λιθουανία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Ουγγαρία, Πορτογαλία, Σλοβακία και Σλοβενία) δεν είχαν εντοπίσει ακόμη περιστατικά μέχρι το 2021, ενώ σε 4 χώρες δεν ήταν διαθέσιμες οι πληροφορίες σε εθνικό επίπεδο (Κύπρος, Λετονία, Λιχτενστάιν και Ρουμανία) [53].



Εικόνα 16. Επιδημιολογικά στάδια διασποράς της *C. auris* σε 30 χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ για το έτος 2022 [53].

Ήδη από τις αρχές του 2018, η Ελλάδα ήταν μεταξύ των 20/29 χωρών της ΕΕ/ΕΟΧ που δήλωσαν έτοιμες για την ορθή εργαστηριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση της *C. auris*. Συγχρόνως, όμως, η χώρα ανέφερε τη μέχρι τότε απουσία οδηγιών για εργαστηριακές δοκιμές, κλινική διαχείριση, έλεγχο των λοιμώξεων και μελλοντική επιτήρηση [51]. Η απομόνωση του πρώτου κλινικού στελέχους *C. auris* στη χώρα μας από δείγμα βρογχικών

εκκρίσεων ενός ασθενή με κυστική ίνωση το 2019 [54], αποτέλεσε το έναυσμα για την κατάρτιση εθνικών κατευθυντήριων οδηγιών για τα προαναφερθέντα την ίδια χρονιά [52].

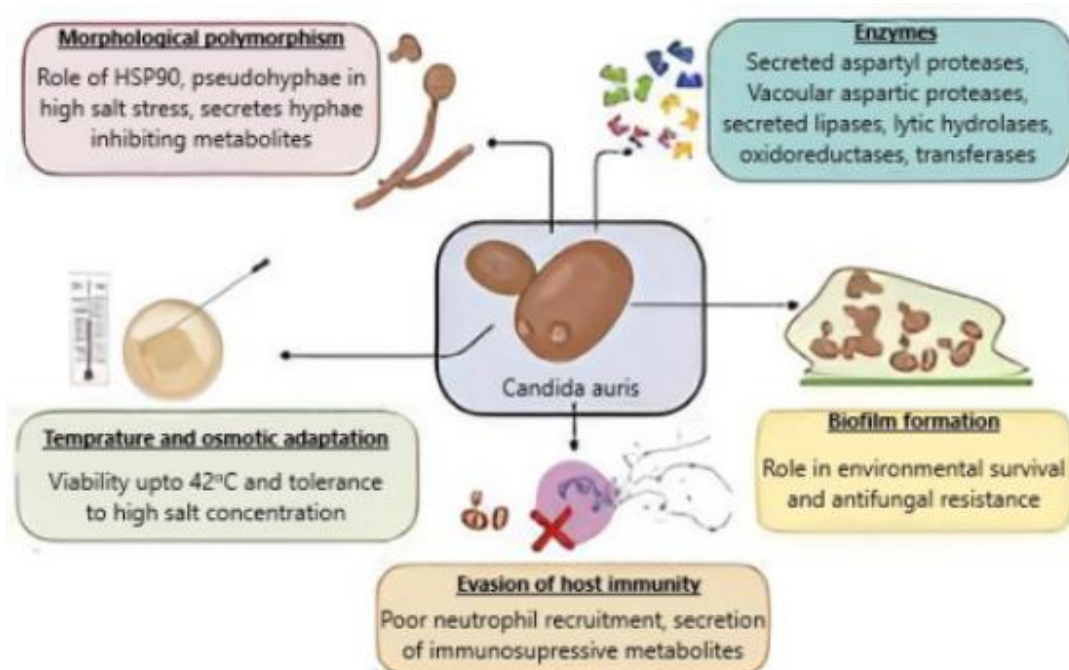
Κατά την περίοδο της πανδημίας COVID-19 (2020-2021), η Ελλάδα συγκαταλέχθηκε μεταξύ των χωρών της ΕΕ/ΕΟΧ με αυξημένη επιδημιολογική διασπορά της *C. auris* (επίπεδο 4), υποδηλώνοντας πολλαπλές εστίες, με επιβεβαιωμένες ή πιθανές ενδονοσοκομειακές διασπορές. Ο συνολικός αριθμός των καταγεγραμμένων περιστατικών στη χώρα μας για το διάστημα 2019-2021 ήταν 74, εκ των οποίων 3 αναφέρθηκαν το 2019, 13 το 2020 και 58 το 2021 [53]. Μια πρόσφατη αναδρομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς νοσηλευόμενους στη ΜΕΘ ενός νοσοκομείου τριτοβάθμιας φροντίδας στην Αθήνα κατά την περίοδο 2020-2022 υπέδειξε πέντε περιστατικά *C. auris*. Σημειωτέον, το πρώτο κρούσμα εντοπίστηκε πριν τη μετατροπή της μονάδας σε COVID-19 ΜΕΘ, ενώ τα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν ανήκαν όλα στον κλάδο I (Νότιας Ασίας) και παρουσίαζαν υψηλό βαθμό γενετικής συγγένειας, τονίζοντας τη δυνατότητα της μακροχρόνιας επιβίωσης του παθογόνου στο νοσοκομειακό περιβάλλον [55]. Μια άλλη μελέτη σε ένα Πανεπιστημιακό νοσοκομείο τριτοβάθμιας φροντίδας στην Αθήνα συνέκρινε την επιδημιολογική εικόνα των καντινταιμιών σε ασθενείς νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ στην προ-COVID-19 (2009-2018, [56]) και COVID-19 εποχή (2020-2022, [57]). Η επίπτωση των καντινταιμιών αυξήθηκε δραματικά κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, με 6,8 περιστατικά (17,46/1.000 εισαγωγές στη ΜΕΘ) να καταγράφονται ετησίως τη δεκαετία 2009-2018 έναντι 44,6 περιστατικών/έτος (61,09/1.000 εισαγωγές στη ΜΕΘ) την τριετία 2020-2022 ($p < 0,0001$). Τα ποσοστά απομόνωσης *C. auris* παρουσίασαν σημαντική αύξηση με την πάροδο του χρόνου (0% το 2020, 13% το 2021 και 30% το 2022, $p < 0,0001$), υπογραμμίζοντας την ανάγκη για αυξημένη ευαισθητοποίηση και αυστηρή εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων.

- **Ωκεανία**

Μέχρι στιγμής, λιγιστά περιστατικά *C. auris* έχουν καταγραφεί στην ήπειρο της Ωκεανίας. Συγκεκριμένα, το 2018 αναφέρθηκαν 5 κρούσματα στην Αυστραλία με όλους τους ασθενείς να έχουν προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομεία του εξωτερικού [6], [58], ενώ το καλοκαίρι του 2023 γνωστοποιήθηκε το πρώτο κρούσμα στη Νέα Ζηλανδία [59].

1.6 Λοιμογονικότητα της *C. auris*

Η λοιμογόνος δράση της *C. auris* έχει διερευνηθεί με τη βοήθεια μιας ποικιλίας *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* μοντέλων [60]–[64]. Ο μορφολογικός πολυμορφισμός της επιτρέπει το σχηματισμό ψευδοϋφών (συσσωματωτικές μορφές) σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας. Ακόμη, η *C. auris* εκκρίνει υδρολάσες (42%), τρανσφεράσες (25%), πρωτεάσες, λιπάσες και οξειδοορεδουκτάσες (19%), που βοηθούν στην προσκόλληση και στην εισβολή του μύκητα στα κύτταρα του ξενιστή [65], [66]. Ένας άλλος παράγοντας λοιμογονικότητάς της είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων, που ισχυροποιεί την επιβίωση της στο περιβάλλον, την προφυλάσσει από τα φαγοκύτταρα του ξενιστή και της προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή στα αντιμυκητικά [67]. Η *C. auris* διαφεύγει της άμυνας του ξενιστή, καθώς εμποδίζει την απελευθέρωση εξωκυττάρων παγίδων ουδετερόφιλων και τελικά τη φαγοκυττάρωσή της [68], [69]. Τέλος, η *C. auris* παρουσιάζει θερμοαντοχή αφού δύναται να αναπτυχθεί ακόμη και στους 42°C, ενώ ευδοκμεί σε περιβάλλοντα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, όπως το ανθρώπινο δέρμα και ο ιδρώτας [34], [35].



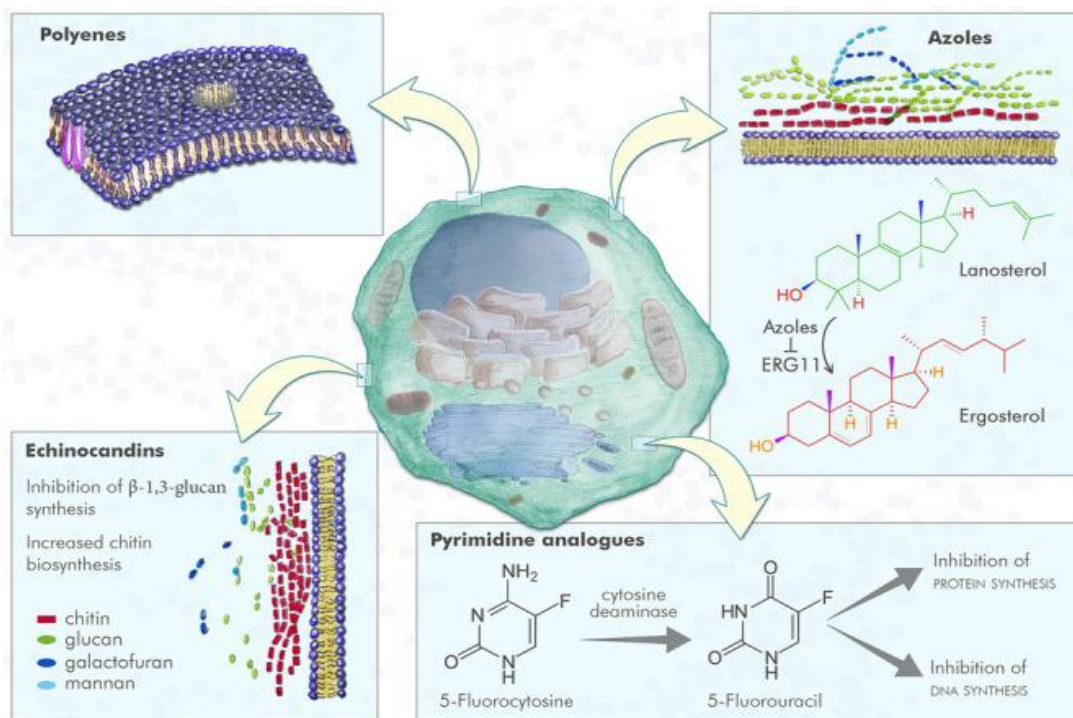
Εικόνα 17. Παράγοντες παθογένειας της *C. auris* [70].

Σε αντίθεση με τα συνήθη *Candida* spp., για τα οποία η πηγή της λοίμωξης είναι συνήθως η χλωρίδα του γαστρεντερικού του ίδιου του ασθενούς, οι λοιμώξεις από *C. auris* προκαλούνται κυρίως με τη μεταφορά του παθογόνου με τα χέρια από συν-νοσηλεύμενο

αποικισμένο ασθενή ή/και από το αποικισμένο άψυχο περιβάλλον (οριζόντια εξάπλωση και επιδημικές λοιμώξεις) [71].

1.7 Αντοχή της *C. auris* στα αντιμυκητικά

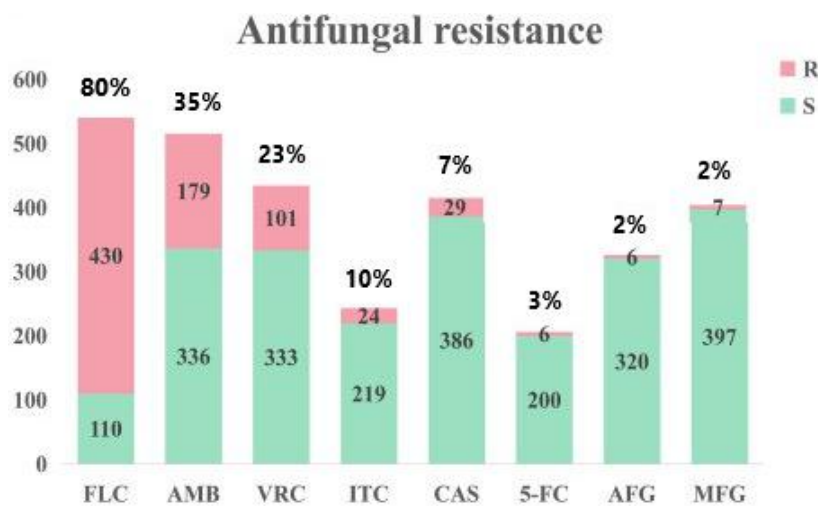
Τα αντιμυκητικά φάρμακα είναι μυκητοκτόνες ή μυκητοστατικές ουσίες, που διακρίνονται στα πολυένια, στις αζόλες, στα ανάλογα πυριμιδίνης και στις εχινοκανδίνες. Τα πολυένια δρουν δεσμεύοντας την εργοστερόλη, η οποία αποτελεί βασική συνιστώσα της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Οι αζόλες και τα ανάλογα πυριμιδίνης αναστέλλουν τη σύνθεση της εργοστερόλης και του μυκητικού DNA/RNA, αντίστοιχα. Τέλος, οι εχινοκανδίνες αναστέλλουν τη σύνθεση της (1,3)-β-D-γλυκάνης, συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος πολλών μυκήτων [72].



Εικόνα 18. Μηχανισμοί δράσης αντιμυκητικών παραγόντων [72].

Δεδομένου του περιορισμένου θεραπευτικού οπλοστασίου για τις μυκητικές λοιμώξεις, η εμφάνιση αντοχής ακόμη και σε μία από τις κύριες κατηγορίες αντιμυκητικών φαρμάκων είναι κρίσιμη. Η *C. auris* παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά αντοχής στη FLC, με

τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) συνήθως >64 mg/L. Άλλες αζόλες, όπως η βορικοναζόλη (voriconazole, VRC), εμφανίζουν μεταβλητή αντιμυκητική δράση. Σχεδόν το 1/3 των στελεχών που έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής παγκοσμίως ήταν R στην αμφοτερικίνη B (amphotericin B, AMB) [12], [24]. Εντούτοις, μόλις το 2-7% ήταν R στις εχινοκανδίνες [12], [24], οι οποίες αποτελούν τη θεραπεία εκλογής για διεισδυτικές λοιμώξεις από *C. auris* [73]. Ανησυχητικά, το ποσοστό PDR στελεχών, δηλαδή αυτών που εμφάνιζαν αντοχή και στις τρεις κοινές κατηγορίες αντιμυκητικών (αζόλες, πολυένια και εχινοκανδίνες), ήταν 4% επί του συνόλου των απομονωθέντων στελεχών *C. auris* στη Βόρεια Αμερική κατά την τετραετία 2012-2015 [31]. Σημειωτέον, έχει αναφερθεί υψηλή ετερογένεια στις κατανομές των MICs διαφόρων αντιμυκητικών ανάλογα με το γεωγραφικό εντοπισμό των στελεχών, τον κλάδο που αυτά ανήκουν και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό τους [12], [24], [74], [75].



Εικόνα 19. Ποσοστά αντοχής της *C. auris* έναντι 8 αντιμυκητικών παραγόντων [76].

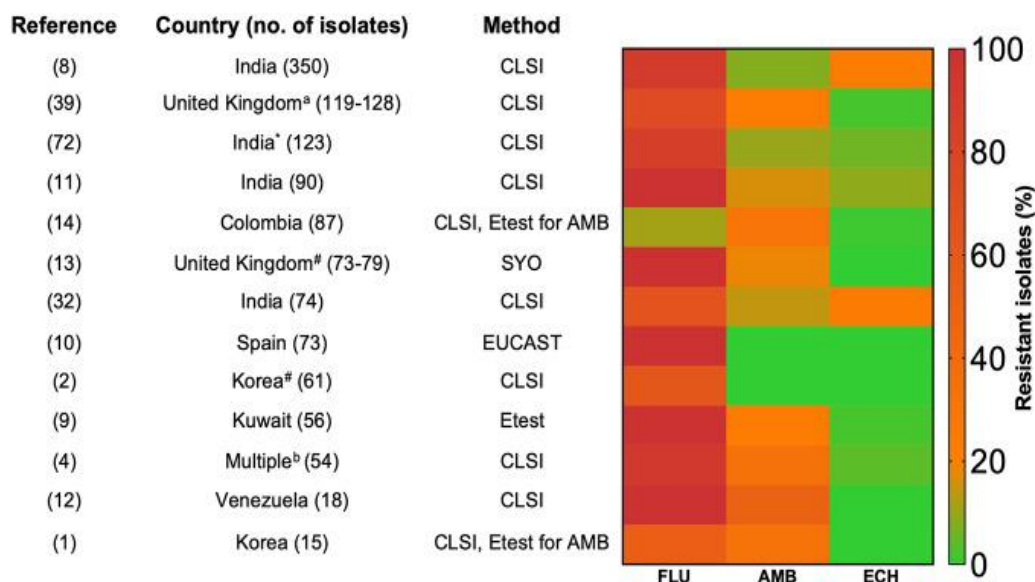
Clade (n)	Frequency (%) of antifungal drug resistance in isolates (n)					
	Susceptible	Fluconazole resistant	Amphotericin B resistant	Micafungin resistant	MDR ^a	XDR ^b
Clade I (118 ^c)	3 (4)	97 (114)	47 (54)	6 (7)	45 (53)	3 (4)
Clade II (7)	86 (6)	14 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Clade III (51)	2 (1)	98 (50)	0 (0)	8 (4)	8 (4)	0 (0)
Clade IV (120)	31 (37)	59 (71)	11 (13)	9 (11)	10 (12)	0 (0)
Total (296)	16 (48)	80 (236)	23 (67)	7 (22)	23 (69)	1 (4)

^aMDR, multidrug resistance to two major antifungal classes.

^bXDR, extensive drug resistance to three major antifungal classes.

^cComplete AFST data for 8 of the 126 clade I isolates were missing.

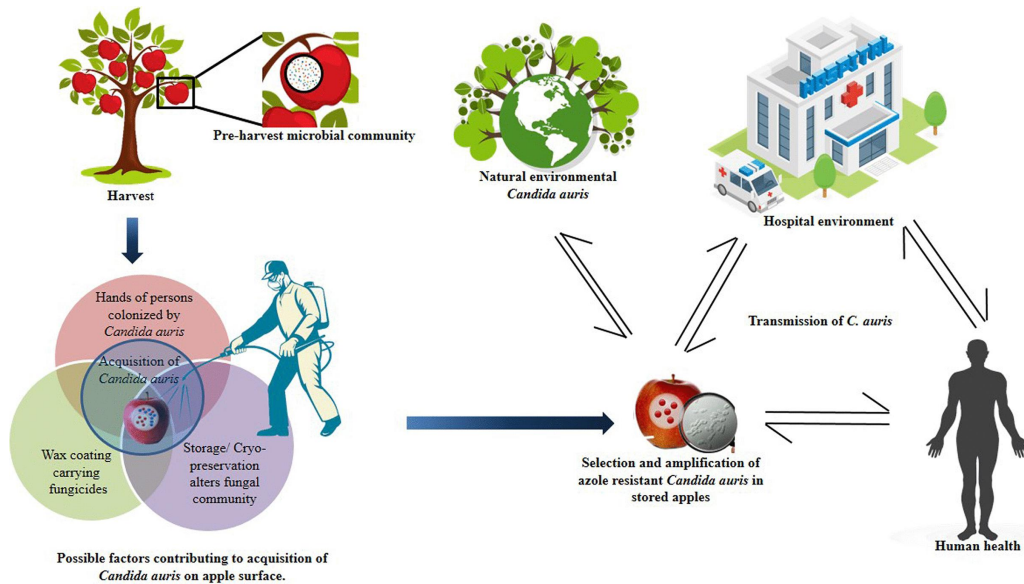
Εικόνα 20. Ποσοστά αντιμυκητικής αντοχής της *C. auris* ανά κλάδο [24].



Εικόνα 21. Ποσοστά αντιμυκητικής αντοχής της *C. auris* ανά χώρα και ανά μέθοδο προσδιορισμού της *in vitro* ευαισθησίας. Ο χάρτης θερμότητας απεικονίζει το ποσοστό των R στελεχών στη φλουκοναζόλη (FLU), στην αμφοτερικίνη B (AMB) και στις εχινοκανδίνες (ECH) [74].

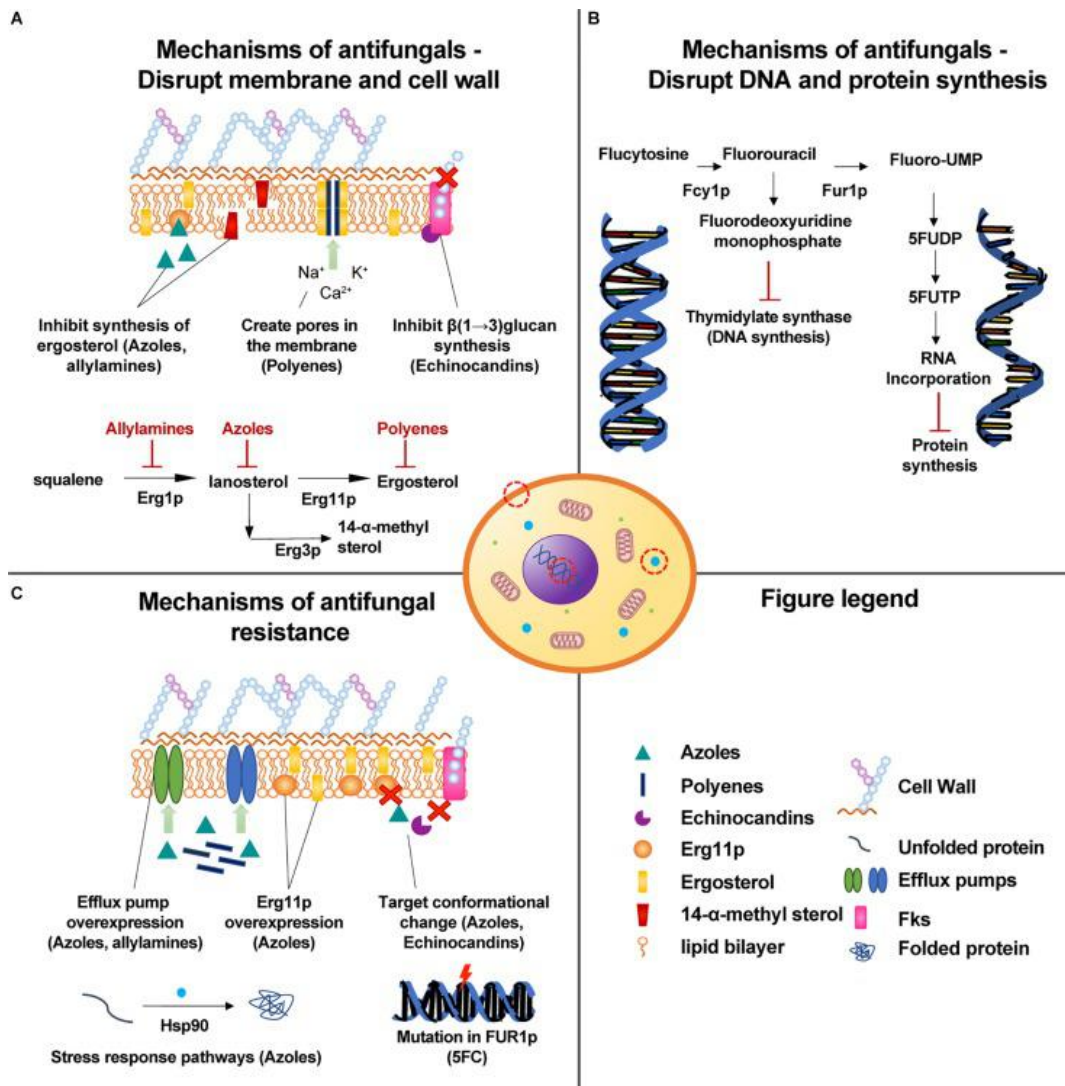
Η εκθετική αύξηση στη χρήση αντιμικροβιακών στην ιατρική, στη γεωργία, στην κτηνοτροφία και στη βιομηχανία, έχει ενδεχομένως ωθήσει την *C. auris* να αποκτήσει πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής στα αντιμυκητικά [77]. Μία πρόσφατη μελέτη, υπέδειξε την ύπαρξη στελεχών *C. auris* σε αποθηκευμένα μήλα, στην επιφάνεια των οποίων ανιχνεύτηκαν μυκητοκτόνα αζόλης που πιθανότατα συνέβαλαν στην αυξημένη αντοχή στις τριαζόλες που εμφάνισαν τα προαναφερθέντα στελέχη. Σημειωτέον, τα συγκεκριμένα

περιβαλλοντικά στελέχη συσχετίστηκαν με κλινικά, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το περιβάλλον χρησιμεύει ως πιθανή δεξαμενή για τη μετάδοση της *C. auris* στον άνθρωπο [78].



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση αποθηκευμένων μήλων ως πιθανή δεξαμενή επιλογής και μετάδοσης R στις αζόλες στελεχών *C. auris* [78].

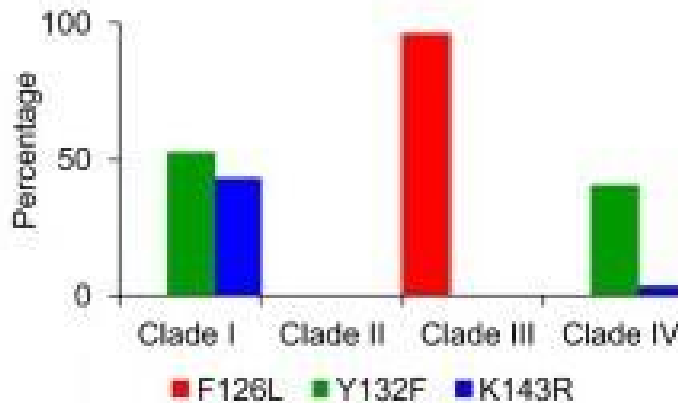
Διάφοροι μηχανισμοί έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής της *C. auris* στα αντιμυκητικά, οι οποίοι περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη ή και την υπερέκφραση του στόχου του φαρμάκου, αλλαγές στην πρόσληψη ή και στην εκροή του φαρμάκου, την ενεργοποίηση μονοπατιών απόκρισης στο στρες και το σχηματισμό βιοϋμενίων.



Εικόνα 23. Μηχανισμοί δράσης αντιμυκητικών παραγόντων και ανάπτυξης αντοχής στα αντιμυκητικά στην *C. auris*. (A) Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιμυκητικών που διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα. (B) Μηχανισμός αναστολής της σύνθεσης του μυκητικού DNA/RNA στον πυρήνα. (Γ) Μηχανισμοί αντοχής στα αντιμυκητικά που δρουν στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρικό τοίχωμα [20].

Πολυάριθμες μελέτες WGS κλινικών στελεχών *C. auris* υπέδειξαν ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση αντοχής στις αζόλες και στις εχινοκανδίνες είναι τα *ERG11* και *FKS1*, αντίστοιχα [79], [80]. Ειδικότερα, για την αντοχή στη FLC, που παρατηρείται στα περισσότερα στελέχη *C. auris*, έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί τρεις υπεύθυνες μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERG11*, συγκεκριμένα η Y132F, η K143R και η F126L. Σημειωτέον, οι μεταλλάξεις αυτές έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με τον κλάδο, με τις Y132F και K143R να αναφέρονται κυρίως σε στελέχη που ανήκουν στους κλάδους I και IV, ενώ η F126L έχει εντοπιστεί αποκλειστικά σε στελέχη κλάδου III. Αντιθέτως, η

εμφάνιση αντοχής στις εχινοκανδίνες έχει συνδεθεί με μία μετάλλαξη στο γονίδιο *FKSI*, συγκεκριμένα τη S639P/F [24]. Αναφορικά με την εμφάνιση αντοχής στην AMB, πρόσφατα περιγράφηκε ο πρώτος μηχανισμός που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERG6* [81].



Εικόνα 24. Συχνότητα εμφάνισης των σημειακών μεταλλάξεων Y132F, K143R και F126L στο γονίδιο *ERG11* ανά κλάδο για 296 στελέχη *C. auris* [24].

Τέλος, η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων αυξάνει την αντοχή της *C. auris* σε όλα τα επί του παρόντος διαθέσιμα αντιμυκητικά έως και 1.000 φορές, ενώ πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp90 προάγουν τη σηματοδότηση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος και τις αποκρίσεις στρες που σχετίζονται με τη χορήγηση αζολών, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη της αντοχής στη συγκεκριμένη κατηγορία φαρμάκων [20].

1.8 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για λοιμώξεις από *C. auris*

Η επιλογή της βέλτιστης θεραπείας λοιμώξεων από *C. auris* εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενούς, ο εντοπισμό της λοίμωξης, η προηγούμενη λήψη αντιμυκητικών φαρμάκων καθώς και το ίδιο το παθογόνο αναφορικά με το προφίλ ευαισθησίας του στα αντιμυκητικά και την ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένια [31]. Δε συνιστάται η χορήγηση αντιμυκητικής αγωγής σε ασθενείς αποικισμένους με *C. auris*, χωρίς διηθητική λοίμωξη [73].

Σύμφωνα με τις πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες των CDC, θεραπεία πρώτης γραμμής για διηθητική λοίμωξη για τους ενήλικες και τα παιδιά ηλικίας ≥ 2 μηνών, ακόμη

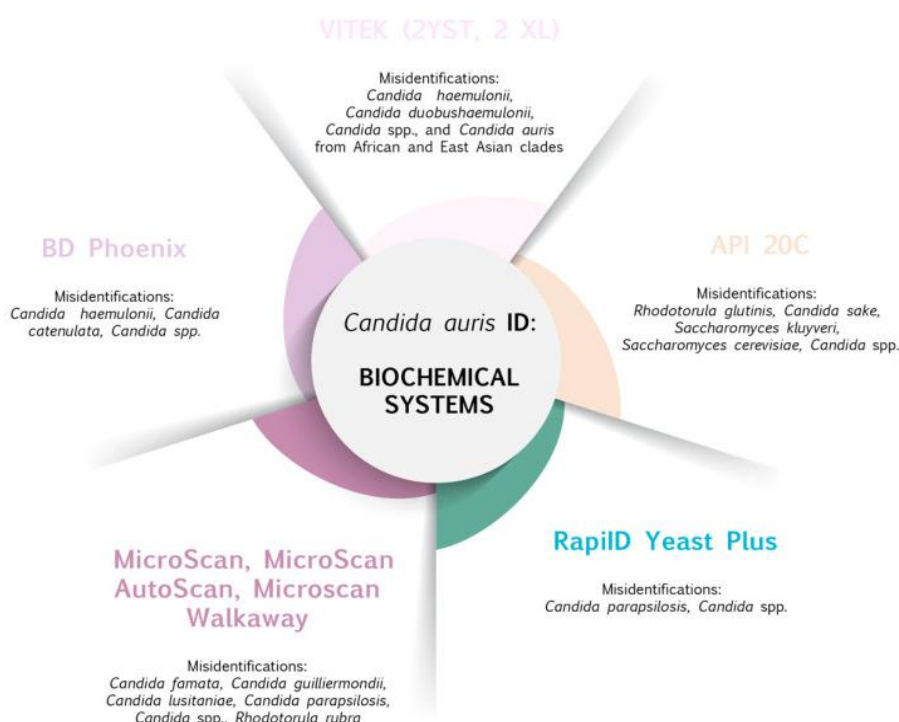
και πριν από τη λήψη των οριστικών αποτελεσμάτων του ελέγχου ευαισθησίας, είναι οι εχινοκανδίνες. Δεδομένου ότι η *C. auris* φαίνεται να αναπτύσσει γρήγορα αντοχή υπό θεραπεία, οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιμυκητική αγωγή θα πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά για κλινική βελτίωση, ενώ θα πρέπει να διεξάγονται καλλιέργειες παρακολούθησης και επαναλαμβανόμενες δοκιμές ελέγχου ευαισθησίας. Ωστόσο, σε περίπτωση μη κλινικής ανταπόκρισης στη θεραπεία με εχινοκανδίνες ή μη υποχώρησης των συμπτωμάτων μετά το πέρας 5 ημερών, συνιστάται η χορήγηση λιποσωμικής AMB (5 mg/kg ημερησίως). Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την καταλληλότερη θεραπεία για PDR στελέχη. Η συνδυαστική αντιμυκητική θεραπεία έδωσε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε εργαστηριακές δοκιμές, αλλά δεν έχει αξιολογηθεί σε κλινικές συνθήκες [73].

Από την άλλη πλευρά, σε νεογνά και σε βρέφη ηλικίας <2 μηνών, θεραπεία εκλογής θεωρείται η δεοξυχολική AMB (1 mg/kg ημερησίως), ενώ σε περίπτωση μη κλινικής ανταπόκρισης συνιστάται η χορήγηση λιποσωμικής AMB (5 mg/kg ημερησίως). Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, όπου η εμπλοκή του κεντρικού νευρικού συστήματος έχει αποκλειστεί οριστικά, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο χορήγησης εχινοκανδινών (κασποφουγκίνης (casprofungin, CAS) 25 mg/m² ημερησίως ή μικαφουγκίνης (micafungin, MFG) 10 mg/kg ημερησίως) [73].

2. Εργαστηριακή διάγνωση της *C. auris*

2.1 Ταυτοποίηση

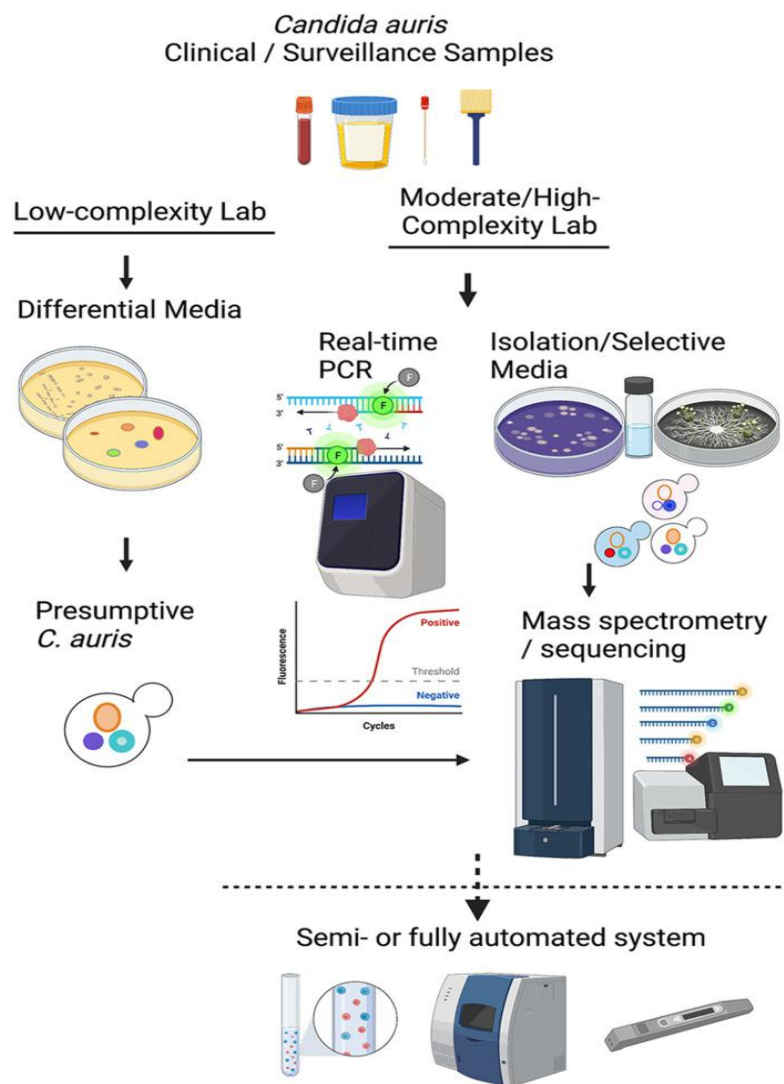
Η *C. auris* δε διαθέτει διακριτά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν εύκολα να τη διαχωρίσουν από άλλα *Candida* spp. Μάλιστα, η ταυτοποίησή της δεν είναι εφικτή με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα χρωμογόνα θρεπτικά υλικά, ενώ τα αποτελέσματα κοινών εμπορικά διαθέσιμων χειροκίνητων (API[®]20C, Microscan, Auxacolor) και αυτοματοποιημένων (BD Phoenix, VITEK 2) συστημάτων ταυτοποίησης ζυμομυκήτων, τα οποία βασίζονται στη ζύμωση ή την αφομοίωση σακχάρων, είναι αναξιόπιστα [11].



Εικόνα 25. Εσφαλμένη ταυτοποίηση της *C. auris* με τη χρήση κοινών εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων ταυτοποίησης ζυμομυκήτων που βασίζονται στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε είδους [11].

Ως εκ τούτου, μέθοδοι αναφοράς για την ταυτοποίηση της *C. auris* αποτελούν μέχρι στιγμής οι μοριακές τεχνικές βασιζόμενες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και η φασματοφωτομετρία μάζας με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-ToF MS) [83]. Εντούτοις, η πρόσβαση σε τέτοιες μεθόδους είναι περιορισμένη στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη πολλών διαγνωστικών κέντρων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η

ταχεία και έγκυρη ταυτοποίηση της *C. auris* είναι σημαίνουσας σημασίας προκειμένου να αναγνωριστεί γρήγορα, τόσο η ίδια όσο και το προφίλ ευαισθησίας της στα αντιμυκητικά. Με τον τρόπο αυτό, εξυπηρετείται η έγκαιρη χορήγηση ενδεδειγμένης θεραπείας στους ασθενείς και προλαμβάνονται εστίες μετάδοσης [20].



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μεθόδων ταυτοποίησης της *C. auris* που εφαρμόζονται σε εργαστήρια που δε διαθέτουν προηγμένα μέσα ταυτοποίησης του είδους (αριστερά) και σε εξελιγμένα εργαστήρια που χρησιμοποιούν τεχνικές PCR και χρωματογραφίας μάζας για την ανίχνευσή της (δεξιά) [83].

2.2 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας σε αντιμυκητικούς παράγοντες

Η διενέργεια του AFST είναι απαραίτητη, καθώς παρουσιάζονται διακυμάνσεις όσον αφορά τα προφίλ ευαισθησίας, τόσο μεταξύ στελεχών, όσο και ειδών. Η μεταβαλλόμενη επιδημιολογία των μυκητιάσεων, περιλαμβάνει πλέον απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις

από νεοαναδυόμενα παθογόνα, μεταξύ άλλων και της *C. auris*, με επίκτητη αντοχή σε διάφορες κατηγορίες αντιμυκητικών παραγόντων. Ο AFST προσφέρει καλύτερη πρόβλεψη του κλινικού αποτελέσματος, καθώς και περισσότερες φαρμακευτικές επιλογές με στόχο τη βελτιστοποίηση της θεραπείας [84].

Ο AFST μπορεί να πραγματοποιηθεί με την πρότυπη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό (broth microdilution, BMD) ή εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες, με τις τελευταίες να διακρίνονται σε χειροκίνητες και αυτοματοποιημένες. Σκοπός της διεξαγωγής του είναι ο προσδιορισμός της MIC, δηλαδή της χαμηλότερης συγκέντρωσης ενός αντιμυκητικού παράγοντα που αναστέλλει την ανάπτυξη του υπό έλεγχο στελέχους *in vitro* σε καθορισμένο βαθμό. Η ερμηνεία των τιμών MIC στηρίζεται σε δύο κατηγορίες ορίων εκτίμησης της ευαισθησίας: τα κλινικά όρια (clinical breakpoints, CBPs) και τα επιδημιολογικά όρια (epidemiological cut-off values, ECVs/ECOFFs).

Τα CBPs καθορίζονται σύμφωνα με το αποτέλεσμα της δράσης ενός αντιμυκητικού στον άνθρωπο. Προσδιορίζονται κατά τη διεξαγωγή μεγάλων κλινικών μελετών κατόπιν της σύγκρισης της τιμής MIC και του θεραπευτικού αποτελέσματος, λαμβάνοντας υπόψη φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές (pharmacokinetic/pharmacodynamic, PK/PD) παραμέτρους, ενώ αποτελούν δείκτη με κυρίως κλινική αξία που μπορεί να μεταβληθούν σύμφωνα με τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα. Η χρησιμότητά τους έγκειται στο να ταξινομηθούν τα απομονωθέντα στελέχη σε 3 βασικές κατηγορίες [ευαίσθητα (susceptible, S), ευαίσθητα σε αυξημένη έκθεση (intermediate, I) και R], με σκοπό να καθοδηγήσουν τον κλινικό γιατρό στη χορήγηση του καταλληλότερου θεραπευτικού σχήματος. Συγκεκριμένα, ένα στέλεχος κατηγοριοποιείται ως S όταν υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας χρησιμοποιώντας το τυπικό δοσολογικό σχήμα του αντιμυκητικού, ως I όταν δύναται να υπάρχει θεραπευτικό αποτέλεσμα με υψηλές δόσεις του αντιμυκητικού παράγοντα ύστερα από προσαρμογή του δοσολογικού σχήματος ή με υψηλές συγκεντρώσεις του στο σημείο της λοίμωξης λόγω PK, και ως R όταν η χορήγηση του αντιμυκητικού ακολουθείται από πολύ μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας της θεραπείας, ακόμη κι όταν υπάρχει αυξημένη έκθεση σε αυτόν [85].

Από την άλλη πλευρά, ως ECV/ECOFF ορίζεται η μέγιστη τιμή MIC ενός αντιμυκητικού, η οποία διαχωρίζει τον άγριου τύπου (wild type, WT) φαινότυπο, δηλαδή το φυσικό πληθυσμό που δε φέρει επίκτητο ή δευτερογενή μηχανισμό αντοχής, από το non-WT φαινότυπο. Αποτελεί δείκτη με βιολογική και επιδημιολογική αξία, ενώ ο

προσδιορισμός του στηρίζεται στην ανάλυση ευρειών κατανομών MICs, οι οποίες περιλαμβάνουν δεδομένα από όλο τον κόσμο. Ωστόσο, δεν αποτελεί προγνωστικό δείκτη κλινικής επιτυχίας, διείσδυσης στην εστία της λοίμωξης ή ανεκτικότητας ή τοξικότητας στον ασθενή, αλλά μπορεί να παρέχει καθοδήγηση για τη θεραπεία απουσία CBPs [85].

Επί του παρόντος, δεν έχουν καθιερωθεί όρια ευαισθησίας ειδικά για την *C. auris*. Εντούτοις, τα CDC έχουν ορίσει δοκιμαστικά (tentative) όρια αντοχής για ορισμένα αντιμυκητικά φάρμακα έναντι της *C. auris*, που προσδιορίστηκαν με βάση τα αντίστοιχα όρια για στενά συγγενικά *Candida spp.* καθώς και γνώμες εμπειρογνομόνων. Δεδομένου ότι μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστή η συσχέτιση μεταξύ των δοκιμαστικών μικροβιολογικών ορίων και του κλινικού αποτελέσματος, τα προαναφερθέντα θα πρέπει να θεωρηθούν ως γενικός οδηγός, ενώ δε θα πρέπει να αποκλειστεί η χρήση ενός αντιμυκητικού με αυξημένη τιμή MIC σε περιπτώσεις λοιμώξεων από *C. auris* για τις οποίες η προηγούμενη χορήγηση άλλων αντιμυκητικών παραγόντων ήταν αναποτελεσματική [86].

Πίνακας 1. Δοκιμαστικά όρια αντοχής της *C. auris* στις τριαζόλες, στην AMB και στις εχινοκανδίνες, όπως ορίστηκαν από τα CDC [86].

Φάρμακα (δοκιμαστικά όρια αντοχής)	Σχόλια
FLC (≥ 32 mg/L)	Στελέχη με MIC ≥ 32 mg/L αποδείχθηκε ότι φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>ERG11</i> , καθιστώντας τα απίθανο να ανταποκριθούν στη θεραπεία με FLC
VRC και άλλες τριαζόλες δεύτερης γενιάς	Εξετάστε το ενδεχόμενο να χρησιμοποιηθεί η αντοχή στη FLC ως υποκατάστατο για την αξιολόγηση της αντοχής στις τριαζόλες δεύτερης γενιάς. Ωστόσο, FLC-R στελέχη μπορεί να ανταποκριθούν σε άλλες τριαζόλες περιστασιακά. Η απόφαση για θεραπεία με άλλη τριαζόλη θα πρέπει να λαμβάνεται κατά περίπτωση
AMB (≥ 2 mg/L)	Μια πρόσφατη PK/PD μελέτη της AMB έναντι της <i>C. auris</i> σε μοντέλο ποντικού υπέδειξε ότι υπό τυπική δοσολογία, το όριο ευαισθησίας για την AMB πρέπει να είναι 1 ή 1,5, παρόμοιο με αυτό που έχει προσδιοριστεί για άλλα <i>Candida</i> spp. Επομένως, στελέχη με MIC ≥ 2 mg/L θα πρέπει να θεωρούνται
Ανιντουλαφουγκίνη (anidulafugin, AFG) (≥ 4 mg/L)	Τα δοκιμαστικά όρια αντοχής βασίζονται στην κατανομή των MICs ~ 100 στελεχών διαφορετικού γεωγραφικού εντοπισμού
CAS (≥ 2 mg/L)	
MFG (≥ 4 mg/L)	

Επιπλέον, οι Arendrup et al. προσδιόρισαν δοκιμαστικά ECVs αντοχής του ινστιτούτου κλινικών και εργαστηριακών προτύπων (clinical and laboratory standards institute, CLSI) και ECOFFs αντοχής της ευρωπαϊκής επιτροπής για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά (european committee of antimicrobial susceptibility testing, EUCAST) για 8 αντιμυκητικούς παράγοντες (AMB, FLC, VRC, ιτρακοναζόλη (itraconazole, ITC), ποσακοναζόλη (posaconazole, POS), ισαβουκοναζόλη (isavuconazole, ISA), AFG και MFG) έναντι της *C. auris* [87]. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί πως για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά στελέχη ινδικής προέλευσης (κλάδου I), με αποτέλεσμα να μη δύναται να γενικευτεί με ασφάλεια η χρήση τους, δεδομένου του κλαδο-εξαρτώμενου προφίλ ευαισθησίας που εμφανίζει η *C. auris* [24], [75]. Συνεπώς, για τον επίσημο καθορισμό των ECVs/ECOFFs απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ελέγχοντας στελέχη ποικίλης γεωγραφικής κατανομής με στόχο τη συμπερίληψη διαφορετικών κλάδων, ενώ ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην αποφυγή

υπερεκπροσώπησης κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών.

Drug and AFST method	Modal MIC (mg/liter)	Statistical ECOFF at indicated endpoint ^a						dECOFF via derivatization method	ECOFF via visual eyeball method ^b
		95%		97.5%		99%			
		ECOFF Finder	MicDat1.23 software	ECOFF Finder	MicDat1.23 software	ECOFF Finder	MicDat1.23 software		
FLC									
CLSI	64	NA	64	NA	64	NA	64	128	ND
EUCAST	64	NA	64	NA	64	NA	64	128	ND
ITC									
CLSI	0.125	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0.25	0.5
EUCAST	0.125	1	1	1	1	2	2	1	0.5
VRC									
CLSI	0.5	8	8	16	16	32	16	1	ND
EUCAST	1	4	4	4	4	8	8	2	ND
ISA									
CLSI	0.25	1	1	2	1	2	2	0.5	ND
EUCAST	0.5	0.125	2	0.25	4	0.25	4	1	1
POS									
CLSI	0.016	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	0.125	ND
EUCAST	0.032/0.64	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125	0.25
AMB									
CLSI	0.5	1	2	2	2	2	2	2	2
EUCAST	1	NA	1	NA	1	NA	1	2	1
AFG									
CLSI	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	1	0.25	0.5
EUCAST	0.06	0.25	1	0.25	1	0.5	2	0.25	1
MFG									
CLSI	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5
EUCAST	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5

Εικόνα 27. Προτεινόμενα CLSI/EUCAST δοκιμαστικά ECVs/ECOFFs αντοχής για 8 αντιμυκητικούς παράγοντες έναντι της *C. auris* [87].

2.2.1 Πρότυπη μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζυμό

Η μέθοδος BMD αποτελεί το χρυσό πρότυπο για τον AFST, ωστόσο απαιτεί την επίπονη in house παρασκευή πλακών μικροαραιώσεων, οι οποίες τείνουν να έχουν σύντομη διάρκεια ζωής (έως 6 μήνες κατόπιν φύλαξης στους -70°C) και απαιτούν εκτεταμένο ποιοτικό έλεγχο [88], [89], καθιστώντας απρόσιτη την εφαρμογή της για τα περισσότερα εργαστήρια ρουτίνας. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της in vitro δραστηρότητας νέων αντιμυκητικών παραγόντων και την επιβεβαίωση διαφορούμενων αποτελεσμάτων που προκύπτουν κατά την εφαρμογή εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών AFST, ιδίως αυτών που δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί για συγκεκριμένο συνδυασμό αντιμυκητικού-*Candida* spp. [90].

Για τη διεξαγωγή της ακολουθούνται οι κατευθυντήριες οδηγίες είτε του CLSI είτε της EUCAST. Συγκεκριμένα, ο AFST έναντι *Candida* spp. πραγματοποιείται σύμφωνα με

τα επικαιροποιημένα πρότυπα CLSI M27-A4 [89] ή EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 [88]. Παρά την εναρμόνιση των CLSI και EUCAST μεθοδολογιών, παραμένουν ορισμένες βασικές τεχνικές διαφορές μεταξύ τους, υπογραμμίζοντας τη σημασία της εφαρμογής ειδικών για την εκάστοτε μέθοδο ερμηνευτικών κριτηρίων και της επαρκούς εκπαίδευσης του προσωπικού. Οι διαφορές αυτές έγκεινται στο σχήμα του πυθμένα των βοθρίων της πλάκας μικροαραιώσεων, στη σύσταση του θρεπτικού υλικού, στην τελική περιεκτικότητα των διαλυμάτων των αντιμυκητικών παραγόντων σε διαλύτη, στην τελική συγκέντρωση του μυκητικού εναιωρήματος, στη μέθοδο προσδιορισμού των MICs, στο χρόνο επώασης της πλάκας μικροαραιώσεων, καθώς και στον ορισμό του τελικού σημείου (% αναστολή της ανάπτυξης) για την AMB.

Πίνακας 2. Τεχνικές διαφορές μεταξύ των CLSI και EUCAST μεθοδολογιών BMD για τον AFST έναντι *Candida* spp. [88], [89].

Χαρακτηριστικά	CLSI M27-A4	EUCAST E.Def 7.4
Πυθμένας βοθρίου πλάκας μικροαραιώσεων	Κοίλος	Επίπεδος
Περιεκτικότητα θρεπτικού υλικού σε γλυκόζη	0,2%	2%
Τελική περιεκτικότητα διαλυμάτων αντιμυκητικών παραγόντων σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO)	1%	0,5%
Τελική συγκέντρωση μυκητικού εναιωρήματος (CFU/mL)	0,5-2,5 x 10 ³	0,5-2,5 x 10 ⁵
Μέθοδος προσδιορισμού των MICs	Οπτική παρατήρηση	Φωτομέτρηση
Χρόνος επώασης πλάκας μικροαραιώσεων	24 ώρες	Τιμή απορρόφησης ≤0,2 του θετικού μάρτυρα ελέγχου της ανάπτυξης (growth control, GC) μετά από 24 ώρες συνιστά επανεπώαση για επιπλέον 12-24 ώρες
Τελικό σημείο (% αναστολή της ανάπτυξης) για την AMB	100%	≥90%

Παρά τις διακριτές τεχνικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των CLSI και EUCAST μεθοδολογιών, ακολουθείται ένας κοινός βασικός άξονας διενέργειάς τους. Αυτό εγείρει το ενδιαφέρον για τη μεταξύ τους σύγκριση, προκειμένου να προσδιοριστούν

οι κατανομές MICs για τον εκάστοτε συνδυασμό αντιμυκητικού-*Candida* spp. και τα ποσοστά αντοχής που αποδίδει η κάθε μια, με απώτερο στόχο την κατάρτιση ειδικών για την κάθε μέθοδο ορίων αντοχής. Επί του παρόντος, τα διαθέσιμα δεδομένα αναφορικά με την *C. auris* είναι περιορισμένα καθώς προκύπτουν από μόλις 3 συγκριτικές μελέτες [87], [91], [92]. Αξίζει να σημειωθεί πως και στις τρεις έχει εξεταστεί περιορισμένος αριθμός στελεχών συγκεκριμένης γεωγραφικής προέλευσης, και κατ' επέκταση κλάδου, οδηγώντας στην εξαγωγή ορισμένων αντικρουόμενων συμπερασμάτων. Ενδεικτικά, το ποσοστό αντοχής κυμαινόταν μεταξύ 0% (στελέχη κλάδου II) και 22,5% (στελέχη κλάδου IV) για την AMB [91], [92], και μεταξύ 0% (στελέχη κλάδου IV) και 6,5% (στελέχη κλάδου I) για τις εχινοκανδίνες [87], [92]. Επιπλέον, τόσο τα ποσοστά βασικής συμφωνίας (essential agreement, EA) εντός ± 2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων όσο και τα ποσοστά κατηγορικής συμφωνίας (categorical agreement, CA) μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν φαρμακοεξαρτώμενα και παρουσίασαν διακυμάνσεις [87], [91], [92]. Αυτές οι ερμηνευτικές διαφορές πιθανώς να εξαλείφονταν εάν εφαρμόζονταν ειδικά για την εκάστοτε μέθοδο όρια αντοχής [93], [94].

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ των μεθοδολογιών CLSI και EUCAST BMD για τον AFST έναντι της *C. auris*.

Αριθμός στελεχών (χώρα προέλευσης/κλάδος ^a)	Αντιμυκητικό	Μέθοδος AFST	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ ^b (mg/L)	% αντοχή ^γ	% EA (±2 αραιώσεις)	% CA (% σφάλμα)	Αναφορά
123 Ινδία/I	AMB	EUCAST	1 (0,25-1)	1/1	0	97	90,2	[87]
		CLSI	0,5 (0,125-8)	0,5/2	9,8		(9,8 VmE)	
	AFG	EUCAST	0,06 (0,002-2)	0,12/1	6,5	75	99,2	
		CLSI	0,125 (0,016-8)	0,12/0,5	5,7		(0,8 MaE)	
	MFG	EUCAST	0,125 (0,002-4)	0,12/0,25	6,5	85	99,2	
		CLSI	0,125 (0,016-8)	0,12/0,25	5,7		(0,8 MaE)	
	ITC	EUCAST	0,125 (≤0,008-1)	0,125/0,5	-	94	-	
		CLSI	0,125 (0,03-2)	0,125/0,25	-			
	POS	EUCAST	0,03/0,06 (≤0,008-0,5)	0,03/0,125	-	83	-	
		CLSI	0,016 (0,016-8)	0,016/0,125	-			
	VRC	EUCAST	1 (≤0,008-4)	0,5/2	-	86	-	
		CLSI	2 (0,03-16)	0,5/4	-			
	FLC	EUCAST	≥64 (0,5-≥64)	≥64/≥64	96	91	90,2	
		CLSI	≥64 (4-≥64)	≥64/≥64	86,2		(9,8 MaE)	
	ISA	EUCAST	0,5 (≤0,008-2)	0,125/0,5	-	76	-	
		CLSI	0,25 (0,016-4)	0,125/0,5	-			
20 Νότια Κορέα/II	AMB	EUCAST	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0	100	100	[91]
		CLSI	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0			
31 Κολομβία/IV	AMB	EUCAST	1 (0,5-2)	1/2	22,5	ΔA	77,5	[92]
		CLSI	1 (0,5-1)	1/1	0		(22,5 MaE)	
	AFG	EUCAST	0,03 (0,016-2)	0,06/0,125	0	ΔA	100	
		CLSI	0,125 (0,03-0,5)	0,125/0,25	0			

MFG	EUCAST	0,06 (0,016-2)	0,06/0,125	0	ΔA	100
	CLSI	0,03/0,06 (0,03-1)	0,06/0,25	0		
CAS	EUCAST	0,06 (0,016-1)	0,06/0,25	0	ΔA	100
	CLSI	0,125 (0,03-1)	0,125/1	0		
ITC	EUCAST	0,5 (0,03-0,5)	0,25/0,5	-	ΔA	-
	CLSI	0,5 (0,03-2)	0,25/0,5	-		
POS	EUCAST	0,06 (0,016-0,5)	0,125/0,5	-	ΔA	-
	CLSI	0,5 (0,03-1)	0,5/0,5	-		
VRC	EUCAST	0,5 (0,06-4)	0,5/1	-	ΔA	-
	CLSI	1 (0,125-4)	1/2	-		
FLC	EUCAST	>64 (8->64)	64/>64	80,6	ΔA	87,1 (12,9 MaE)
	CLSI	64 (16-64)	64/64	93,5		

^aΟ κλάδος δεν εξακριβώθηκε με γονοτύπηση των στελεχών, αλλά πιθανολογείται βάση της γεωγραφικής προέλευσής τους.

^βMIC₅₀ και MIC₉₀: οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα.

^γΗ αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (όπου ήταν διαθέσιμα) [86].

ΔA: δεν αναφέρεται, MaE: major error (σημαντικό λάθος), VmE: very major error (πολύ σημαντικό λάθος)

2.2.2 Εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι

Τη δυσχέρεια της εφαρμογής της πρότυπης μεθοδολογίας BMD στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη, έρχονται να καλύψουν οι εμπορικά διαθέσιμες χειροκίνητες ή αυτοματοποιημένες μέθοδοι για AFST έναντι *Candida spp.* Οι χειροκίνητες δοκιμασίες αφορούν στη χρήση του Sensititre YeastOne (SYO, Thermo Fisher Scientific) και των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού, όπως οι Etest (bioMérieux) και οι MIC test strips (MTS, Liofilchem), ενώ στις αυτοματοποιημένες συγκαταλέγεται ο AFST με το σύστημα Vitek 2 (bioMérieux). Πλεονέκτημα των αυτοματοποιημένων μεθόδων έναντι των χειροκίνητων αποτελεί η ελαχιστοποίηση της πιθανής μεροληψίας του χειροκίνητου προσδιορισμού των MICs, καθώς δεν υπάρχει η δυνατότητα παρέμβασης του χειριστή. Ωστόσο, οι εμπορικές δοκιμασίες δεν αντικατοπτρίζουν πάντα ακριβώς τη μεθοδολογία αναφοράς, καταλήγοντας σε λανθασμένες ταξινομήσεις, όταν εφαρμόζονται τα όρια ευαισθησίας των πρότυπων μεθοδολογιών. Ιδανικά, αντοχή που προκύπτει από μία εμπορική μέθοδο AFST θα πρέπει πάντα να επαληθεύεται με μία δεύτερη, κατά προτίμηση πρότυπη, ώστε να αποφευχθεί η επιλογή μη ενδεδειγμένης θεραπείας [90].

Σε γενικές γραμμές, η απόδοση των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων AFST έναντι της *C. auris* δεν έχει αξιολογηθεί μέχρι στιγμής επαρκώς και η αξιοπιστία τους εμφανίζεται αμφιλεγόμενη στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, τα συμπεράσματα που έχουν προκύψει για την εκάστοτε δοκιμασία είναι πολλές φορές αντιφατικά μεταξύ τους, καθώς στηρίζονται στον έλεγχο περιορισμένου αριθμού στελεχών συγκεκριμένης κάθε φορά γεωγραφικής προέλευσης. Ως εκ τούτου, είναι αδύνατη η ασφαλής εξαγωγή συμπερασμάτων για τη γενική εικόνα του κλαδο-εξαρτώμενου προφίλ ευαισθησίας της *C. auris*, ενώ συγχρόνως καθίσταται δύσκολος ο προσδιορισμός αντιπροσωπευτικών για τον εκάστοτε συνδυασμό μεθόδου-αντιμυκητικού ορίων αντοχής [10], [91], [92], [95].

- **SYO**

Το SYO είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία BMD που παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα MIC για ζυμομύκητες, συμπεριλαμβανομένων των *Candida spp.* Κάθε πλάκα μικροαραιώσεων 96-βοθρίων περιέχει σε λυοφιλιωμένη μορφή 9 αντιμυκητικά (AMB, AFG, MFG, CAS, φλουκυτοσίνη (flucytosine, 5FC), FLC, VRC, POS και ITC) σε συγκεκριμένο εύρος διαδοχικών διπλών αραιώσεων σε συνδυασμό με το δείκτη Alamar Blue, το χρώμα του οποίου αλλάζει από μπλε σε ροζ λόγω οξειδωσης κατά την ανάπτυξη

του προς εξέταση στελέχους [96]. Η ευκολία στη χρήση και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων του σε σύγκραση με τα υψηλά ποσοστά συμφωνίας με τη μεθοδολογία CLSI BMD, έχουν αναγάγει το SYO σε ένα πολύτιμο εργαλείο για τον AFST έναντι ζυμομυκήτων στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη [97]. Ωστόσο, η εφαρμογή του έχει βελτιστοποιηθεί μόνο για κοινά *Candida* spp., και ως εκ τούτου η χρήση του για τον έλεγχο σπάνιων ή νεοαναδυόμενων ειδών μπορεί να θεωρηθεί ως πρόκληση, εξαιτίας των μοναδικών χαρακτηριστικών της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του κάθε είδους.

Μέχρι στιγμής, δεν έχουν πραγματοποιηθεί επαρκείς συστηματικές αξιολογήσεις της απόδοσης του SYO για τον AFST έναντι της *C. auris*. Συγκεκριμένα, οι Ruiz-Gaitán et al. συνέκριναν τα αποτελέσματα της *in vitro* ευαισθησίας 56 κλινικών στελεχών, που ελήφθησαν με τις μεθοδολογίες EUCAST BMD και SYO. Τόσο η EA εντός ± 2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων, όσο και η CA μεταξύ των δύο μεθόδων, βρέθηκαν άριστες (>93,9% και >98,2%, αντίστοιχα). Εντούτοις, πρέπει να αναφερθεί ότι όλα τα υπό έλεγχο στελέχη ήταν κλωνικά συνδεδεμένα και πιθανώς ανήκαν αποκλειστικά στον κλάδο III [95]. Από την άλλη πλευρά, οι Siorpi et al. διερεύνησαν τη συμφωνία μεταξύ των CLSI BMD και SYO AMB MICs εξετάζοντας 65 διακριτά κλινικά στελέχη παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής. Σε αυτή την περίπτωση, η συνολική CA μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν μόλις 11%, παρουσιάζοντας κλαδο-εξαρτώμενο προφίλ (2%, 100%, 25%, 50% και 0% CA για στελέχη κλάδου I, II, III, IV και V, αντίστοιχα) [94].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, δεδομένων των διαφορών στις κατανομές SYO και CLSI MICs, έχουν ήδη προσδιοριστεί ειδικά SYO ECVs/ECOFFs για πολλά *Candida* spp. [98]–[100]. Ακόμη δεν υπάρχουν διαθέσιμα ερμηνευτικά κριτήρια για τις SYO MICs αντιμυκητικών παραγόντων ειδικά για την *C. auris*, με εξαίρεση την περίπτωση της AMB όπου μια χρωματομετρική SYO MIC >8 mg/L υποδεικνύει αντοχή [94].

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας CLSI/EUCAST BMD και της εμπορικά διαθέσιμης μεθόδου SYO για τον AFST έναντι της *C. auris*.

Αριθμός στελεχών (χώρα προέλευσης/κλάδος)	Αντιμυκητικό	Μέθοδος AFST	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ ^β (mg/L)	% αντοχή ^γ	% ΕΑ εντός (±2 αραιώσεις)	% CA (% σφάλμα)	Αναφορά
56 Ισπανία/III ^α	AMB	EUCAST	ΔΑ (0,06-0,25)	0,125/0,25	0	93,9	100	[95]
		SYO	ΔΑ (0,25-1)	0,5/0,5	0			
	AFG	EUCAST	ΔΑ (0,016-0,5)	0,03/0,06	3,6	98	98,2	
		SYO	ΔΑ (0,06-0,5)	0,125/0,25	1,8		(1,8 MaE)	
	MFG	EUCAST	ΔΑ (0,03-0,125)	0,06/0,06	0	98	98,2	
		SYO	ΔΑ (0,03-0,5)	0,06/0,06	1,8		(1,8 MaE)	
	ITC	EUCAST	ΔΑ (0,06-0,5)	0,125/0,25	0	95,9	100	
		SYO	ΔΑ (0,06-0,5)	0,125/0,5	0			
	POS	EUCAST	ΔΑ (0,03-0,125)	0,06/0,125	0	98	100	
		SYO	ΔΑ (0,016-0,25)	0,06/0,125	0			
	VRC	EUCAST	ΔΑ (0,5->8)	2/4	17,8	95,9	100	
		SYO	ΔΑ (0,5->8)	2/4	17,8			
	FLC	EUCAST	ΔΑ (>64->64)	>64/>64	100	ΔΑ	100	
		SYO	ΔΑ (>256->256)	>256/>256	100			
65 Παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής/I-V	AMB	CLSI	1 (0,25-1)	1/1	0	88	11	[94]
		SYO	2 (1-8)	2/4	89		(89 MaE)	

^αΟ κλάδος δεν εξακριβώθηκε με γονοτύπηση των στελεχών, αλλά πιθανολογείται βάση της γεωγραφικής προέλευσής τους.

^βMIC₅₀ και MIC₉₀: οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα.

^γΗ αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για AMB, FLC και εχινοκανδίνες [86], και σύμφωνα με τα δοκιμαστικά επιδημιολογικά όρια για τα υπόλοιπα αντιμυκητικά [87].

- **Ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού**

Η μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού αποτελεί ένα συνδυασμό της έννοιας των αραιώσεων και των αρχών διάχυσης για τον AFST. Όπως και στη BMD, έτσι και σε αυτή την περίπτωση, η ευαισθησία στα αντιμυκητικά ποσοτικοποιείται άμεσα με τον προσδιορισμό των τιμών MIC [101]. Οι ταινίες Etest και MTS είναι κατασκευασμένες από πλαστικό και από ειδικό χαρτί υψηλής ποιότητας, αντίστοιχα, εμποτισμένο με προκαθορισμένη διαβάθμιση συγκεντρώσεων αντιμυκητικών [102], [103]. Όταν αυτές τοποθετηθούν στην επιφάνεια ενός ενοφθαλμισμένου με μυκητικό εναιώρημα τρυβλίου, η προσχηματισμένη εκθετική βαθμίδωση του αντιμυκητικού παράγοντα που υπάρχει στη ταινία, μεταφέρεται και διαχέεται από την κάτω επιφάνεια της ταινίας στην επιφάνεια του ενοφθαλμίσματος. Μετά την επώαση του τρυβλίου, εμφανίζεται μία συμμετρική έλλειψη αναστολής και η τιμή MIC προσδιορίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η χρήση τους προσφέρει ευελιξία μιας και μπορούν να ελεγχθούν έως και 6 ταινίες ανά τρυβλίο (150 mm), ενώ διατίθενται ταινίες για τα περισσότερα εγκεκριμένα αντιμυκητικά.

Η μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης με Etest/MTS είναι συγκρίσιμη με την πρότυπη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD για τα συνήθη *Candida* spp., ενώ φαίνεται να παρουσιάζει πλεονέκτημα σε σχέση με αυτή όσον αφορά τον εντοπισμό AMB-R στελεχών. Παρόλο που είναι εξαιρετικά εύχρηστη, απαιτεί εμπειρία για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, επειδή το σημείο ανάγνωσης της σχηματιζόμενης έλλειψης (% αναστολή της ανάπτυξης) διαφέρει μεταξύ των εκάστοτε κατηγοριών αντιμυκητικών [101].

Μέχρι στιγμής, τα διαθέσιμα δεδομένα αναφορικά με την απόδοση της μεθόδου για τον AFST της *C. auris* είναι περιορισμένα, καθώς προκύπτουν από μόλις 4 συγκριτικές μελέτες, που περιλαμβάνουν στελέχη συγκεκριμένου γεωγραφικού εντοπισμού και καταλήγουν σε κλαδο- και φαρμακο-εξαρτώμενα συμπεράσματα. Ενδεικτικά, η CA της με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD κυμαινόταν μεταξύ 85,7-87,2% (στελέχη κλάδων I, III και IV) και 100% (στελέχη κλάδου II) για την AMB, και μεταξύ 87,1% (στελέχη κλάδου IV) και 100% (στελέχη κλάδου III) για την FLC, ενώ για τις εχινοκανδίνες παρατηρήθηκε άριστη ($\geq 99\%$) CA μεταξύ των μεθόδων ανεξαρτήτως του κλάδου του υπό έλεγχο στελεχών [10], [91], [92], [95].

Επί του παρόντος, έχουν προταθεί ειδικά για τη μέθοδο ECVs/ECOFFs μόνο για κοινά *Candida* spp. [100], [104], [105], ενώ δεν υπάρχουν αντίστοιχα για την *C. auris*.

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας CLSI/EUCAST BMD και των εμπορικά διαθέσιμων ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού για τον AFST έναντι της *C. auris*.

Αριθμός στελεχών (χώρα προέλευσης/κλάδος ^a)	Αντιμυκητικό	Μέθοδος AFST	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ ^b (mg/L)	% αντοχή ^γ	% ΕΑ (±2 αραιώσεις)	% CA (% σφάλμα)	Αναφορά	
90 Ινδία/I	AMB	CLSI	1 (0,125-8)	1/4	15,5	ΔΑ	87 (13 MaE)	[10]	
		Etest	0,5 (0,03-2)	0,5/1	1,1				
	CAS	CLSI	0,25 (0,125-8)	0,5/1	8,8	ΔΑ	99 (1 MaE)		
		Etest	0,25 (<0,03-4)	0,25/2	7,7				
	VRC	CLSI	0,5 (0,03->16)	1/8	-	ΔΑ	-		
		Etest	1 (<0,03->16)	1/16	-				
31 Κολομβία/IV	AMB	CLSI	1 (0,5-1)	1/1	0	ΔΑ	87,2 (9,7 MaE) 90,3 (12,8 MaE)	[92]	
		Etest	1 (0,5-2)	1/2	22,5				
	MFG	CLSI	0,03/0,06 (0,03-1)	0,06/0,25	0	ΔΑ	100 100		
		Etest	0,125 (0,03-0,25)	0,06/0,125	0				
	CAS	CLSI	0,125 (0,03-1)	0,125/1	0	ΔΑ	100 100		
		Etest	0,06 (0,016-1)	0,06/0,25	0				
	VRC	CLSI	0,25 (0,06-0,5)	0,25/0,5	0	ΔΑ	-		
		Etest	1 (0,125-4)	1/2	-				
	FLC	EUCAST	CLSI	64 (16-64)	64/64	93,5	ΔΑ		87,1 (12,9 MaE) 87,1 (12,9 MaE)
			Etest	64 (8->64)	64/>64	80,6			
		Etest	CLSI	>64 (16->64)	>64/>64	93,5			
			Etest	>64 (16->64)	>64/>64	93,5			

20 Νότια Κορέα/II	AMB	EUCAST	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0	100	100	[91]
		CLSI	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0	100	100	
		Etest	0,5 (0,25-1)	ΔΑ/ΔΑ	0			
73 Ισπανία/III	AMB	EUCAST	ΔΑ (0,06-0,25)	0,125/0,25	0	38,8	85,7	[95]
		MTS	ΔΑ (0,016-2)	1/2	14,3		(14,3 MaE)	
	AFG	EUCAST	ΔΑ (0,016-0,5)	0,03/0,06	0	83,7	100	
		MTS	ΔΑ (0,008-1)	0,06/0,125	0			
	MFG	EUCAST	ΔΑ (0,03-0,125)	0,06/0,06	0	93,9	100	
		MTS	ΔΑ (0,008-1)	0,03/0,06	0			
	POS	EUCAST	ΔΑ (0,03-0,125)	0,06/0,125	-	73,5	-	
		MTS	ΔΑ (0,016-0,5)	0,25/0,5	-			
	VRC	EUCAST	ΔΑ (0,5->8)	2/4	-	0	-	
		MTS	ΔΑ (8-64)	64/64	-			
	FLC	EUCAST	ΔΑ (>64->64)	>64/>64	100	ΔΑ	100	
		MTS	ΔΑ (256->256)	>256/>256	100			
	ISA	EUCAST	ΔΑ (0,03-2)	0,06/0,125	-	87,8	-	
		MTS	ΔΑ (0,016-1)	0,125/0,5	-			

^aΟ κλάδος δεν εξακριβώθηκε με γονοτύπηση, αλλά πιθανολογείται βάση της γεωγραφικής προέλευσης των στελεχών.

^βMIC₅₀ και MIC₉₀: οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα.

^γΗ αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (όπου ήταν διαθέσιμα) [86].

- **Αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2**

Το σύστημα Vitek 2 αποτελεί μια προσέγγιση για τον αυτοματοποιημένο προσδιορισμό των MICs αντιμυκητικών έναντι κλινικά σημαντικών ζυμομυκήτων. Συγκεκριμένα, λαμβάνει χώρα αυτόματος ενοφθαλμισμός καρτών που περιέχουν 6 αντιμυκητικά (AMB, FLC, VRC, CAS, MFG και 5FC) σε συγκεκριμένο εύρος διαδοχικών τετραπλών αραιώσεων καθώς και φωτομετρικός προσδιορισμός των MICs. Πρόκειται για μια μικρογραφία της μεθοδολογίας BMD και η λειτουργία του βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη θλωσιμετρική παρακολούθηση της ανάπτυξης του υπό έλεγχο στελέχους κατά τη διάρκεια της επώασής του. Μέχρι στιγμής, έχει λάβει έγκριση από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (food and drug administration, FDA) για την εφαρμογή του για τα πιο κοινά *Candida* spp., ενώ η χρήση του είναι ιδανική για μεγάλα διαγνωστικά εργαστήρια, ιδιαίτερα εκείνα που δε διαθέτουν εξειδικευμένο τμήμα Μυκητολογίας. Προηγούμενες αξιολογήσεις έδειξαν υψηλά ποσοστά επαναληψιμότητας και CA (>92%) μεταξύ των CLSI BMD και Vitek 2 για τα συνήθη *Candida* spp. και για τους περισσότερους αντιμυκητικούς παράγοντες [106], [107]. Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα δεν μπορούν να γενικευθούν με ασφάλεια για όλα τα *Candida* spp., λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του εκάστοτε είδους.

Επί του παρόντος, η απόδοση του Vitek 2 για τον AFST έναντι της *C. auris* είναι αμφίβολη, καθώς οι διαθέσιμες συγκριτικές μελέτες με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD βασίζονται στον έλεγχο στελεχών εντοπισμένης γεωγραφικής προέλευσης, ενέχοντας αυξημένο κίνδυνο υπερεκπροσώπησης πιθανώς κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών, και παρουσιάζουν κλαδο-εξαρτώμενα αντιφατικά αποτελέσματα. Ενδεικτικά, το ποσοστό CA μεταξύ των μεθόδων κυμαινόταν από 9,6-32,2% (στελέχη κλάδων I και IV) έως 76-100% (στελέχη κλάδου II) για την AMB, και από 67,8-80,7% (στελέχη κλάδου I και IV) έως 84-93,4% (στελέχη κλάδου II) για την FLC [10], [91], [92], [108]–[110].

Σημειωτέον, τα παραγόμενα με το Vitek 2 αποτελέσματα θα ήταν πιο αξιόπιστα εάν υπήρχαν διαθέσιμα ECVs/ECOFFs ειδικά για το συνδυασμό είτε της ίδιας της μεθόδου είτε του κάθε *Candida* spp. με τον εκάστοτε αντιμυκητικό παράγοντα που εξετάζεται κάθε φορά, ομοίως με αυτό που ήδη συμβαίνει με άλλες εμπορικές δοκιμασίες AFST, όπως το SYO [111]. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν διαθέσιμα ερμηνευτικά κριτήρια για τις παραγόμενες με το Vitek 2 MICs οποιουδήποτε αντιμυκητικού παράγοντα ειδικά για την *C. auris*.

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας CLSI/EUCAST BMD και του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2 για τον AFST έναντι της *C. auris*.

Αριθμός στελεχών (χώρα προέλευσης/κλάδος)	Αντιμυκητικό	Μέθοδος AFST	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ ^B (mg/L)	% αντοχή ^γ	% ΕΑ (±2 αραιώσεις)	% CA (% σφάλμα)	Αναφορά
31 Κολομβία /IV ^α	AMB	CLSI	1 (0,5-1)	1/1	0		9,6 (90,4 MaE)	[92]*
		EUCAST	1 (0,5-2)	1/2	22,5	ΔΑ	32,2 (67,8 MaE)	
	MFG	Vitek 2	8 (0,5->8)	8/>8	90,3			
		CLSI	0,03/0,06 (0,03-1)	0,06/0,25	0		100	
		EUCAST	0,06 (0,015-2)	0,06/0,125	0	ΔΑ	100	
		Vitek 2	0,125 (0,03-0,25)	0,125/0,125	0			
	CAS	CLSI	0,125 (0,03-1)	0,125/0,125	0		100	
		EUCAST	0,06 (0,016-1)	0,06/0,25	0	ΔΑ	100	
	VRC	Vitek 2	0,25 (0,25-0,5)	0,25/0,25	0			
		CLSI	1 (0,125-4)	1/2				
		EUCAST	0,5 (0,06-4)	0,5/1	-	ΔΑ	-	
	FLC	Vitek 2	0,25 (0,06-2)	0,5/2				
		CLSI	64 (16-64)	64/64	93,5			
		EUCAST	64 (8->64)	64/>64	80,6	ΔΑ	67,8 (32,2 VmE)	
Vitek 2		32 (2->64)	64/64	61,3		80,7 (19,3 VmE)		
45 Νότια Κορέα /II ^α	AMB	CLSI	0,5 (0,25-2)	0,5/2	24		76	
		Vitek 2	0,5 (0,25-0,5)	0,5/0,5	0	97,8	(24 VmE)	
	MFG	CLSI	0,06/0,125 (0,03-1)	0,125/0,5	0		100	
		Vitek 2	0,06 (0,06-0,125)	0,06/0,06	0	82,2		
	CAS	CLSI	0,125 (0,03-0,5)	0,125/0,25	0		100	
		Vitek 2	0,25 (0,125-0,25)	0,25/0,25	0	97,8		

20 Ινδία /I ^α	VRC	CLSI	0,06 (≤0,016-2)	0,06/0,5	-	100	-	[108] [#]
		Vitek 2	0,125 (0,125-1)	0,125/0,5	-	-	-	
	FLC	CLSI	16 (2->64)	16/64	38	93,3	84	
		Vitek 2	8 (2-32)	8/32	22		(16 VmE)	
	5FC	CLSI	0,125 (0,06-0,5)	0,125/0,25	-	97,8	-	
		Vitek 2	1 (1-16)	1/1	-		-	
	AMB	CLSI	ΔA (0,5-1)	0,5/1	0	ΔA	15	
		Vitek 2	ΔA	ΔA	85		(85 MaE)	
	MFG	CLSI	0,06 (0,06-0,06)	0,06/0,06	0	ΔA	100	
		Vitek 2	ΔA	ΔA	0		-	
	CAS	CLSI	0,5 (0,5-0,5)	0,5/0,5	0	ΔA	100	
		Vitek 2	ΔA	ΔA	0		-	
VRC	CLSI	ΔA (0,03-1)	0,5/0,5	-	ΔA	-		
	Vitek 2	ΔA	ΔA	-		-		
FLC	CLSI	ΔA (1-64)	64/64	55	ΔA	75		
	Vitek 2	ΔA	ΔA	50		(15 VmE, 10 MaE)		
5FC	CLSI	0,125 (0,125-0,125)	0,125/0,125	-	ΔA	-		
	Vitek 2	ΔA	ΔA	-		-		
90 Ινδία /I ^α	AMB	CLSI	1 (0,125-8)	1/4	15,5	10	15,5	[10] [#]
		Vitek 2	8 (2-16)	8/16	100		(84,5 MaE)	
	CAS	CLSI	0,25 (0,125-8)	0,5/1	8,8	90	98,9	
		Vitek 2	0,5 (0,25-4)	0,5/4	7,7		(1,1 MaE)	
	VRC	CLSI	0,5 (0,03->16)	1/8	-	91	-	
		Vitek 2	0,5 (0,06-8)	1/4	-		-	
20 Νότια Κορέα/II ^α	AMB	EUCAST	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0	100	100	[91] ^s
		CLSI	0,5 (0,25-1)	0,5/1	0	100	100	

61 Νότια Κορέα/II	AMB	Vitek 2	0,25 (0,25-1)	0,5/0,5	0	100		
		CLSI	1 (0,25-1)	ΔΑ	0			
	MFG	Vitek 2	0,25 (0,25-0,5)	ΔΑ	0	100	100	[109] [#]
		CLSI	0,125 (≤0,03-0,25)	ΔΑ	0			
	CAS	Vitek 2	0,06 (0,06-0,125)	ΔΑ	0	100	100	
		CLSI	0,25 (0,06-0,25)	ΔΑ	0			
	VRC	Vitek 2	0,25 (0,25-0,25)	ΔΑ	0	100	100	
		CLSI	0,5 (≤0,03-4)	ΔΑ	-	88,5	-	
	FLC	Vitek 2	0,125 (0,125-0,5)	ΔΑ	-			
		CLSI	≥64 (2-≥64)	ΔΑ	62,3		93,4	
			Vitek 2	≥64 (1-≥64)	ΔΑ	62,3	96,7	(6,6 ΔΑ το είδος)

^αΟ κλάδος δεν εξακριβώθηκε με γονοτύπηση, αλλά πιθανολογείται βάση της γεωγραφικής προέλευσης των στελεχών.

^βMIC₅₀ και MIC₉₀: οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα.

^γΗ αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (όπου ήταν διαθέσιμα) [86].

*Κάρτες Vitek 2 AST YS08.

[#]Κάρτες Vitek 2 AST YS07.

[§]Κάρτες Vitek 2 AST YS01.

Ειδικό μέρος

Σκοπός

Η *Candida auris* θεωρείται αναδυόμενος παθογόνος παράγοντας, ο οποίος προκαλεί επιδημικές εξάρσεις καντινταιμιών παγκοσμίως. Ποικίλες μέθοδοι AFST της *C. auris* έχουν αποδώσει διαφορετικές τιμές MIC. Ως εκ τούτου, εάν η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ακατάλληλα κριτήρια, τα ποσοστά αντοχής μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μεθόδων, εξηγώντας έτσι τη μεγάλη διακύμανση που έχει αναφερθεί. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων AFST, 2 αναφοράς (EUCAST και CLSI) και 3 εμπορικά διαθέσιμων (Sensititre YeastOne, Etest και Vitek 2), χρησιμοποιώντας μοριακά χαρακτηρισμένα κλινικά στελέχη *C. auris* που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους ώστε αφενός να συγκριθούν τα ποσοστά συμφωνίας και οι κατανομές MIC μεταξύ των μεθόδων και αφετέρου να προσδιοριστούν οι WT πληθυσμοί για την εκάστοτε μέθοδο. Τα ευρήματα θα βοηθήσουν τα εργαστήρια Κλινικής Μικροβιολογίας να κατανοήσουν τους πιθανούς περιορισμούς των ευρέως χρησιμοποιούμενων εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών και να ερμηνεύσουν τα εξαγόμενα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας κατάλληλα ερμηνευτικά κριτήρια, αποφεύγοντας την υπερεκτίμηση των ποσοστών αντοχής.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Κλινικά στελέχη

Ελέγχθηκαν συνολικά 100 κλινικά στελέχη *C. auris*. Συγκεκριμένα, 17 από αυτά απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες μεμονωμένων ασθενών που νοσηλεύονταν σε 8 νοσοκομεία τριτοβάθμιας φροντίδας, εντοπισμένα στην περιοχή της Αττικής, από το Νοέμβριο του 2020 έως τον Αύγουστο του 2022. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με MALDI-ToF MS (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία) και ομαδοποιήθηκαν στον κλάδο I (Νότιας Ασίας) με γονοτυπική ανάλυση μικρών διαδοχικών επαναλήψεων (short tandem repeats, STRs) [112], [113]. Επιπροσθέτως, 83 γενετικά διακριτά στελέχη, που ανήκουν και στους 5 κλάδους *C. auris* και έχουν απομονωθεί από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, παραχωρήθηκαν ευγενικά από τον Καθηγητή Jacques F. Meis (Radboudumc-CWZ Center of Expertise for Mycology, Nijmegen, The Netherlands). Ειδικότερα, η συλλογή αποτελούνταν από 47 στελέχη κλάδου I (Βραζιλία, Κουβέιτ, Ιράν, Ινδία, Ομάν και Πακιστάν), 3 στελέχη κλάδου II (Νότια Κορέα και Ιαπωνία), 23 στελέχη κλάδου III (Νότια Αφρική και Ισπανία), 22 στελέχη κλάδου IV (Βενεζουέλα και Κολομβία) και 5 στελέχη κλάδου V (Ιράν) [112]. Μεταξύ των στελεχών, 9 στελέχη κλάδου I έφεραν χαρακτηριστικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* (S639F και ΔF635) [114], [115], οι οποίες προσδίδουν αντοχή στις εχινοκανδίνες.

Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -70°C σε διάλυμα 10% γλυκερόλης (AppliChem, Ντάρμστατ, Γερμανία) μέχρι τη χρήση τους. Πριν τον έλεγχο, ανακαλλιεργήθηκαν 2 φορές σε τρυβλία SDA ελεύθερα αντιβιοτικών (Oxoid, Αθήνα, Ελλάδα) στους 35±2°C για 24 ώρες. Τέλος, τα προτεινόμενα πρότυπα στελέχη *C. krusei* ATCC 6258 και *C. parapsilosis* ATCC 22019 χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη ποιοτικού ελέγχου για όλες τις μεθόδους AFST.

3.2 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με CLSI/EUCAST BMD

Ο AFST με την πρότυπη μεθοδολογία BMD κατά CLSI και κατά EUCAST πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των προτύπων CLSI M27-A4 [89] και EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 [88], αντίστοιχα.

- **Θρεπτικό υλικό**

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιείχε RPMI 1640, με γλουταμίνη και κόκκινο της φαινόλης ως δείκτη pH, χωρίς διττανθρακικό νάτριο (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα) ρυθμισμένο σε pH 7,0 με 3-(N-μορφολινο) προπανοσουλφονικό οξύ (MOPS) (PanReac Applichem, Αθήνα, Ελλάδα) σε τελική συγκέντρωση 0,165 M. Όπως προαναφέρθηκε (**Πίνακας 2**), η περιεκτικότητά του σε γλυκόζη ήταν 0,2% και 2% για τη διενέργεια του AFST κατά CLSI και κατά EUCAST, αντίστοιχα [88], [89]. Σημειωτέον, ο εμπλουτισμός του με γλυκόζη σε τελική συγκέντρωση 2% έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη μυκητική ανάπτυξη διευκολύνοντας τον προσδιορισμό των MICs [116]. Αρχικά, το υλικό παρασκευάστηκε σε διπλάσια ισχύ (2×) δεδομένου ότι θα αραιωθεί 1:1 με το μυκητικό εναιώρημα που προστίθεται στο τελικό στάδιο της δοκιμασίας [88], [89].

Πίνακας 7. Συστατικά και τρόπος παρασκευής 1 L θρεπτικού υλικού RPMI 1640 (2×) για τον AFST με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD [88], [89].

Συστατικό*	Ποσότητα	
	CLSI	EUCAST
Αποσταγμένο νερό	900 mL	900 mL
RPMI 1640	20,8 g	20,8 g
MOPS	69,06 g	69,06 g
Γλυκόζη	-	36 g

* Διαλύστε τα στερεά υλικά σε 900 mL αποσταγμένο νερό. Όταν το διάλυμα διαנגάσει και ενώ βρίσκεται υπό ανάδευση, ρυθμίστε το pH στο 7,0 στους 25°C προσθέτοντας 1 M υδροξείδιο του νατρίου. Προσθέστε επιπλέον νερό σε τελικό όγκο 1 L. Αποστειρώστε με φιλτράρισμα (αποστειρωμένο φίλτρο μιας χρήσης με μέγεθος πόρων 0,22 μm) και αποθηκεύστε στους 4°C για έως και 6 μήνες. Για λόγους ποιοτικού ελέγχου, χρησιμοποιήστε μία ποσότητα του υλικού για έλεγχο στειρότητας, για επανέλεγχο του pH (αποδεκτό εύρος 6,9-7,1) και για έλεγχο ανάπτυξης ενός πρότυπου στελεχούς.

- **Αντιμυκητικά φάρμακα**

Χρησιμοποιήθηκαν καθαρές ουσίες AMB (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα), AFG (Pfizer, Αθήνα, Ελλάδα), MFG (Astellas Pharma, Inc., Τόκιο, Ιαπωνία), CAS (Merck & Co., Inc., Whitehouse, Νιου Τζέρσεϊ, ΗΠΑ), FLC (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα), VRC

(Pfizer Ltd, Κεντ, Η.Β.), ITC (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα), POS (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα), ISA (Basilea Pharmaceutica, Αθήνα, Ελλάδα) και 5FC (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα).

- **Μητρικά (stock) διαλύματα αντιμυκητικών φαρμάκων**

Η ποσότητα καθαρής ουσίας ή διαλύτη που απαιτήθηκε για την παρασκευή πυκνών αρχικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης φαρμάκου υπολογίστηκε σύμφωνα με τους τύπους:

$$\text{Βάρος (g)} = \frac{\text{Όγκος (L)} * \text{Συγκέντρωση} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}{\text{Καθαρότητα} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

$$\text{Όγκος (L)} = \frac{\text{Βάρος (g)} * \text{Καθαρότητα} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)}{\text{Συγκέντρωση} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

Οι κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI και της EUCAST ορίζουν ότι το stock διάλυμα θα πρέπει να έχει συγκέντρωση 100 και τουλάχιστον 200 φορές υψηλότερη, αντίστοιχα, από τη μέγιστη τελική συγκέντρωση του φαρμάκου που θα ελεγχθεί στην πλάκα μικροαραιώσεων. Για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων, ποσότητα του εκάστοτε αντιμυκητικού παράγοντα ζυγίστηκε σε βαθμονομημένο αναλυτικό ζυγό. Στη συνέχεια, οι καθαρές ουσίες διαλύθηκαν στον ενδεδειγμένο διαλύτη, συγκεκριμένα σε στείρο DMSO (Chem-Lab, Αθήνα, Ελλάδα), εκτός της 5FC που για τη διάλυσή της χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Σημειωτέον, στο σημείο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε η ουσία να διαλυθεί πλήρως προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία συσσωματωμάτων της, η οποία έχει συνδεθεί με ψευδώς αυξημένες MICs [88], [89].

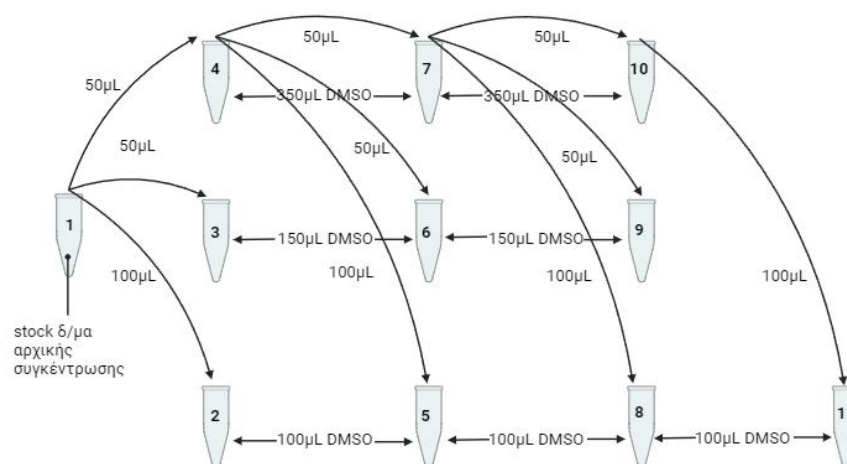
Πίνακας 8. Διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων φαρμάκου, συγκέντρωση του εκάστοτε stock διαλύματος και εύρος των τελικών συγκεντρώσεων αντιμυκητών παραγόντων που εξετάστηκαν με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Διαλύτης	Συγκέντρωση stock διαλύματος (mg/mL)	Εύρος εξεταζόμενων συγκεντρώσεων (mg/L)
AMB	DMSO	3,2	0,06-4 CLSI/EUCAST
AFG	DMSO	3,2	0,008-16 CLSI/EUCAST
MFG	DMSO	1,6	0,008-8 CLSI/EUCAST
CAS	DMSO	1,6	0,03-8 CLSI/EUCAST
FLC	DMSO	12,8	1-64 CLSI/EUCAST
ISA	DMSO	1,6	0,004-4 CLSI/EUCAST
ITC	DMSO	3,2	0,002-2 CLSI 0,008-0,5 EUCAST
POS	DMSO	3,2	0,002-2 CLSI/EUCAST
VRC	DMSO	1,6	0,008-8 CLSI/EUCAST
5FC	Νερό	4	0,016-2 CLSI/EUCAST

Τα stock διαλύματα των φαρμάκων μπορούν να φυλάσσονται σε μικρές ποσότητες (aliquots) στους -70°C για τουλάχιστον 6 μήνες, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος σημαντικής απώλειας της δραστηριότητάς τους, ενώ είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν την ίδια ημέρα που θα ξεπαγώσουν. Η σημαντική εξασθένηση ενός αντιμυκητικού δύναται να αντικατοπτρίζεται στα αποτελέσματα του AFST των στελεχών ποιοτικού ελέγχου [88], [89].

- **Διαλύματα εργασίας αντιμυκητικών φαρμάκων**

Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν ακολουθώντας το πρότυπο ISO. Σύμφωνα με αυτό, πραγματοποιήθηκαν κατά ISO αραιώσεις με σκοπό την παρασκευή διαλυμάτων φαρμάκου με συγκεντρώσεις υψηλότερες (100 και τουλάχιστον 200 για τον AFST κατά CLSI και EUCAST, αντίστοιχα) από εκείνες που θα εξεταστούν τελικά. Έτσι, αρχικά διανεμήθηκαν κατάλληλοι όγκοι διαλύτη σε μικρά σωληνάρια και έπειτα προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αντιμυκητικού παράγοντα, ώστε να δημιουργηθεί μια σειρά αραιώσεων [88], [89].

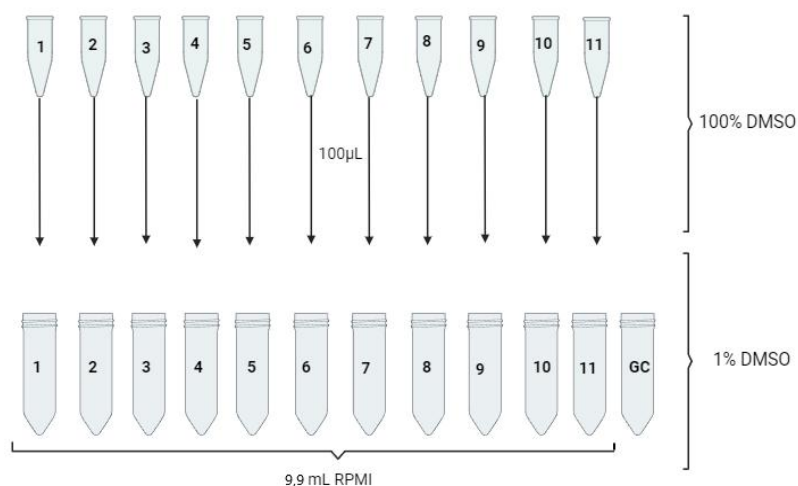


Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των κατά ISO αραιώσεων αντιμυκητικού παράγοντα που διαλύεται σε οργανικό διαλύτη [88], [89].

Πίνακας 9. Κατά ISO αραιώσεις για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, με επιθυμητό εύρος τελικών εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 0,125-64 mg/L, η δραστηριότητα του οποίου θα ελεγχθεί σύμφωνα με την EUCAST BMD [88].

Βήμα	Συγκέντρωση (mg/L)	Πηγή	Όγκος φαρμάκου και διαλύτη (µL)	Ενδιάμεση συγκέντρωση (mg/L)
1	12.800	Stock	200 + 0	12.800
2	12.800	Stock	100 + 100	6.400
3	12.800	Stock	50 + 150	3.200
4	12.800	Stock	50 + 350	1.600
5	1.600	Βήμα 4	100 + 100	800
6	1.600	Βήμα 4	50 + 150	400
7	1.600	Βήμα 4	50 + 350	200
8	200	Βήμα 7	100 + 100	100
9	200	Βήμα 7	50 + 150	50
10	200	Βήμα 7	50 + 350	25

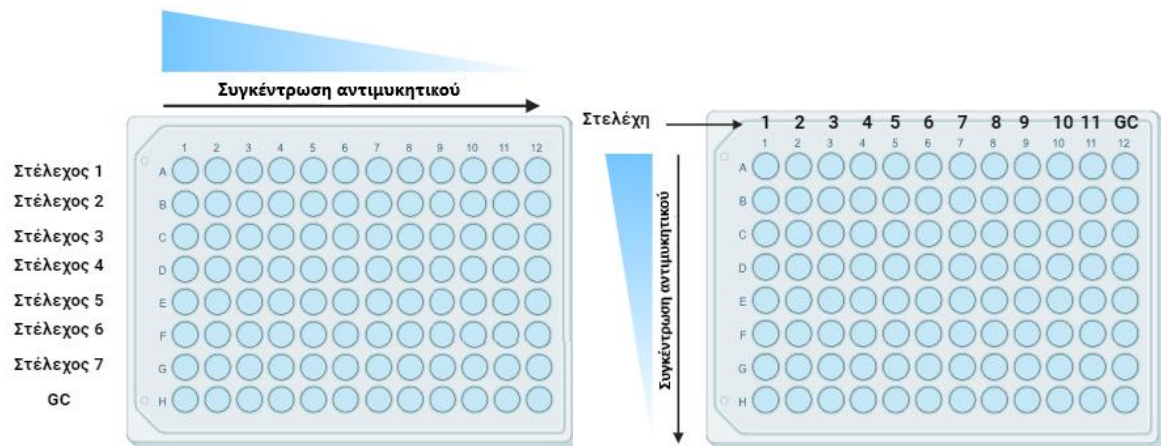
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε 1:50 (AFST κατά CLSI) και 1:100 (AFST κατά EUCAST) αραιώση των διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού σε θρεπτικό υλικό 2×. Έτσι, στο στάδιο αυτό η συγκέντρωση των αντιμυκητικών παραγόντων είναι 2 φορές υψηλότερη της τελικά εξεταζόμενης συγκέντρωσης, ενώ σε περίπτωση χρήσης οργανικού διαλύτη, η συγκέντρωσή του είναι 2% και 1% για AFST κατά CLSI και κατά EUCAST, αντίστοιχα [88], [89].



Εικόνα 29. Σχηματική αναπαράσταση του τελικού σταδίου της παρασκευής διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και η δραστηριότητα του οποίου θα ελεγχθεί σύμφωνα με τη EUCAST BMD [88].

- **Προετοιμασία των πλακών μικροαραιώσεων**

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες πλάκες μικροαραιώσεων 96-βοθρίων, μέγιστης χωρητικότητας βοθρίου ~300 µL, ειδικά επεξεργασμένες για κυτταροκαλλιέργεια (tissue-culture treated), με κοίλο (AFST κατά CLSI) ή επίπεδο (AFST κατά EUCAST) πυθμένα (Thermo Scientific™, Αθήνα, Ελλάδα). Οι πλάκες έφεραν είτε σε οριζόντια, είτε σε κάθετη διάταξη, διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις του κάθε αντιμυκητικού, ξεκινώντας από την υψηλότερη συγκέντρωση (στη στήλη 1 ή στη σειρά A, αντίστοιχα) έως τη χαμηλότερη (στη στήλη 11 ή στη σειρά G, αντίστοιχα). Τα βοθρία της στήλης 12 ή της σειράς H, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν ως GC. Για την πλήρωση των πλακών χρησιμοποιήθηκαν πολυκάναλες πιπέτες ακριβείας, με τις οποίες διανεμήθηκαν 100 µL από την εκάστοτε 2× συγκέντρωση του αντιμυκητικού παράγοντα ή θρεπτικού υλικού χωρίς φάρμακο 2× για το GC.



Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας μικροαραιώσεων όταν οι αραιώσεις των αντιμικητών τοποθετούνται σε οριζόντια (αριστερά) ή κάθετη (δεξιά) διάταξη.

Σε αυτό το στάδιο, οι πλάκες μπορούν να σφραγιστούν σε πλαστικές σακούλες ή αλουμινόχαρτο και να αποθηκευτούν στους $\leq -70^{\circ}\text{C}$ για διάστημα έως και 6 μήνες, ή στους -20°C για όχι περισσότερο από 1 μήνα, χωρίς κίνδυνο απώλειας της δραστηρότητας του φαρμάκου. Μετά την απόψυξή τους, οι πλάκες δεν πρέπει να επανακαταψύχονται, ενώ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται άμεσα, καθώς η παρατεταμένη παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αυξημένες τιμές MIC [88], [89].

- **Προετοιμασία του εναιωρήματος και ενοφθαλισμός των πλακών μικροαραιώσεων**

Η τυποποίηση του εναιωρήματος προάγει την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα του AFST. Για την παρασκευή του, αρχικά ενοφθαλμίστηκαν διακριτές αποικίες του υπό έλεγχο στελέχους σε στείρο αποσταγμένο νερό, ακολούθησε ομογενοποίηση με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 15 δευτερόλεπτα και κατόπιν προσαρμόστηκε η πυκνότητά του ώστε να αντιστοιχεί στην πυκνότητα ενός πρότυπου διαλύματος 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) με τη χρήση θολωσίμετρου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του 1:100 και 1:20 για τον AFST κατά CLSI ή μία αραιώσή του 1:10 για τον AFST κατά EUCAST σε στείρο αποσταγμένο νερό. Εντός 30 λεπτών από την προετοιμασία του εναιωρήματος, προκειμένου να διατηρηθεί σταθερή η βιωσιμότητα των κυττάρων του μύκητα σε αυτό, και αφού αναδεύτηκε επαρκώς, ενοφθαλμίστηκαν 100 μL του σε κάθε βοθρίο μίας πλάκας με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας ακριβείας. Έτσι, στο στάδιο αυτό η συγκέντρωση του αντιμικητικού ήταν η

τελικά εξεταζόμενη και η συγκέντρωση του θεραπευτικού υλικού ήταν $1\times$, ενώ οι συγκεντρώσεις του οργανικού διαλύτη και του εναιωρήματος ήταν οι απαιτούμενες (1% και $0,5-2,5 \times 10^3$ CFU/mL για τον AFST κατά CLSI, $0,5\%$ και $0,5-2,5 \times 10^5$ CFU/mL για τον AFST κατά EUCAST, Πίνακας 2). Οι πλάκες μικροαραιώσεων επωάστηκαν, χωρίς ανάδευση, στους $35\pm 2^\circ\text{C}$ στον ατμοσφαιρικό αέρα για 24 ώρες [88], [89].

- **Προσδιορισμός των τιμών MIC και ερμηνεία τους**

Ο προσδιορισμός των τιμών MIC πραγματοποιείται με οπτική παρατήρηση (AFST κατά CLSI) ή φωτομέτρηση (AFST κατά EUCAST) των πλακών μικροαραιώσεων.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI, το ποσοστό της μυκητικής ανάπτυξης στα βοθρία που περιέχουν φάρμακο συγκριτικά με την ανάπτυξη του GC αξιολογήθηκε μακροσκοπικά παρατηρώντας τον πυθμένα τους με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέπτη. Ειδικότερα, για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκε αριθμητική κλίμακα, όπου η ανάπτυξη βαθμολογήθηκε ως 0 (οπτικά καθαρό βοθρίο), 1 (ελαφρώς θολό βοθρίο), 2 (εμφανής μείωση [$\sim 50\%$] της θολερότητας του βοθρίου), 3 (ελαφρά μείωση της θολερότητας του βοθρίου) ή 4 (καμία μείωση της θολερότητας του βοθρίου). Για τα *Candida spp.*, η AMB MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου στην οποία παρατηρείται πλήρης (100%) αναστολή της ανάπτυξης (σκορ 0), ενώ για τα υπόλοιπα αντιμυκητικά η MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου που προκαλεί $\sim 50\%$ αναστολή της ανάπτυξης (σκορ 2) συγκριτικά με την ανάπτυξη του GC [89]. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, οι CLSI MICs όλων των υπό εξέταση αντιμυκητικών προσδιορίστηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και ενδεχόμενες μεταξύ τους ασυμφωνίες αξιολογήθηκαν από τρίτο παρατηρητή.



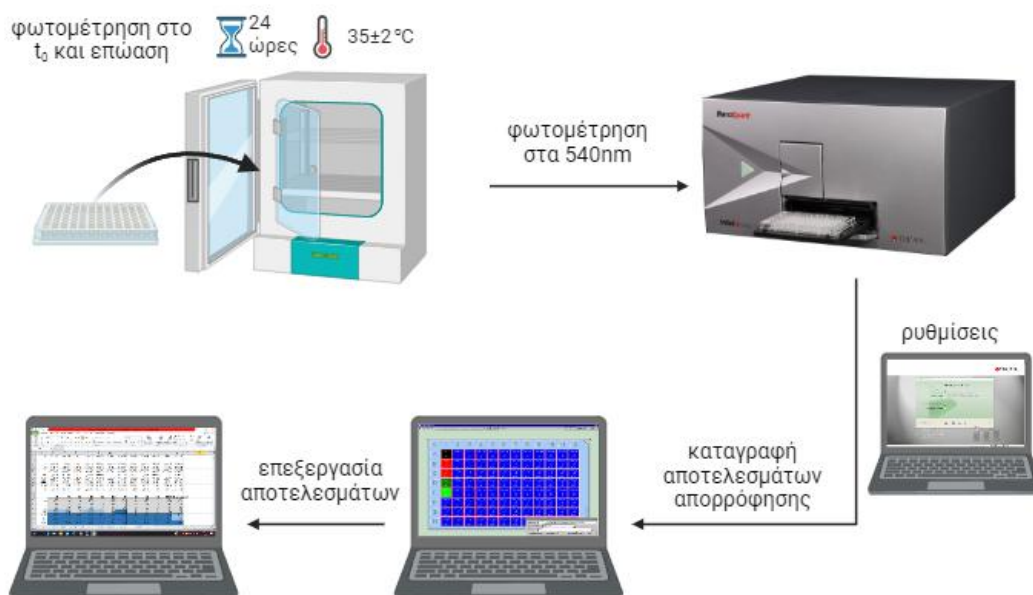
Εικόνα 31. Προσδιορισμός CLSI MICs αντιμυκητικών κατόπιν οπτικής αξιολόγησης της ανάπτυξης στελέχους *C. auris* σε πλάκα μικροαραιώσεων με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέπτη.

Από την άλλη πλευρά, προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος της υποκειμενικότητας που ενέχει ο προσδιορισμός των MICs με οπτική παρατήρηση, οι οδηγίες της EUCAST συστήνουν το φωτομετρικό καθορισμό τους. Το συνιστώμενο μήκος κύματος για τη μέτρηση της απορρόφησης των πλακών είναι τα 530 nm. Τιμή απορρόφησης $\leq 0,2$ του GC μετά από 24 ώρες επώασης συνιστά επανεπώαση της πλάκας για επιπλέον 12-24 ώρες και εκ νέου φωτομέτρησή της μετά το διάστημα αυτό. Για τα *Candida* spp., η AMB MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου που προκαλεί $\geq 90\%$ αναστολή της ανάπτυξης, ενώ για τα υπόλοιπα αντιμυκητικά η MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου που προκαλεί $\geq 50\%$ αναστολή της ανάπτυξης συγκριτικά με την ανάπτυξη του GC. Το ποσοστό της ανάπτυξης του μύκητα στο κάθε βοθρίο που περιέχει αντιμυκητικό υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{Ανάπτυξη} = \frac{A_{\text{βοθρίου}} - A_{\text{υποβάθρου}}}{A_{\text{βοθρίου χωρίς φάρμακο}} - A_{\text{υποβάθρου}}} * 100$$

όπου A: απορρόφηση και υπόβαθρο: βοθρίο που περιέχει το τυφλό δείγμα (100 μL αποσταγμένου νερού αντί 100 μL μυκητικού εναιωρήματος) [88]. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, η φωτομέτρηση των πλακών μικροαραιώσεων πραγματοποιήθηκε στα 540 nm με τη συσκευή Infinite[®] M200 (Tecan, Αθήνα, Ελλάδα), ενώ η αποθήκευση και η

επεξεργασία των δεδομένων που συλλέχθηκαν έγινε με τη βοήθεια του συνοδευτικού πακέτου λογισμικού Magellan PRO.



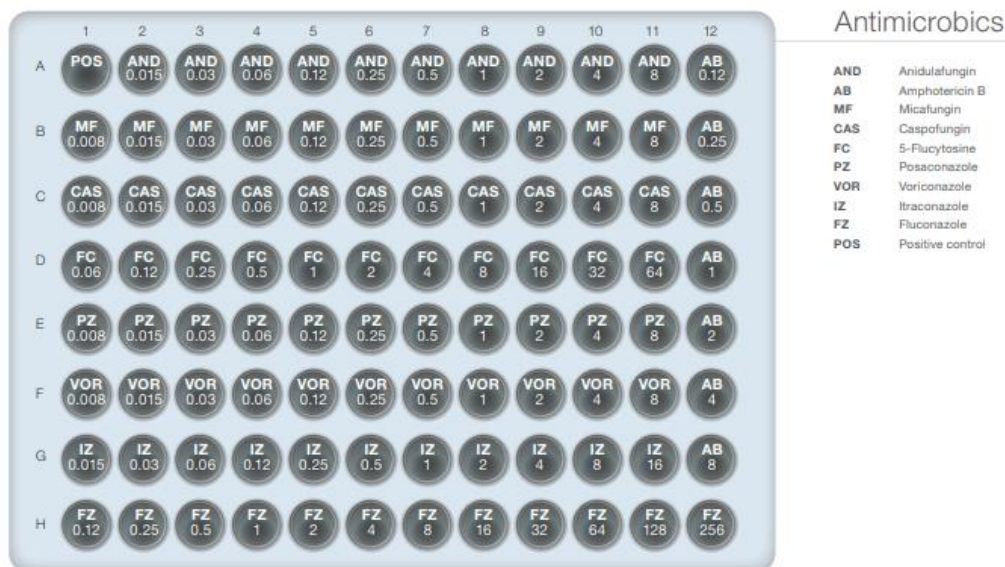
Εικόνα 32. Σχηματική αναπαράσταση του φωτομετρικού προσδιορισμού των EUCAST MICs με τη βοήθεια της συσκευής Infinite® M200 και του συνοδευτικού λογισμικού Magellan PRO.

- **Ποιοτικός έλεγχος των πλακών μικροαραιώσεων**

Προκειμένου τα εξαγόμενα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα, απαιτείται ο έλεγχος των πλακών μικροαραιώσεων χρησιμοποιώντας πρότυπα στελέχη, τα οποία είναι καλά χαρακτηρισμένα, φέρουν σταθερά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και έχουν καθορισμένο προφίλ ευαισθησίας στα αντιμυκητικά. Συγκεκριμένα, συστήνεται η χρήση τουλάχιστον ενός τέτοιου στελέχους ανά δοκιμασία, με την τιμή MIC για το εκάστοτε αντιμυκητικό να πρέπει να βρίσκεται εντός συγκεκριμένου εύρους συγκεντρώσεων που ορίζεται από το CLSI [117] και την EUCAST [118].

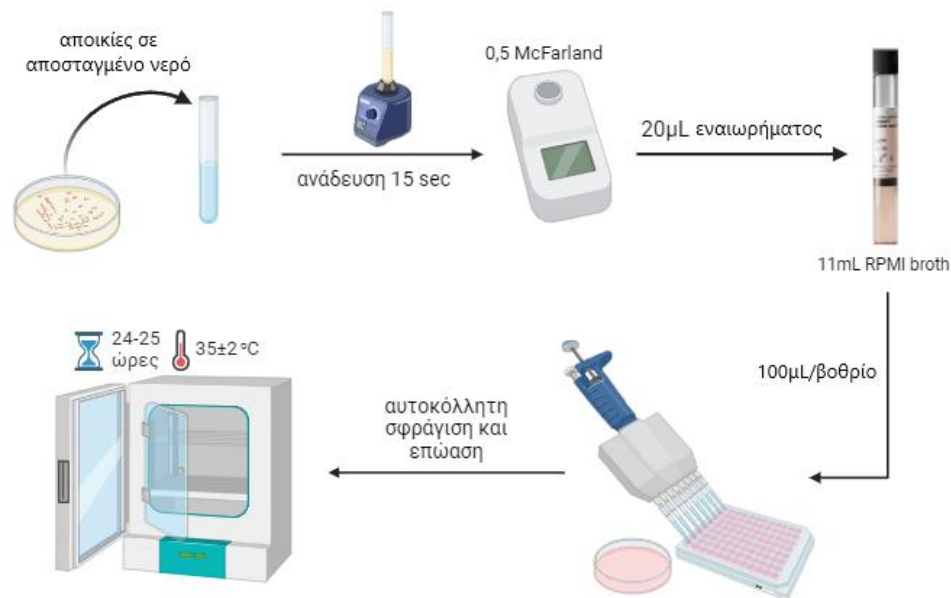
3.3 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με SYO

Ο AFST με τη χρωματομετρική μέθοδο SYO (Κεφάλαιο 2.2.2) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις πλάκες SYO YO10 (Thermo Fisher Scientific, Μασαχουσέτη, ΗΠΑ) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [119].



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας μικροαραιώσεων SYO YO10 [120].

Αρχικά, παρασκευάστηκε το εναιώρημα του εκάστοτε προς έλεγχο στελέχους ενοφθαλμίζοντας διακριτές αποικίες του σε στείρο αποσταγμένο νερό, ακολούθησε ομογενοποίηση με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 15 δευτερόλεπτα και κατόπιν προσαρμόστηκε η πυκνότητά του ώστε να αντιστοιχεί στην πυκνότητα ενός πρότυπου διαλύματος 0,5 McFarland McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) με τη χρήση θολωσίμετρου. Αμέσως μετά, μεταφέρθηκαν 20 μ L του εναιωρήματος σε 11 mL ζωμού ενοφθαλμίσματος YeastOne® (Thermo Fisher Scientific, Μασαχουσέτη, ΗΠΑ), από τα οποία εντός 15 λεπτών ενοφθαλμίστηκαν 100 μ L σε κάθε βοθρίο της πλάκας SYO YO10 με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας ακριβείας. Τέλος, η πλάκα σφραγίστηκε με αυτοκόλλητη ταινία και επώαστηκε στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$ για 24-25 ώρες, σε θάλαμο επώασης χωρίς CO₂. Μετά την 24ωρη επώαση, εξετάζεται το βοθρίο GC (A1) και εάν σε αυτό παρατηρείται ορατή χρωματική μεταβολή σε ροζ, τότε οι SYO MICs είναι δυνατό να προσδιοριστούν. Σε αντίθετη περίπτωση, εάν το χρώμα στο βοθρίο GC είναι ακόμη μπλε ή αμυδρώς μωβ, τότε απαιτείται επανεπώαση της πλάκας για επιπλέον 24 ώρες και εκ νέου αξιολόγησή της μετά το διάστημα αυτό [119].



Εικόνα 34. Σχηματική αναπαράσταση του AFST με τη χρωματομετρική μέθοδο SYO [119].

Ο προσδιορισμός των SYO MICs έλαβε χώρα με οπτική παρατήρηση της πλάκας μικροαραιώσεων με τη βοήθεια ανάστροφου καθρέπτη υπό φως σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, για την AMB καταγράφηκε η χαμηλότερη συγκέντρωσή της που απέτρεπε την εμφάνιση ροζ ή μωβ χρώματος, δηλαδή το πρώτο βοθρίο με μπλε χρώμα, ενώ για τα υπόλοιπα αντιμυκητικά καταγράφηκε το πρώτο βοθρίο με μπλε ή μωβ χρώμα [119].



Εικόνα 35. Προσδιορισμός SYO MICs. (A) Ως SYO AMB MIC καταγράφεται το πρώτο βοθρίο με μπλε χρώμα (1 mg/L). (B) Για τις εχινοκανδίνες, τις αζόλες και την 5FC, ως SYO MIC καταγράφεται το πρώτο βοθρίο με μπλε ή μωβ χρώμα (0,25 mg/L) [119].

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, οι SYO MICs προσδιορίστηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (ενδεχόμενες μεταξύ τους ασυμφωνίες εξετάστηκαν από τρίτο παρατηρητή), ενώ η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον επανέλεγχο 20/100 στελεχών σε διαφορετικές ημέρες. Επιπλέον, ο έλεγχος επαναλήφθηκε εκ νέου για

τα στελέχη που παρουσίασαν ασυμφωνία μεταξύ των CLSI και SYO MICs και τα αποτελέσματα της επανάληψης κρατήθηκαν ως τελικά.

3.4 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με MTS

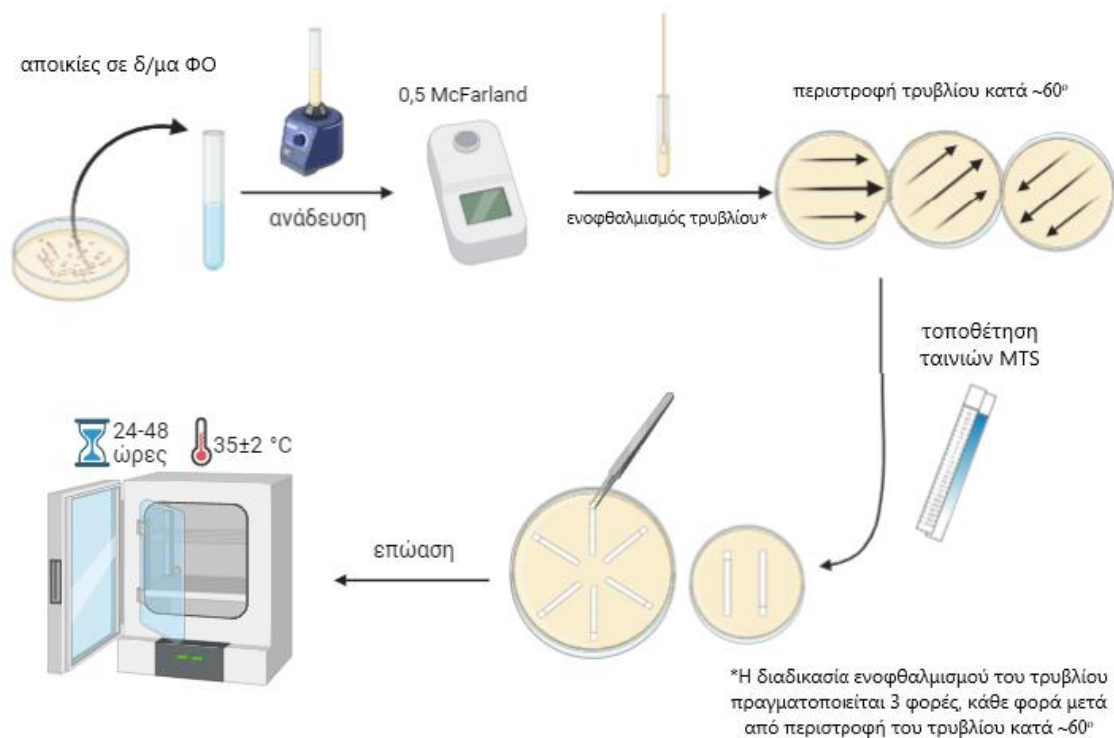
Ο προσδιορισμός των MICs με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού MTS (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Ιταλία) (Κεφάλαιο 2.2.2) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [103].

Πίνακας 10. Αντιμυκητικοί παράγοντες που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη με ταινίες MTS και εύρος των συγκεντρώσεών τους που εμπεριέχονται σε αυτές [103].

Αντιμυκητικός παράγοντας	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/L)
AMB	0,002-32
FLC	0,016-256
POS	0,002-32
VRC	0,002-32
ISA	0,002-32
ITC	0,002-32
5FC	0,002-32
AFG	0,002-32
CAS	0,002-32
MFG	0,002-32

Αρχικά, παρασκευάστηκε το εναιώρημα του εκάστοτε προς εξέταση στελέχους ενοφθαλμίζοντας διακριτές αποικίες του σε διάλυμα στείρου φυσιολογικού ορού, ακολούθησε ομογενοποίηση με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex και κατόπιν προσαρμόστηκε η πυκνότητά του ώστε να αντιστοιχεί στην πυκνότητα ενός πρότυπου διαλύματος 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) με τη χρήση θολωσίμετρου. Στη συνέχεια, το εναιώρημα ενοφθαλμίστηκε ομοιόμορφα με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού σε τρυβλία RPMI άγαρ 150 mm (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Ιταλία). Αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε 2 ακόμη φορές περιστρέφοντας τα τρυβλία κατά $\sim 60^\circ$ κάθε φορά αφού προηγουμένως ο βαμβακοφόρος στυλεός εμβαπτιζόταν εκ νέου στο κάθε εναιώρημα.

Τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο νηματικής ροής. Τέλος, τοποθετήθηκαν προσεκτικά οι ταινίες στα τρυβλία με τη χρήση λαβίδας, που αποστειρωνόταν τακτικά σε φλόγιστρο ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις, και τα τρυβλία επώαστηκαν στους $35\pm 2^\circ\text{C}$ για 24-48 ώρες [103].



Εικόνα 36. Σχηματική αναπαράσταση του AFST με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού MTS [103].

Σε γενικές γραμμές, μετά την επώαση ενός τρυβλίου, παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης σε σχήμα έλλειψης γύρω από την ταινία και ως MIC ορίζεται το σημείο που η έλλειψη τέμνει την ταινία. Στην παρούσα μελέτη η ανάγνωση των MICs για το εκάστοτε αντιμυκητικό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικότερα, οι AMB και 5FC MICs προσδιορίζονται στο σημείο που η έλλειψη συναντά την ταινία και υπάρχει πλήρης (100%) ή σχεδόν πλήρης (90%) αναστολή της ανάπτυξης, αντίστοιχα, ενώ για τις αζόλες και τις εχινοκανδίνες οι MICs προσδιορίζονται στο πρώτο σημείο που παρατηρείται σημαντική (80%) αναστολή της ανάπτυξης. Σε περίπτωση που η άκρη της έλλειψης τέμνει την ταινία μεταξύ δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ή εμφανίζεται άνιση έλλειψη (από τη μία μεριά της ταινίας η έλλειψη τέμνει σε διαφορετική συγκέντρωση την ταινία από ότι στην άλλη μεριά της), ως MIC θα πρέπει να ορίζεται η υψηλότερη εξ αυτών συγκεντρώση. Τέλος, μια τιμή MTS MIC που βρίσκεται μεταξύ δύο διαδοχικών διπλών

αραιώσεων, θα πρέπει να στρογγυλοποιείται στην ανώτερη διπλή τιμή, για παράδειγμα μια AMB MIC 1,5 mg/L θα πρέπει να αναφέρεται ως 2 mg/L.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, οι MTS MICs όλων των υπό έλεγχο αντιμυκητικών προσδιορίστηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (ενδεχόμενες μεταξύ τους ασυμφωνίες εξετάστηκαν από τρίτο παρατηρητή), ενώ η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον επανέλεγχο 10/100 στελεχών σε διαφορετικές ημέρες. Επιπλέον, ο έλεγχος επαναλήφθηκε εκ νέου για τα στελέχη που παρουσίασαν ασυμφωνία μεταξύ των CLSI και MTS MICs και τα αποτελέσματα της επανάληψης κρατήθηκαν ως τελικά.

3.5 Έλεγχος *in vitro* ευαισθησίας αντιμυκητικών παραγόντων με Vitek 2

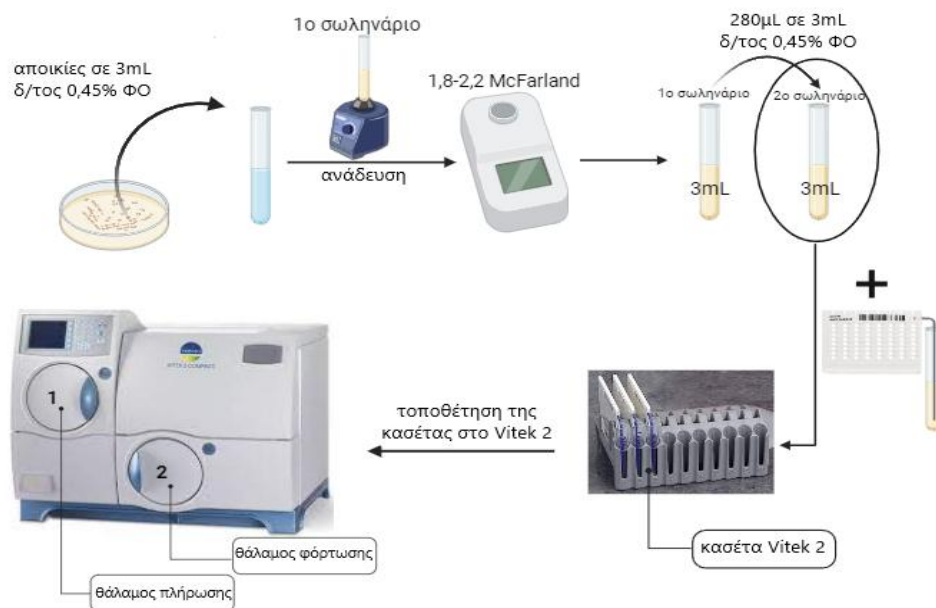
Ο AFST με το σύστημα Vitek 2 (Κεφάλαιο 2.2.2) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις κάρτες AST-YS08 (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Γαλλία) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή [121].

Antimicrobial	Code	Concentration §	Calling Range		FDA Indications for Use
			≤	≥	
Amphotericin B	AB	1, 4, 16, 32	0.25	16	
Caspofungin	CAS	0.12, 0.5, 2, 8	0.125	8	N/A**
Fluconazole	FLU	2, 4, 8, 16, 32, 64	0.5	64	<i>C. dubliniensis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitaniae</i>
Flucytosine	FCT	1, 4, 16, 32	1	64	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>
Micafungin	MCF	0.06, 0.25, 1, 4	0.06	8	N/A**
Voriconazole ^{SDD}	VRC	0.5, 1, 4, 8	0.12	8	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>

Εικόνα 37. Περιεχόμενο και χαρακτηριστικά των καρτών AST-YS08 για τον AFST με το σύστημα Vitek 2 [121].

Αρχικά, παρασκευάστηκε το εναιώρημα του εκάστοτε προς έλεγχο στελέχους ενοφθαλμίζοντας διακριτές αποικίες του σε 3 mL διαλύματος 0,45% φυσιολογικού ορού (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Γαλλία), ακολούθησε ομογενοποίηση με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex και κατόπιν προσαρμόστηκε η πυκνότητά του ώστε να αντιστοιχεί στην πυκνότητα ενός πρότυπου διαλύματος 2±0,2 McFarland με τη χρήση θολωσίμετρου. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 280 µL του εναιωρήματος σε σωληνάριο που

περιείχε 3 mL διαλύματος 0,45% φυσιολογικού ορού, το οποίο τοποθετήθηκε στην ειδική βάση (κασέτα, cassette) του Vitek 2, χωρητικότητας 10 σωληναρίων. Ακολούθως, τοποθετήθηκε η κάρτα AST-YS08, η οποία φέρει ένα τριχοειδές ρύγχος που βυθίζεται εντός του σωληναρίου, και η κασέτα εισήχθη στο θάλαμο πλήρωσης του συστήματος, όπου πραγματοποιείται η εμπότισή της με το εναιώρημα, μέσω του τριχοειδούς ρύγχους, υπό συνθήκες κενού αέρος. Όταν ολοκληρώθηκε αυτή η διαδικασία, η κασέτα μεταφέρθηκε από το χειριστή στο θάλαμο φόρτωσης, στον οποίο πραγματοποιείται η αυτόματη διαδικασία φόρτωσης της κάρτας στο σύστημα, όπου παραμένει για επώαση για 24 ώρες. Σε αυτό το στάδιο το Vitek 2 παρακολουθεί ανά 1 ώρα την ανάπτυξη που λαμβάνει χώρα εντός της ενοφθαλμισμένης με μυκητικό εναιώρημα κάρτας, πραγματοποιώντας μετρήσεις της θολερότητας στο εκάστοτε βοθρίο της. Μετά την ολοκλήρωση της περιόδου επώασης, οι τιμές MIC προσδιορίζονται αυτόματα από το σύστημα και τα αποτελέσματα του AFST είναι έτοιμα να παραληφθούν από το χειριστή [121].



Εικόνα 38. Σχηματική αναπαράσταση του AFST με το σύστημα Vitek 2 [121].

Καθώς το σύστημα Vitek 2 δεν παρέχει ακόμη ειδο-ειδικό προσδιορισμό MICs για την *C. auris*, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης το εξεταζόμενο είδος ρυθμίστηκε τελικά σε *C. albicans* ώστε να ανακτηθούν οι MICs για κάθε υπό εξέταση στέλεχος. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των 5 ειδών που σχετίζονται συχνότερα με την καντιντίαση, δηλαδή

C. albicans, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* και *C. krusei*, οι τιμές MIC παρέμειναν αμετάβλητες για όλα τα φάρμακα ανεξάρτητα από το *Candida* spp. που επιλέχτηκε, εκτός από τις εχινοκανδίνες και την *C. glabrata*, που παρατηρήθηκαν 1 με 2 διπλάσιες χαμηλότερες MFG MICs για 32/100 στελέχη και 1 με 2 διπλάσιες υψηλότερες CAS MICs για 16/100 στελέχη. Παρά το γεγονός ότι μεταξύ των προαναφερθέντων *Candida* spp., η *C. glabrata* είναι το πιο στενά συγγενικό είδος της *C. auris*, οι κάρτες AST-YS08 δεν περιέχουν διαπιστευμένο από τον FDA σκεύασμα FLC επικυρωμένο έναντι της *C. glabrata*, ενώ ο κατασκευαστής προτείνει τη χρήση μιας εναλλακτικής μεθόδου πριν την αναφορά των CAS MICs για την *C. glabrata* [121].

Προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή διακύμανση στον προσδιορισμό των Vitek 2 MICs, ένας αριθμός στελεχών (15/100) επανεξετάστηκε σε διαφορετικές μέρες, ώστε να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Επιπλέον, ο έλεγχος επαναλήφθηκε εκ νέου για τα στελέχη που παρουσίασαν ασυμφωνία μεταξύ των CLSI και Vitek 2 MICs και τα αποτελέσματα της επανάληψης κρατήθηκαν ως τελικά.

3.6 Ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε μια διασταυρούμενη σύγκριση όλων των παραχθέντων τιμών MIC (EUCAST, SYO, MTS και Vitek 2) χρησιμοποιώντας την πρότυπη μέθοδο CLSI BMD ως μεθοδολογία αναφοράς. Για όλες τις μεθόδους AFST, οι υψηλές τιμές MIC εκτός κλίμακας (off-scale) μετατράπηκαν στην επόμενη υψηλότερη διαδοχική διπλή συγκέντρωση, ενώ οι χαμηλές τιμές MIC εκτός κλίμακας παρέμειναν αμετάβλητες.

Για το σύνολο των μεθόδων AFST που εξετάστηκαν, υπολογίστηκαν το εύρος τιμών MIC, η επικρατούσα τιμή τους (modal MIC), οι τιμές MIC₅₀ και MIC₉₀ (οι MICs που ανέστειλαν την ανάπτυξη του 50% και του 90% των στελεχών, αντίστοιχα), καθώς και το ποσοστό αντοχής για τους αντιμυκητικούς παράγοντες για τους οποίους υπάρχουν διαθέσιμα δοκιμαστικά όρια αντοχής από τα CDC (AMB ≥ 2 mg/L, FLC ≥ 32 mg/L, AFG ≥ 4 mg/L, CAS ≥ 2 mg/L, MFG ≥ 4 mg/L) [86]. Για την ποσοτική συσχέτιση, τα αποτελέσματα της CLSI BMD και της εκάστοτε άλλης μεθόδου AFST συγκρίθηκαν με paired Student's t-test κατόπιν της μετατροπής των τιμών MIC σε log₂ και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (*r*). Σε κάθε περίπτωση, μια τιμή *p* < 0,05 θεωρήθηκε ότι υποδείκνυε μια στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, υπολογίστηκε η ΕΑ εντός ± 1

και ± 2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων (\log_2) μεταξύ των συγκρινόμενων μεθοδολογιών. Για την ποιοτική συσχέτιση, εκτιμήθηκε η CA μεταξύ των συγκρινόμενων μεθόδων για τα αντιμυκητικά εκείνα για τα οποία έχουν προταθεί δοκιμαστικά όρια αντοχής από τα CDC [86]. Οι ασυμφωνίες ορίστηκαν ως MaEs όταν η CLSI BMD ταξινομούσε ένα στέλεχος ως non-R και η εκάστοτε εξεταζόμενη μέθοδος AFST ως R (ψευδής αντοχή), και ως VmE όταν η CLSI BMD κατηγοριοποιούσε ένα στέλεχος ως R και η εκάστοτε εξεταζόμενη μέθοδος AFST ως non-R (ψευδής μη-αντοχή). Τέλος, η CA υπολογίστηκε εκ νέου με βάση την ειδική για την κάθε μέθοδο AFST ανώτατη οριακή τιμή WT (WT upper limit value, WT-ULV) για όριο εμπιστοσύνης 99% που προσδιορίστηκε για το εκάστοτε αντιμυκητικό χρησιμοποιώντας το δωρεάν, διαθέσιμο στην ιστοσελίδα της EUCAST, πρόγραμμα ECOFFinder [122]. Η WT-ULV ορίζεται ως η ανώτερη τιμή MIC όπου τελειώνει η κατανομή WT στελεχών, και χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμησή τους ως WT με $MIC \leq WT-ULV$ ή non-WT με $MIC > WT-ULV$. Για τους κλάδους *C. auris* για τους οποίους ήταν διαθέσιμα <15 στελέχη (κλάδοι II και V) χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV. Για τα στελέχη *C. auris* κλάδου I, οι WT-ULVs για τις εχνοκανδίνες προσδιορίστηκαν βάση των στελεχών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού πακέτου GraphPad Prism, έκδοση 8.0, για Windows (GraphPad Software, Σαν Ντιέγκο, Καλιφόρνια, ΗΠΑ).

4. Αποτελέσματα

4.1 Προφίλ της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητικά σύμφωνα με τη μέθοδο αναφοράς CLSI BMD

Η απόλυτη συμφωνία μεταξύ των δύο παρατηρητών αναφορικά με τις τιμές CLSI MIC όλων των υπό εξέταση αντιμυκητικών ήταν άριστη (96%). Επίσης, στο πλαίσιο του ελέγχου ποιότητας, οι MICs για τα στελέχη αναφοράς βρίσκονταν εντός των αναμενόμενων ευρών συγκεντρώσεων που ορίζουν οι κατευθυντήριες οδηγίες.

Συνολικά, στενές μονοκόρυφες κατανομές MIC βρέθηκαν για την AMB και τη 5FC (3-4 διπλάσιες αραιώσεις), ενώ ευρύτερες κατανομές MIC παρατηρήθηκαν για τις εχινοκανδίνες (4-7 διπλάσιες αραιώσεις, εκτός των στελεχών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*), και τις αζόλες, κυρίως για τη VRC (5-12 διπλάσιες αραιώσεις).

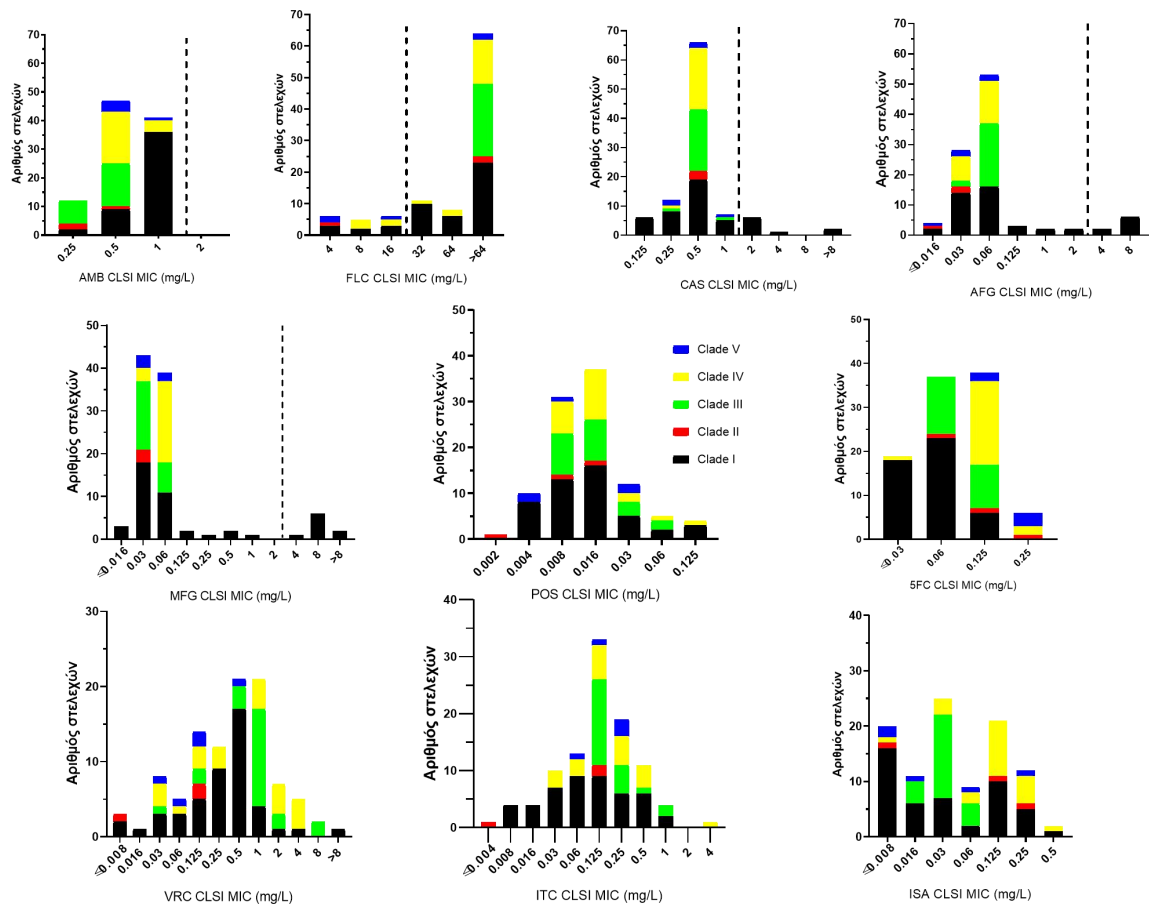
Λαμβάνοντας υπόψη τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris*, όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, ανεξαρτήτως κλάδου, με τα στελέχη κλάδου I να εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερη επικρατούσα τιμή MIC από την αντίστοιχη των στελεχών των άλλων κλάδων (1 έναντι 0,5 mg/L, αντίστοιχα). Η εκτιμώμενη CLSI AMB WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 2 mg/L. Οι κλαδο-ειδικές CLSI AMB WT-ULVs ήταν 2 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και IV.

Από την άλλη πλευρά, όλα τα στελέχη κλάδου III ήταν R στη FLC (MIC >64 mg/L), ενώ το ποσοστό αντοχής στη FLC για τα στελέχη κλάδου I, II, IV και V ήταν 83%, 67%, 77% και 40%, αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των FLC MICs που προέκυψαν ήταν εκτός κλίμακας, και επομένως δεν ήταν αποδεκτές για την εκτίμηση των WT-ULVs. Η εκτιμώμενη CLSI WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 0,06 mg/L, 2 mg/L και 16 mg/L για τις αζόλες POS, ITC και VRC, αντίστοιχα. Ωστόσο, η κατανομή των τιμών MIC για την ISA ήταν τρικόρυφη, ως αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η εκτίμηση WT-ULV. Οι κλαδο-ειδικές CLSI WT-ULVs για τις POS/ITC/VRC ήταν 0,06/2/4 mg/L, 0,03/0,25/2 mg/L και 0,03/2 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα. Η CLSI VRC WT-ULV δεν μπορούσε να προσδιοριστεί για τα στελέχη κλάδου IV, διότι η κατανομή των MICs ήταν τρικόρυφη έχοντας τρεις ίδιες επικρατούσες τιμές.

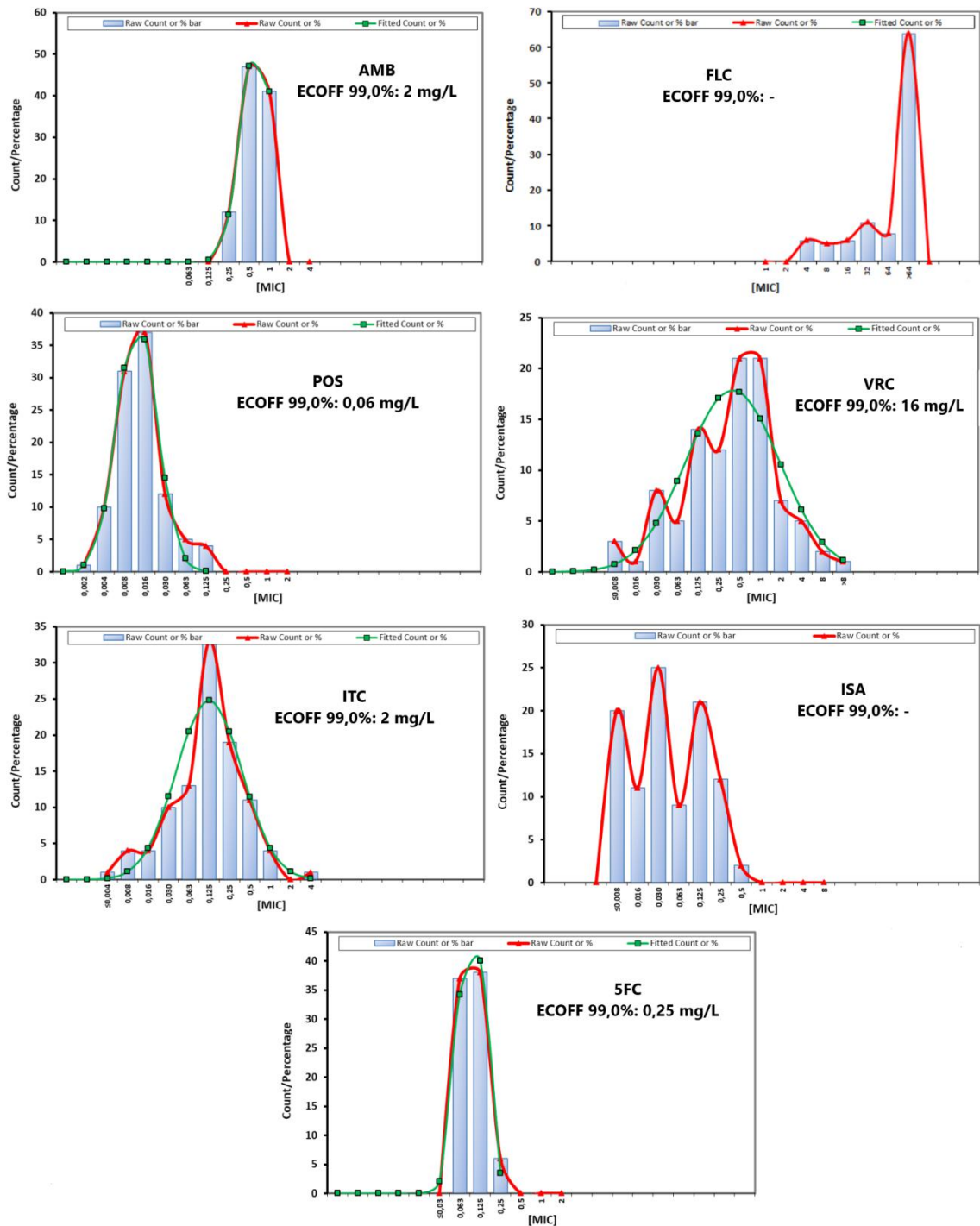
Όλα τα στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* ήταν R στις AFG, MFG και CAS και παρουσίασαν διασταυρούμενη αντοχή στη FLC. Η εκτιμώμενη CLSI WT-ULV προσδιορίστηκε βάση αυτών των στελεχών και ήταν 2 mg/L για τις AFG και

MFG και 1 mg/L για την CAS. Οι κλαδο-ειδικές CLSI WT-ULVs για τις AFG και MFG ήταν 2 mg/L και για την CAS ήταν 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, ενώ οι κλαδο-ειδικές CLSI WT-ULVs για την AFG ήταν 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και IV, για τη MFG 0,06 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου IV.

Σχετικά με τη 5FC, η επικρατούσα τιμή MIC των στελεχών κλάδου I και III ήταν ελαφρώς χαμηλότερη από την επικρατούσα τιμή MIC των στελεχών των υπόλοιπων κλάδων (0,06 έναντι 0,125-0,25 mg/L). Στον προσδιορισμό WT-ULV δε συμπεριλήφθηκαν στελέχη που εμφάνισαν τιμή MIC $\leq 0,03$ mg/L. Η εκτιμώμενη CLSI FC WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 0,25 mg/L. Η κλαδο-ειδική CLSI 5FC WT-ULV ήταν 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και III.



Εικόνα 39. Κατανομές των CLSI MICs των στελεχών *C. auris* ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris* [86].



Εικόνα 40. Τιμές CLSI WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη *C. auris* ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και ISA WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της ή ήταν τρικόρυφη.

Πίνακας 11. Κλαδο-ειδικό προφίλ της *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris* (n=100) με την πρότυπη μέθοδο CLSI BMD.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Κλάδος	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	CDC R BP (mg/L)	% αντοχή ^α	CLSI WT-ULVs (mg/L) ^β	% αντοχή ^γ
AMB	(I-V)	0,5 (0,25-1)					
	I	1 (0,25-1)	0,5/1	2	0	2	0
	II	0,25 (0,25-0,5)	1/1	2	0	2	0
	III	0,5 (0,25-0,5)	0,25/0,25	2	0	ΔΠ (2)	0
	IV	0,5 (0,5-1)	0,5/0,5	2	0	1	0
	V	0,5 (0,5-1)	0,5/1	2	0	1	0
FLC	(I-V)	>64 (4->64)					
	I	>64 (4->64)	>64/>64	32	83	ΔΠ	ΔΠ
	II	>64 (4->64)	64/>64	32	83	ΔΠ	ΔΠ
	III	>64 (>64->64)	>64/>64	32	67	ΔΠ	ΔΠ
	IV	>64 (8->64)	>64/>64	32	100	ΔΠ	ΔΠ
	V	4/>64 (4->64)	16/>64	32	77	ΔΠ	ΔΠ
POS	(I-V)	0,016 (0,002-0,125)					
	I	0,016 (0,004-0,125)	0,016/0,03			0,06	4
	II	0,002/0,008/0,016 (0,002-0,016)	0,016/0,03			0,06	6
	III	0,008/0,016 (0,008-0,06)	0,008/0,016	-	-	ΔΠ (0,06)	0
	IV	0,016 (0,008-0,125)	0,016/0,03			0,03	2
	V	0,016 (0,008-0,125)	0,016/0,03			0,03	4
VRC	(I-V)	0,004/0,03 (0,004-0,03)					
	I	0,5/1 (≤0,008->8)	0,5/2			16	0
	II	0,125 (≤0,008->8)	0,125/0,5	-	-	4	1
		0,125 (≤0,008-0,125)	0,125/0,125			ΔΠ (16)	0
			1/2			2	2

ITC	III	1 (0,03-8)	1/4			$\Delta\Pi$ (16)	0
	IV	1/2/4 (0,03-4)	0,125/0,125			$\Delta\Pi$ (16)	0
	V	0,125 (0,03-0,5)					
	(I-V)	0,125 ($\leq 0,004-4$)					
	I	0,06/0,125 (0,008-1)	0,125/0,5			2	1
	II	0,125 ($\leq 0,004-0,125$)	0,06/0,5			2	0
	III	0,125 (0,125-1)	0,125/0,125	-	-	$\Delta\Pi$ (2)	0
	IV	0,125 (0,03-4)	0,125/0,25			0,25	13
	V	0,25 (0,06-0,25)	0,125/0,5			2	4
	(I-V)	0,25 ($\leq 0,06-0,25$)	0,25/0,25			$\Delta\Pi$ (2)	0
ISA	(I-V)	0,03 ($\leq 0,008-0,5$)					
	I	$\leq 0,008$ ($\leq 0,008-0,5$)	0,03/0,25			$\Delta\Pi$	$\Delta\Pi$
	II	$\leq 0,008/0,125/0,25$ ($\leq 0,008-0,25$)	0,125/ $\leq 0,008$			$\Delta\Pi$	$\Delta\Pi$
	III	0,03 (0,016-0,06)	0,25/0,25	-	-	$\Delta\Pi$	$\Delta\Pi$
	IV	0,125 ($\leq 0,008-0,5$)	0,03/0,06			$\Delta\Pi$	$\Delta\Pi$
	V	$\leq 0,008$ ($\leq 0,008-0,25$)	0,125/0,25			$\Delta\Pi$	$\Delta\Pi$
	(I-V)	0,06 ($\leq 0,016-8$)	0,016/0,06				
AFG	I	0,06 ($\leq 0,016-8$)	0,06/1	4	8	2	8
	II	0,03 ($\leq 0,016-0,03$)	0,06/8	4	17	2	17
	III	0,06 (0,03-0,06)	0,03/0,03	4	0	$\Delta\Pi$ (2)	0
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,06/0,06	4	0	0,125	0
	V	0,06 ($\leq 0,016-0,06$)	0,06/0,06	4	0	0,125	0
	(I-V)	0,06 ($\leq 0,016-0,06$)	0,06/0,06	4	0	$\Delta\Pi$ (2)	0

	(I-V)	0,03 ($\leq 0,016 \rightarrow 8$)					
MFG	I	0,03 ($\leq 0,016 \rightarrow 8$)	0,06/0,5	4	9	2	9
			0,06/8	4	19	2	19
	II	0,03 (0,03-0,03)	0,03/0,03	4	0	$\Delta\Pi$ (2)	0
	III	0,03 (0,03-0,06)	0,03/0,06	4	0	0,06	0
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,06/0,06	4	0	0,125	0
	V	0,03 (0,03-0,06)	0,06/0,06	4	0	$\Delta\Pi$ (2)	0
	(I-V)	0,5 (0,125 \rightarrow 8)					
CAS	I	0,5 (0,125 \rightarrow 8)	0,5/1	2	9	1	9
			0,5/2	2	19	1	19
	II	0,5 (0,5-0,5)	0,5/0,5	2	0	$\Delta\Pi$ (1)	0
	III	0,5 (0,25-1)	0,5/0,5	2	0	$\Delta\Pi$ (1)	0
	IV	0,5 (0,25-0,5)	0,5/0,5	2	0	$\Delta\Pi$ (1)	0
	V	0,25/0,5 (0,25-1)	0,5/0,5	2	0	$\Delta\Pi$ (1)	0
	(I-V)	0,125 ($\leq 0,03-0,25$)					
5FC ^δ	I	0,06 ($\leq 0,03-0,125$)	0,06/0,125			0,25	0
			0,06/0,125			0,25	0
	II	0,06/0,125/0,25 (0,06-0,25)	0,125/0,125	-	-	$\Delta\Pi$ (0,25)	0
	III	0,06 (0,06-0,125)	0,06/0,125			0,125	0
	IV	0,125 ($\leq 0,03-0,25$)	0,125/0,25			$\Delta\Pi$ (0,25)	0
	V	0,25 (0,125-0,25)	0,25/0,25			$\Delta\Pi$ (0,25)	0

^αΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα είναι διαθέσιμα [86].

^βΓια κλάδους με λίγα στελέχη ή κλάδους που δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί WT-ULV ($\Delta\Pi$), χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV και παρουσιάζεται σε παρένθεση.

^γΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα δοκιμαστικά όρια αντοχής, που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder, για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα μπορούσαν να προσδιοριστούν.

^δΓια τον προσδιορισμό WT-ULV δε συμπεριλήφθηκαν στελέχη που εμφάνισαν τιμή MIC $\leq 0,03$ mg/L.

$\Delta\Pi$: δεν προσδιορίστηκε

4.2 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και EUCAST BMD

Οι τιμές MIC για τα στελέχη ποιοτικού ελέγχου ήταν εντός των ορίων αναφοράς για όλα τα αντιμυκητικά.

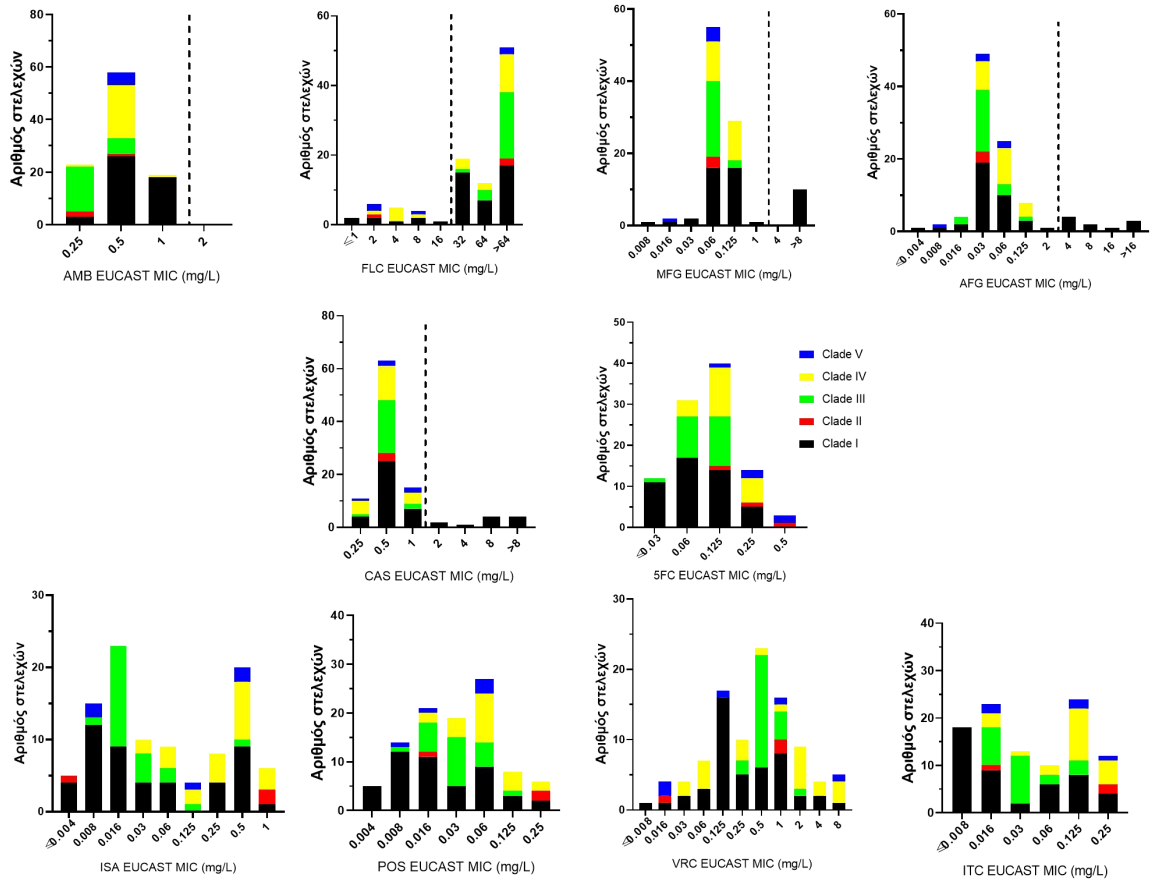
Συνολικά, στενές κατανομές MIC βρέθηκαν για την AMB και τη 5FC (3-5 διπλάσιες αραιώσεις), ενώ ευρύτερες κατανομές MIC παρατηρήθηκαν για τα αντιμυκητικά FLC, CAS, MFG, POS, ITC (6-8 διπλάσιες αραιώσεις) και κυρίως για τα VRC, ISA και AFG (9-11 διπλάσιες αραιώσεις).

Σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris*, όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, με τα στελέχη κλάδου I (18/47 στελέχη) να εμφανίζουν ελαφρώς υψηλότερες τιμές MIC από την αντίστοιχη των στελεχών των άλλων κλάδων (1 έναντι 0,5 mg/L, αντίστοιχα).

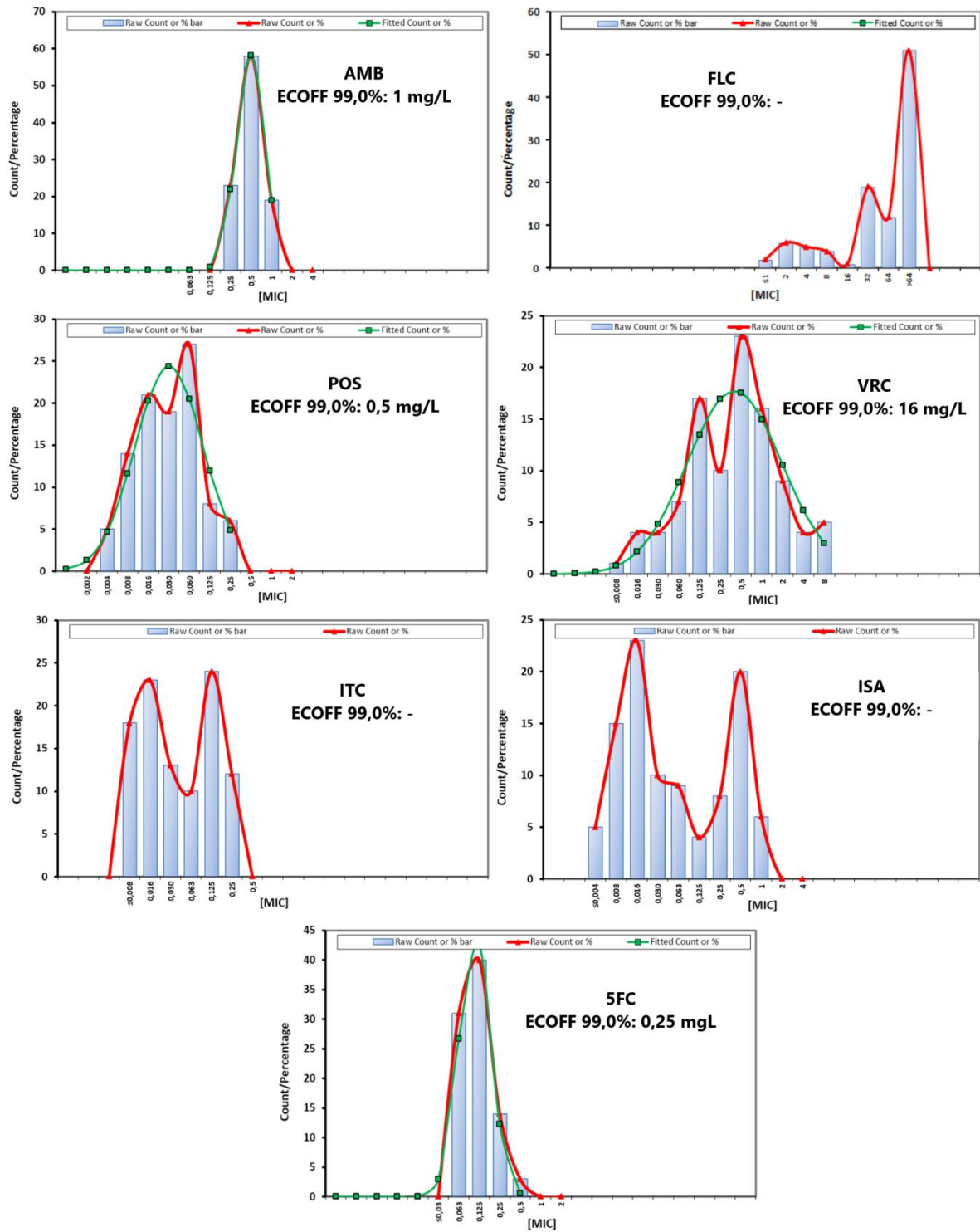
Αντιθέτως, όλα τα στελέχη κλάδου III ήταν R στη FLC, ενώ το ποσοστό αντοχής στη FLC για τα στελέχη κλάδου I, II, IV και V ήταν 83%, 67%, 73% και 40%, αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των FLC MICs που προέκυψαν ήταν εκτός κλίμακας, και επομένως δεν ήταν αποδεκτές για την εκτίμηση των WT-ULVs.

Όλα τα στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* ήταν R στις AFG, MFG και CAS και παρουσίασαν διασταυρούμενη αντοχή στη FLC.

Σχετικά με τη 5FC, η επικρατούσα τιμή MIC των στελεχών κλάδου I ήταν ελαφρώς χαμηλότερη από την επικρατούσα τιμή MIC των στελεχών των υπόλοιπων κλάδων (0,06 έναντι 0,125-0,5 mg/L).



Εικόνα 41. Κατανομές EUCAST MICs των στελεχών *C. auris* ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris* [86].



Εικόνα 42. Τιμές EUCAST WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη *C. auris* ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC, ITC και ISA WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της ή ήταν δικόρυφη.

Πίνακας 12. Προφίλ *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris* (n=100) με την πρότυπη μέθοδο EUCAST.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	CDC R BP (mg/L)	% αντοχή ^α	EUCAST WT-ULVs (mg/L)	% αντοχή ^β
AMB	0,5 (0,25-1)	0,5/1	2	0	1	0
FLC	>64 (≤1->64)	>64/>64	32	82	ΔΠ	ΔΠ
POS	0,06 (0,004-0,25)	0,03/0,125	-	-	0,5	0
VRC	0,5 (≤0,008-8)	0,5/2	-	-	16	0
ITC	0,125 (≤0,008-0,25)	0,03/0,25	-	-	ΔΠ	ΔΠ
ISA	0,016 (≤0,004-1)	0,03/0,5	-	-	ΔΠ	ΔΠ
AFG	0,03 (≤0,004->16)	0,03/2	4	10	2	10
MFG	0,06 (0,008->8)	0,06/1	4	10	8	10
CAS	0,5 (0,125->8)	0,5/2	2	11	1	11
5FC	0,125 (≤0,03-0,5)	0,125/0,25	-	-	0,25	3

^αΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα είναι διαθέσιμα [86].

^βΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα δοκιμαστικά όρια αντοχής, που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder, για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα μπορούσαν να προσδιοριστούν.

Οι επικρατούσες τιμές (εύρη) MIC, MIC₅₀ και MIC₉₀ συμφωνούσαν για όλα τα αντιμυκητικά με βάση τα τελικά σημεία CLSI και EUCAST, με διαφορά που δεν υπερέβαινε τις ±2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις, εκτός από το αντιμυκητικό ITC. Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους για όλα τα αντιμυκητικά δεν παρουσίασαν σημαντικά στατιστικές διαφορές (p 0,1581->0,9), με εξαίρεση την ITC και POS (p <0,0001).

Η ΕΑ εντός ±1/±2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν εξαιρετική για τα αντιμυκητικά FLC (90%/98%), 5FC (94%/99%), τις εχινοκανδίνες AFG (87%/97%), MFG (83%/97%) και CAS (90%/97%) και την AMB (100%/100%), ενώ η ΕΑ για τις αζόλες ITC, POS, VRC και ISA ήταν χαμηλή έως μέτρια, 39%/68%, 50%/84%, 71%/88% και 71%/88%, αντίστοιχα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris*, όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB και με τις δύο πρότυπες μεθόδους (100% CA). Η εκτιμώμενη EUCAST AMB WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 1 mg/L, ενώ οι κλαδο-ειδικές EUCAST AMB WT-ULVs ήταν 2 mg/L και 0,5 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και III, αντίστοιχα. Η CA μεταξύ των μεθόδων δε θα άλλαζε εάν υιοθετούνταν η EUCAST AMB WT-ULV, που προτείνεται στην παρούσα μελέτη.

Από την άλλη μεριά, το 82-83% των στελεχών ερμηνεύτηκε ως R στη FLC και με τις

δύο πρότυπες μεθόδους, αποδίδοντας 97% CA (1% MaE, 2% VmE). Η πλειοψηφία των FLC MICs που προέκυψαν ήταν εκτός κλίμακας, και επομένως δεν ήταν αποδεκτές για την εκτίμηση των WT-ULVs. Οι ITC MICs που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους παρουσίασαν σημαντικά στατιστικές διαφορές ($p < 0,0001$), που οφείλονταν στη μετατόπιση της κατανομής EUCAST MIC ($\leq 0,008 - 0,25$ mg/L) κατά μέσο όρο 4 διπλάσιες αραιώσεις χαμηλότερα από την κατανομή CLSI MIC ($\leq 0,004 - 4$ mg/L). Σημαντικά στατιστικές διαφορές παρατηρήθηκαν, ακόμη, για το αντιμυκητικό POS ($p < 0,0001$), που οφείλονταν στο ότι το 40% των στελεχών εμφάνισε EUCAST MIC $\leq 0,016$ mg/L, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό με τη μέθοδο CLSI ήταν 79%.

Η εκτιμώμενη EUCAST POS/VRC WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 0,5/16 mg/L (100% CA). Οι κλαδο-ειδικές EUCAST WT-ULVs για την POS ήταν 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, ενώ για τη VRC ήταν 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και III. Η EUCAST VRC WT-ULV δεν μπορούσε να προσδιοριστεί για τα στελέχη κλάδου IV, διότι η κατανομή των MICs ήταν δικόρυφη έχοντας δύο σχεδόν ίδιες επικρατούσες τιμές. Ομοίως, η κατανομή των τιμών MIC για τις ITC και ISA ήταν δικόρυφη, ως αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η εκτίμηση WT-ULV. Η CA που προκύπτει, μεταξύ των δύο μεθόδων, για την POS ήταν 96% (4% MaE), 100% και 96% (4% MaE) και για την VRC ήταν 92% (6% MaE, 2% VmE), 87% (13% VmE) και 96% (4% MaE) για τους κλάδους I, III και IV, αντίστοιχα.

Υιοθετώντας τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για τις εχινοκανδίνες, το 8-9% των στελεχών με τη μέθοδο CLSI ερμηνεύτηκε ως R, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό με τη μέθοδο EUCAST ήταν 9-10%, αποδίδοντας 98-99% CA (2-1% MaE, 0% VmE). Η εκτιμώμενη EUCAST WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, για την AFG ήταν 2 mg/L, για τη MFG ήταν 8 mg/L και για την CAS ήταν 1 mg/L. Οι κλαδο-ειδικές EUCAST WT-ULVs για την AFG ήταν 2 mg/L, 0,06 mg/L και 0,25 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα, για τη MFG ήταν 8 mg/L και 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και IV, αντίστοιχα, και για την CAS ήταν 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV.

Εφαρμόζοντας τις EUCAST WT-ULVs, ανεξαρτήτως κλάδου, που προτείνονται στην παρούσα μελέτη για τις εχινοκανδίνες, η CA που προκύπτει μεταξύ των μεθόδων ήταν 99% για την AFG (1% VmE), 92% για τη MFG (8% MaE) και 98% για την CAS (2% MaE). Ωστόσο, για τους κλάδους I/III/IV η CA ήταν 98%/96%/100%, 83%/100%/100% και 96%/100%/100%, για τα αντιμυκητικά AFG, MFG και CAS, αντίστοιχα.

Τέλος, η εκτιμώμενη EUCAST 5FC WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 0,25 mg/L

(97% CA, 3% MaE), ενώ οι κλαδο-ειδικές WT-ULVs ήταν 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, 0,25 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και 0,5 mg/L για τα στελέχη κλάδου IV. Η CA που προκύπτει, μεταξύ των δύο μεθόδων, για τα στελέχη κλάδου I ήταν 89%, ενώ για τα στελέχη κλάδου III και IV ήταν 100%.

Πίνακας 13. Κλαδο-ειδικά CLSI και EUCAST δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών *C. auris*.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Κλάδος	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)		% EA		CDC R BP (mg/L)	% CA (MaE, VmE) βάση CDC BP	EUCAST ECOFF (mg/L) ^a	% CA (MaE, VmE) βάση EUCAST ECOFF
		CLSI	EUCAST	±1	±2				
AMB	(I-V)	0,5 (0,25-1)	0,5 (0,25-1)	100	100	2	100 (0%, 0%)	1	100 (0%, 0%)
	I	1 (0,25-1)	0,5 (0,25-1)	100	100	2	100 (0%, 0%)	2	100 (0%, 0%)
	II	0,25 (0,25-0,5)	0,25 (0,25-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-0,5)	0,25 (0,25-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	0,5	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,5-1)	0,5 (0,25-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	V	0,5 (0,5-1)	0,5 (0,5-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
FLC	(I-V)	>64 (4->64)	>64 (≤1->64)	90	98	32	97 (1%, 2%)	ΔΠ	ΔΠ
	I	>64 (4->64)	>64 (≤1->64)	89	98	32	98 (1%, 1%)	ΔΠ	ΔΠ
	II	>64 (4->64)	>64 (2->64)	100	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	III	>64 (>64->64)	>64 (32->64)	96	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	IV	>64 (8->64)	>64 (2->64)	82	95	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	V	4/>64 (4->64)	2 (2-8)	100	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
POS	(I-V)	0,016 (0,002-0,125)	0,06 (0,004-0,25)	50	84			0,5	100 (0%, 0%)
	I	0,016 (0,004-0,125)	0,008 (0,004-0,25)	53	87			0,125	96 (4%, 0%)
	II	0,002/0,008/0,016 (0,002-0,016)	0,25 (0,016-0,25)	0	0			ΔΠ (0,5)	100 (0%, 0%)
	III	0,008/0,016 (0,008-0,06)	0,03 (0,008-0,125)	70	91	-	-	0,125	100 (0%, 0%)
	IV	0,016 (0,008-0,125)	0,06 (0,016-0,25)	23	82			0,125	96 (4%, 0%)
	V	0,004/0,03 (0,004-0,03)	0,06 (0,008-0,06)	80	80			ΔΠ (0,5)	100 (0%, 0%)
VRC	(I-V)	0,5/1 (≤0,008->8)	0,5 (≤0,008-8)	71	88			16	100 (0%, 0%)
	I	0,5 (≤0,008->8)	0,125 (≤0,008-8)	62	89			1	92 (6%, 2%)
	II	0,125 (≤0,008-0,125)	1 (0,016-1)	33	33	-	-	ΔΠ (16)	100 (0%, 0%)
	III	1 (0,03-8)	0,5 (0,25-2)	61	78			1	87 (0%, 13%)

ITC	IV	1/2/4 (0,03-4)	2 (0,03-8)	95	100			ΔΠ (16)	96 (4%, 0%)
	V	0,125 (0,03-0,5)	0,016 (0,016-8)	60	80			ΔΠ (16)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,125 (≤0,004-4)	0,125 (≤0,008-0,25)	39	68			ΔΠ	ΔΠ
	I	0,06/0,125 (0,008-1)	≤0,008 (≤0,008-0,25)	40	66			ΔΠ	ΔΠ
	II	0,125 (≤0,004-0,125)	≤0,008 (≤0,008-0,25)	67	100			ΔΠ	ΔΠ
	III	0,125 (0,125-1)	0,25 (0,016-0,25)	17	48	-	-	ΔΠ	ΔΠ
	IV	0,125 (0,03-4)	0,03 (0,016-0,125)	59	91			ΔΠ	ΔΠ
ISA	V	0,25 (0,06-0,25)	0,125 (0,016-0,25)	40	60			ΔΠ	ΔΠ
	(I-V)	0,03 (≤0,008-0,5)	0,016 (≤0,004-1)	71	88			ΔΠ	ΔΠ
	I	≤0,008 (≤0,008-0,5)	0,008 (≤0,004-1)	72	85			ΔΠ	ΔΠ
	II	≤0,008/0,125/0,25 (≤0,008-0,25)	1 (≤0,004-1)	33	67			ΔΠ	ΔΠ
	III	0,03 (0,016-0,06)	0,016 (0,008-0,5)	87	96	-	-	ΔΠ	ΔΠ
	IV	0,125 (≤0,008-0,5)	0,5 (0,03-1)	64	100			ΔΠ	ΔΠ
	V	≤0,008 (≤0,008-0,25)	0,008/0,5 (0,008-0,5)	40	40			ΔΠ	ΔΠ
AFG	(I-V)	0,06 (≤0,016-8)	0,03 (≤0,004->16)	87	97	4	99 (1%, 0%)	2	99 (1%, 0%)
	I	0,06 (≤0,016-8)	0,03 (≤0,004->16)	70	94	4	98 (2%, 0%)	2	98 (2%, 0%)
	II	0,03 (≤0,016-0,03)	0,03 (0,03-0,03)	100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	III	0,06 (0,03-0,06)	0,03 (0,016-0,125)	91	100	4	100 (0%, 0%)	0,06	96 (4%, 0%)
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,06 (0,03-0,125)	100	100	4	100 (0%, 0%)	0,25	100 (0%, 0%)
	V	0,06 (≤0,016-0,06)	0,03/0,06 (0,008-0,06)	100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
MFG	(I-V)	0,03 (≤0,016->8)	0,06 (0,008->8)	83	97	4	99 (1%, 0%)	8	92 (8%, 0%)
	I	0,03 (≤0,016->8)	0,06/0,125 (0,008->8)	68	94	4	98 (2%, 0%)	8	83 (17%, 0%)
	II	0,03 (0,03-0,03)		100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	III	0,03 (0,03-0,06)	0,06 (0,06-0,06)	87	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)

CAS	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,06 (0,06-0,125)	100	100	4	100 (0%, 0%)	0,125	100 (0%, 0%)
	V	0,03 (0,03-0,06)	0,06/0,125 (0,06-0,125)	100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
			0,06 (0,016-0,06)						
	(I-V)	0,5 (0,125->8)	0,5 (0,125->8)	90	97	2	98 (2%, 0%)	1	98 (2%, 0%)
	I	0,5 (0,125->8)	0,5 (0,25->8)	79	94	2	96 (4%, 0%)	1	96 (4%, 0%)
	II	0,5 (0,5-0,5)	0,5 (0,5-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-1)	0,5 (0,25-1)	100	100	2	100 (0%, 0%)	1	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,25-0,5)	0,5 (0,25-1)	100	100	2	100 (0%, 0%)	1	100 (0%, 0%)
	V	0,25/0,5 (0,25-1)	0,5/1 (0,25-1)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
			0,125 (≤0,03-0,5)						
5FC ^β	(I-V)	0,125 (≤0,03-0,25)	0,06 (≤0,03-0,25)	94	99			0,25	97 (3%, 0%)
	I	0,06 (≤0,03-0,125)	0,125/0,25/0,5 (0,125-0,5)	94	100			0,125	89 (11%, 0%)
	II	0,06/0,125/0,25 (0,06-0,25)	0,125 (≤0,03-0,125)	67	100	-	-	ΔΠ (0,25)	67 (33%, 0%)
	III	0,06 (0,06-0,125)	0,125 (0,06-0,25)	100	100			0,25	100 (0%, 0%)
	IV	0,125 (≤0,03-0,25)	0,125 (0,06-0,25)	95	95			0,5	100 (0%, 0%)
	V	0,25 (0,125-0,25)	0,25/0,5 (0,125-0,5)	80	100			ΔΠ (0,25)	60 (40%, 0%)

^αΓια κλάδους με λίγα στελέχη ή κλάδους που δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί WT-ULV (ΔΠ), χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV και παρουσιάζεται σε παρένθεση.

^βΓια τον προσδιορισμό WT-ULV δε συμπεριλήφθηκαν στελέχη που εμφάνισαν τιμή MIC ≤0,03 mg/L.

4.3 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και SYO

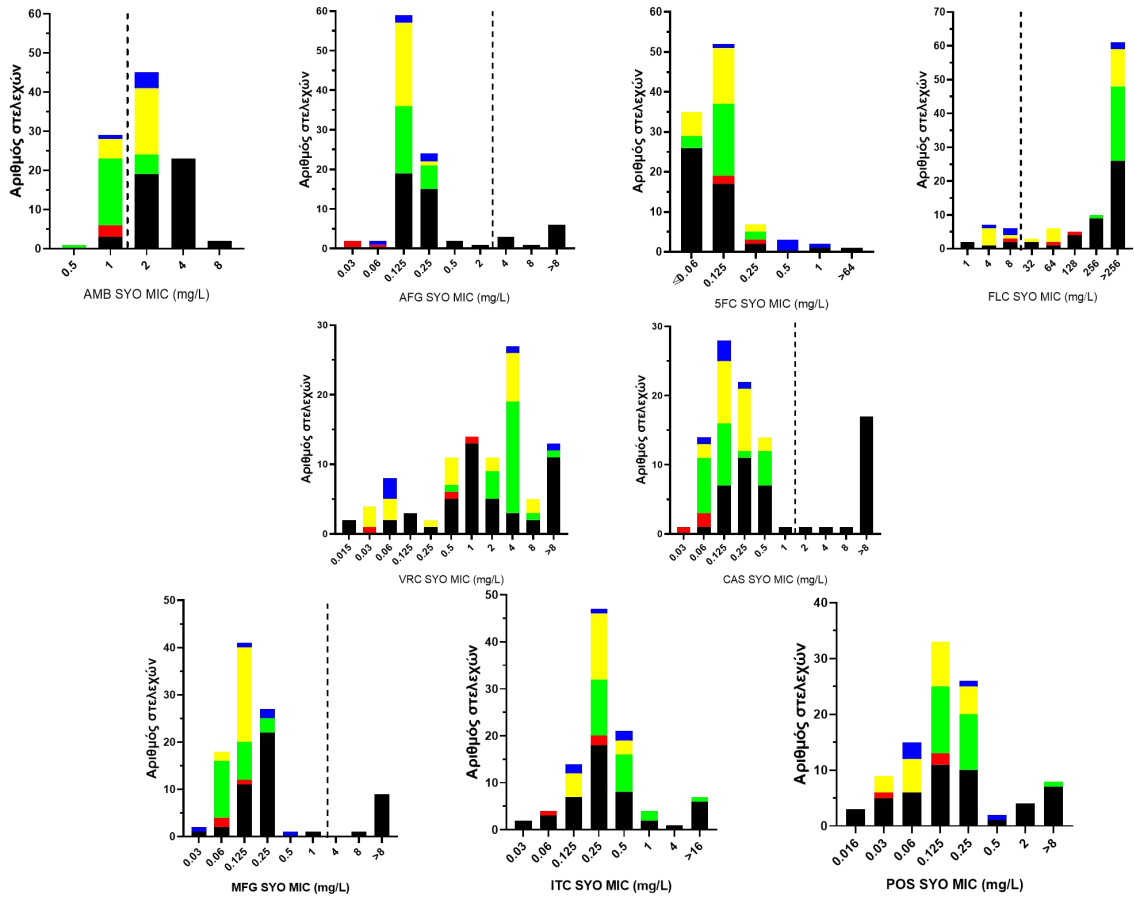
Η απόλυτη συμφωνία μεταξύ των παρατηρητών για τις τιμές MIC που ελήφθησαν με τη μέθοδο SYO όλων των αντιμυκητικών ήταν εξαιρετική (95%), καθώς επίσης οι τιμές MIC για τα στελέχη ποιοτικού ελέγχου βρίσκονταν εντός των ορίων αναφοράς.

Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για την AMB, με τα στελέχη κλάδου II και III να εμφανίζουν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC (1 mg/L) σε σύγκριση με τα στελέχη κλάδου I (4 mg/L), IV και V (2 mg/L). Σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris*, όλα τα στελέχη κλάδου II και το 78% των στελεχών κλάδου III ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, ενώ το ποσοστό αντοχής για τα στελέχη κλάδου I, IV και V ήταν 94%, 77% και 80%, αντίστοιχα.

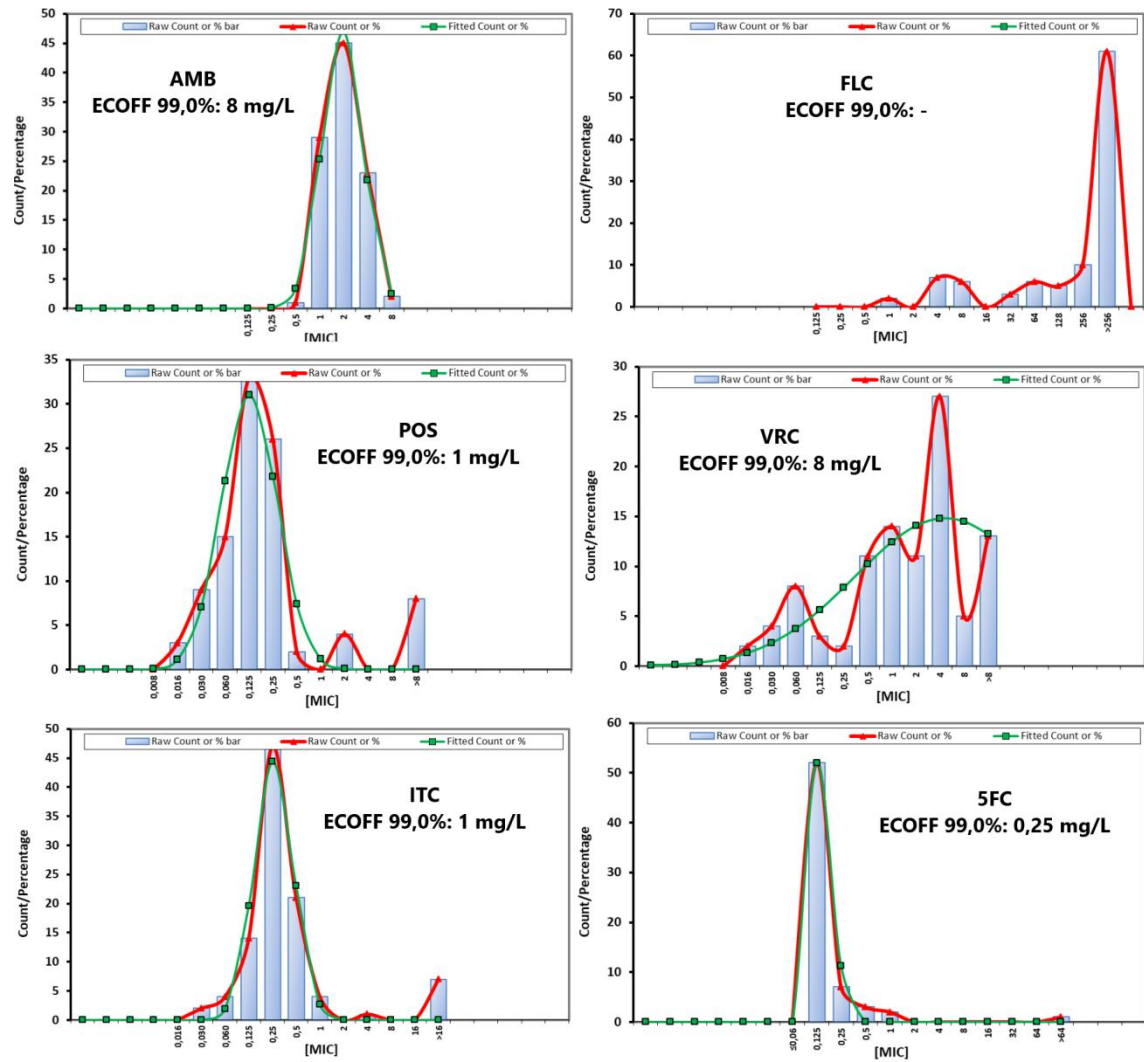
Όσον αφορά τις αζόλες, το εύρος κατανομής των τιμών MIC ήταν διευρυμένο (8-11 διπλάσιες αραιώσεις), καθώς επίσης παρατηρήθηκαν και κλαδο-ειδικές διαφορές. Τα ποσοστά αντοχής στη FLC κυμαίνονταν από 40% και 66% για τα στελέχη κλάδου V και II, αντίστοιχα, έως 73%, 89% και 100% για τα στελέχη κλάδου IV, I και III, αντίστοιχα. Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για το αντιμυκητικό VRC, με τα στελέχη του κλάδου V να εμφανίζουν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC από τα στελέχη κλάδου III και IV (0,06 έναντι 4 mg/L, αντίστοιχα).

Όσον αφορά τις εχινοκανδίνες, τα εύρη τιμών MIC που ελήφθησαν ήταν ευρέα (8-10 διπλάσιες αραιώσεις), εκτός από τα στελέχη με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*. Όλα τα στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*, ήταν R στην AFG, MFG και CAS, ενώ παρουσίασαν διασταυρούμενη ανοχή στην AMB (9/9, 100%) και μειωμένη ευαισθησία στη FLC (9/9, 100%).

Τέλος, τα περισσότερα στελέχη (97/100) παρουσίασαν χαμηλές τιμές MIC για το αντιμυκητικό 5FC εκτός κλίμακας (επικρατούσα τιμή MIC $\leq 0,5$ mg/L).



Εικόνα 43. Κατανομές SYO MICs των στελεχών *C. auris* ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris* [86].



Εικόνα 44. Τιμές SYO WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη *C. auris* ανεξαρτήτως κλάδου. Η FLC WT-ULV δεν μπορούσε να εξαχθεί με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της.

Πίνακας 14. Προφίλ *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris* (n=100) με την εμπορική μέθοδο SYO.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	CDC R BP (mg/L)	% αντοχή ^α	SYO WT-ULV (mg/L)	% αντοχή ^β
AMB	2 (0,5-8)	2/4	2	70	8	0
FLC	>256 (1->256)	>256/>256	32	85	ΔΠ	ΔΠ
POS	0,125 (0,016->8)	0,125/2	-	-	1	12
VRC	4 (0,015->8)	2/>8	-	-	8	13
ITC	0,25 (0,03->16)	0,25/1	-	-	1	8
AFG	0,125 (0,03->8)	0,125/2	4	10	2	10
MFG	0,125 (0,03->8)	0,125/1	4	10	8	9
CAS	0,125 (0,03->8)	0,25/>8	2	20	0,5	21
5FC	0,125 (≤0,06->64)	0,125/0,25	-	-	0,25	6

^αΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα είναι διαθέσιμα [86].

^βΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα δοκιμαστικά όρια αντοχής, που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder, για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα μπορούσαν να προσδιοριστούν. Για τα αντιμυκητικά AFG, MFG και CAS, οι WT-ULVs προσδιορίστηκαν βάση των στελεχών κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*.

Η ΕΑ εντός ±1 διαδοχικής διπλής αραιώσης ήταν χαμηλή για τα περισσότερα αντιμυκητικά, (13%-63%), με εξαίρεση τη 5FC (86%). Αντίθετα, η ΕΑ εντός ±2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν εξαιρετική για τα αντιμυκητικά AMB (94%) και 5FC (98%), καλή για τις αζόλες VRC (75%), ITC (77%), FLC (85%) και τις εχινοκανδίνες CAS (70%), MFG (84%), AFG (88%), ενώ ήταν χαμηλή για την POS (24%).

Συνολικά οι SYO MICs ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με τις CLSI MICs για όλα τα αντιμυκητικά (2-9 διπλάσιες αραιώσεις), με εξαίρεση την CAS (p >0,9), ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται, μεταξύ των μεθόδων, σημαντικά στατιστικές διαφορές (p <0,0001).

Παρόλο που όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB με τη μέθοδο CLSI, το 70% των στελεχών εμφάνισε ανθεκτικότητα σύμφωνα με τη μέθοδο SYO (30% CA, 70% MaE). Η εκτιμώμενη SYO AMB WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 8 mg/L (100% CA), ενώ οι κλαδο-ειδικές SYO AMB WT-ULVs ήταν 8 mg/L, 2 mg/L και 4 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα, αποδίδοντας 100% CA μεταξύ των δύο μεθόδων.

Όσον αφορά τις αζόλες, το 83-85% των στελεχών, ερμηνεύτηκε ως R στη FLC και με τις δύο μεθόδους, αποδίδοντας 96% CA (3% MaE, 1% VmE). Η πλειοψηφία των FLC MICs που προέκυψαν ήταν εκτός κλίμακας, και επομένως δεν ήταν αποδεκτές για την

εκτίμηση των WT-ULVs. Η εκτιμώμενη SYO WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 1 mg/L για τις αζόλες POS και ITC και 8 mg/L για τη VRC. Οι κλαδο-ειδικές SYO WT-ULVs για την POS/ITC/VRC ήταν 2/1/8 mg/L, 0,25/0,5/8 mg/L και 0,5/0,5/8 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα.

Εφαρμόζοντας τις SYO WT-ULVs, που προτείνονται στην παρούσα μελέτη, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 88% για την POS (12% MaE), 91% για την ITC (8% MaE, 1% VmE) και 88% για τη VRC (12% MaE). Υιοθετώντας τις κλαδο-ειδικές SYO WT-ULVs, η CA για την POS ήταν 85% (15% MaE), 96% (4% MaE) και 100%, για την ITC ήταν 98% (2% MaE), 96% (4% MaE) και 95% (5% VmE) και για τη VRC ήταν 79% (21% MaE), 96% (4% MaE), 100% για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για τις εχινοκανδίνες, η CA ήταν 98% (2% MaE) για την AFG, 99% (1% MaE) για τη MFG και 87% (12% MaE, 1% VmE) για την CAS. Η εκτιμώμενη SYO WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, για την AFG ήταν 2 mg/L, για τη MFG ήταν 0,5 mg/L και για την CAS ήταν 0,5 mg/L. Οι κλαδο-ειδικές SYO WT-ULVs για την AFG ήταν 0,25 mg/L για τα στελέχη κλάδου III, για τη MFG ήταν 0,125 mg/L και 0,25 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και IV, αντίστοιχα, και για την CAS ήταν 0,5 mg/L για τα στελέχη κλάδου IV.

Εφαρμόζοντας τις SYO WT-ULVs, που προτείνονται στην παρούσα μελέτη για τις εχινοκανδίνες, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 99% (1% MaE) για την AFG, 93% (7% MaE) για τη MFG και 87% (9% MaE, 4% VmE) για την CAS. Υιοθετώντας τις κλαδο-ειδικές SYO WT-ULVs, η CA για την AFG ήταν 98% (2% MaE), 100% και 100%, για τη MFG ήταν 85% (15% MaE), 87% (13% MaE) και 100% και για την CAS ήταν 77% (19% MaE, 4% VmE), 100% και 100% για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα.

Τέλος, η εκτιμώμενη SYO 5FC WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 0,25 mg/L (94% CA, 6% MaE). Στον προσδιορισμό WT-ULV δε συμπεριλήφθηκαν στελέχη που εμφάνισαν τιμή MIC $\leq 0,03$ mg/L. Η CA προκύπτει μεταξύ των δύο μεθόδων για τα στελέχη κλάδου I ήταν 96% (4% MaE) και 100% για τα στελέχη κλάδων III και IV.

Πίνακας 15. Κλαδο-ειδικά CLSI και SYO δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών *C. auris*.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Κλάδος	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)		% EA		CDC R BP (mg/L)	% CA (MaE, VmE) βάση CDC BP	SYO WT- ULV (mg/L) ^a	% CA (MaE, VmE) βάση SYO WT- ULV
		CLSI	SYO	±1	±2				
AMB	(I-V)	0,5 (0,25-1)	2 (0,5-8)	36	94	2	30 (70%, 0%)	8	100 (0%, 0%)
	I	1 (0,25-1)	4 (1-8)	30	91	2	6 (93%, 0%)	8	100 (0%, 0%)
	II	0,25 (0,25-0,5)	1 (1-1)	33	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-0,5)	1 (0,5-2)	52	91	2	78 (22%, 0%)	2	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,5-1)	2 (1-2)	32	100	2	23 (77%, 0%)	4	100 (0%, 0%)
	V	0,5 (0,5-1)	2 (1-2)	40	100	2	20 (80%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
FLC	(I-V)	>64 (4->64)	>256 (1->256)	27	85	32	96 (3%, 1%)	ΔΠ	ΔΠ
	I	>64 (4->64)	>256 (1->256)	28	68	32	94 (6%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	II	>64 (4->64)	8/64/128 (8-128)	100	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	III	>64 (>64->64)	>256 (256->256)	4	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	IV	>64 (8->64)	>256 (4->256)	36	100	32	95 (0%, 5%)	ΔΠ	ΔΠ
	V	4/>64 (4->64)	8/>256 (4->256)	40	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
POS	(I-V)	0,016 (0,002-0,125)	0,125 (0,016->8)	13	24			1	88 (12%, 0%)
	I	0,016 (0,004-0,125)	0,125 (0,016->8)	15	28			2	85 (15%, 0%)
	II	0,002/0,008/0,016 (0,002-0,016)	0,125 (0,03-0,125)	0	0			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,008/0,016 (0,008-0,06)	0,125 (0,125->8)	9	9	-	-	0,25	96 (4%, 0%)
	IV	0,016 (0,008-0,125)	0,125 (0,03-0,25)	14	36			0,5	100 (0%, 0%)
	V	0,004/0,03 (0,004-0,03)	0,06 (0,06-0,5)	20	20			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
VRC	(I-V)	0,5 / 1 (≤0,008->8)	4 (0,015->8)	50	75			8	88 (12%, 0%)
	I	0,5 (≤0,008->8)	1 (0,015->8)	47	66	-	-	8	79 (21%, 0%)
	II	0,125 (≤0,008-0,125)	0,03/0,5/1 (0,03-1)	0	67			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)

	III	1 (0,03-8)	4 (0,5->8)	35	74			8	96 (4%, 0%)
	IV	1/2/4 (0,03-4)	4 (0,03-8)	77	100			8	100 (0%, 0%)
	V	0,125 (0,03-0,5)	0,06 (0,06->8)	60	60			ΔΠ (8)	80 (20%, 0%)
ITC	(I-V)	0,125 (≤0,004-4)	0,25 (0,03->16)	63	77			1	91 (8%, 1%)
	I	0,06/0,125 (0,008-1)	0,25 (0,03->16)	51	66			1	98 (2%, 0%)
	II	0,125 (≤0,004-0,125)	0,25 (0,06-0,25)	67	67			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,125 (0,125-1)	0,25 (0,25->16)	70	91	-	-	0,5	96 (4%, 0%)
	IV	0,125 (0,03-4)	0,25 (0,125-0,5)	77	86			0,5	95 (0%, 5%)
	V	0,25 (0,06-0,25)	0,125/0,5 (0,125-0,5)	80	80			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,06 (≤0,016-8)	0,125 (0,125->8)	51	88	4	99 (1%, 0%)	2	99 (1%, 0%)
	I	0,06 (≤0,016-8)	0,125 (0,125->8)	42	77	4	98 (2%, 0%)	2	98 (2%, 0%)
	II	0,03 (≤0,016-0,03)	0,03 (0,03-0,06)	67	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	III	0,06 (0,03-0,06)	0,125 (0,125-0,25)	65	100	4	100 (0%, 0%)	0,25	100 (0%, 0%)
AFG ^γ	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,125 (0,125-0,25)	59	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	V	0,06 (≤0,016-0,06)	0,125/0,25 (0,06-0,25)	20	80	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,03 (≤0,016->8)	0,125 (0,03->8)	56	84	4	99 (1%, 0%)	8	93 (7%, 0%)
	I	0,03 (≤0,016->8)	0,25 (0,03->8)	36	74	4	98 (2%, 0%)	8	85 (15%, 0%)
	II	0,03 (0,03-0,03)	0,06 (0,06-0,125)	67	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	III	0,03 (0,03-0,06)	0,06 (0,06-0,25)	65	96	4	100 (0%, 0%)	0,125	87 (13%, 0%)
MFG ^γ	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,125 (0,06-0,125)	91	100	4	100 (0%, 0%)	0,25	100 (0%, 0%)
	V	0,03 (0,03-0,06)	0,25 (0,03-0,5)	40	40	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,5 (0,125->8)	0,125 (0,03->8)	43	70	2	87 (12%, 1%)	0,5	87 (9%, 4%)
	I	0,5 (0,125->8)	0,25 (0,06->8)	47	66	2	73 (25%, 2%)	0,5	77 (19%, 4%)
	II	0,5 (0,5-0,5)	0,06 (0,03-0,06)	0	0	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (0,5)	100 (0%, 0%)
CAS ^γ									

	III	0,5 (0,25-1)	0,125 (0,06-0,5)	30	65	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (0,5)	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,25-0,5)	0,125/0,25 (0,06-0,5)	54	91	2	100 (0%, 0%)	0,5	100 (0%, 0%)
	V	0,25/0,5 (0,25-1)	0,125 (0,06-0,25)	40	80	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (0,5)	80 (0%, 20%)
5FC ^β	(I-V)	0,125 (≤0,03-0,25)	0,125 (≤0,06->64)	86	98			0,25	94 (6%, 0%)
	I	0,06 (≤0,03-0,125)	≤0,06 (≤0,06->64)	81	96			0,25	96 (4%, 0%)
	II	0,06/0,125/0,25 (0,06-0,25)	0,125 (0,125-0,25)	100	100	-	-	ΔΠ (0,25)	100 (0%, 0%)
	III	0,06 (0,06-0,125)	0,125 (≤0,06-0,25)	96	100			0,25	100 (0%, 0%)
	IV	0,125 (≤0,03-0,25)	0,125 (≤0,06-0,25)	91	100			0,25	100 (0%, 0%)
	V	0,25 (0,125-0,25)	0,5 (0,125-1)	60	100			ΔΠ (0,25)	20 (80%, 0%)

^αΓια κλάδους με λίγα στελέχη ή κλάδους που δεν ήταν δυνατό να προσδιορισθεί WT-ULV (ΔΠ), χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV και παρουσιάζεται σε παρένθεση.

^βΓια τον προσδιορισμό WT-ULV δε συμπεριλήφθηκαν στελέχη που εμφάνισαν τιμή MIC ≤0,03 mg/L.

4.4 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και MTS

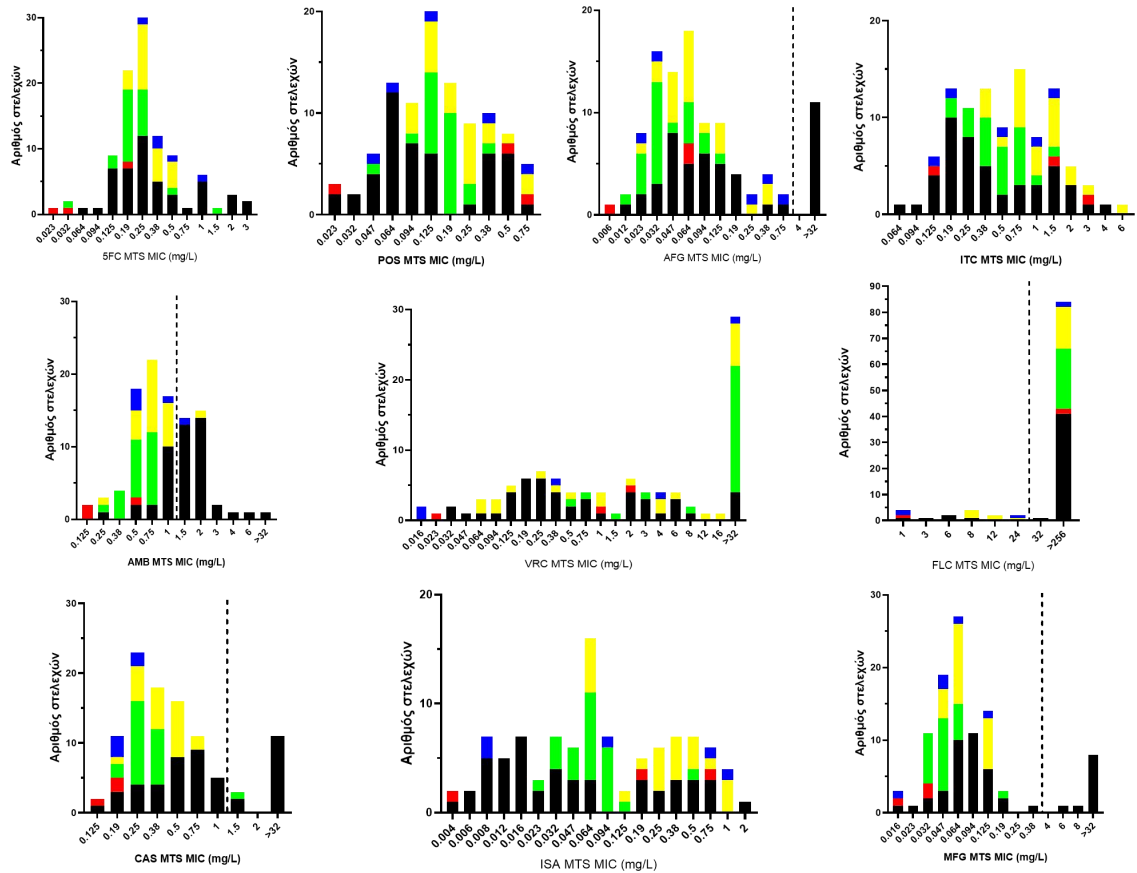
Η συμφωνία εντός ± 2 διπλάσιων αραιώσεων μεταξύ των παρατηρητών για τις τιμές MIC που ελήφθησαν με τη μέθοδο MTS για όλα τα αντιμυκητικά ήταν εξαιρετική (99%), καθώς και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ήταν 100% εντός ± 2 διπλάσιων αραιώσεων.

Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για την AMB, με τα στελέχη κλάδου II να εμφανίζουν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC (0,125 mg/L) σε σχέση με τα στελέχη κλάδου I (2 mg/L) και III - V (0,5-0,75 mg/L). Όλα τα στελέχη κλάδου II και III, και το 80-95% των στελεχών κλάδου IV και V ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, ενώ το ποσοστό ανθεκτικότητας για τα στελέχη κλάδου I ήταν 68%.

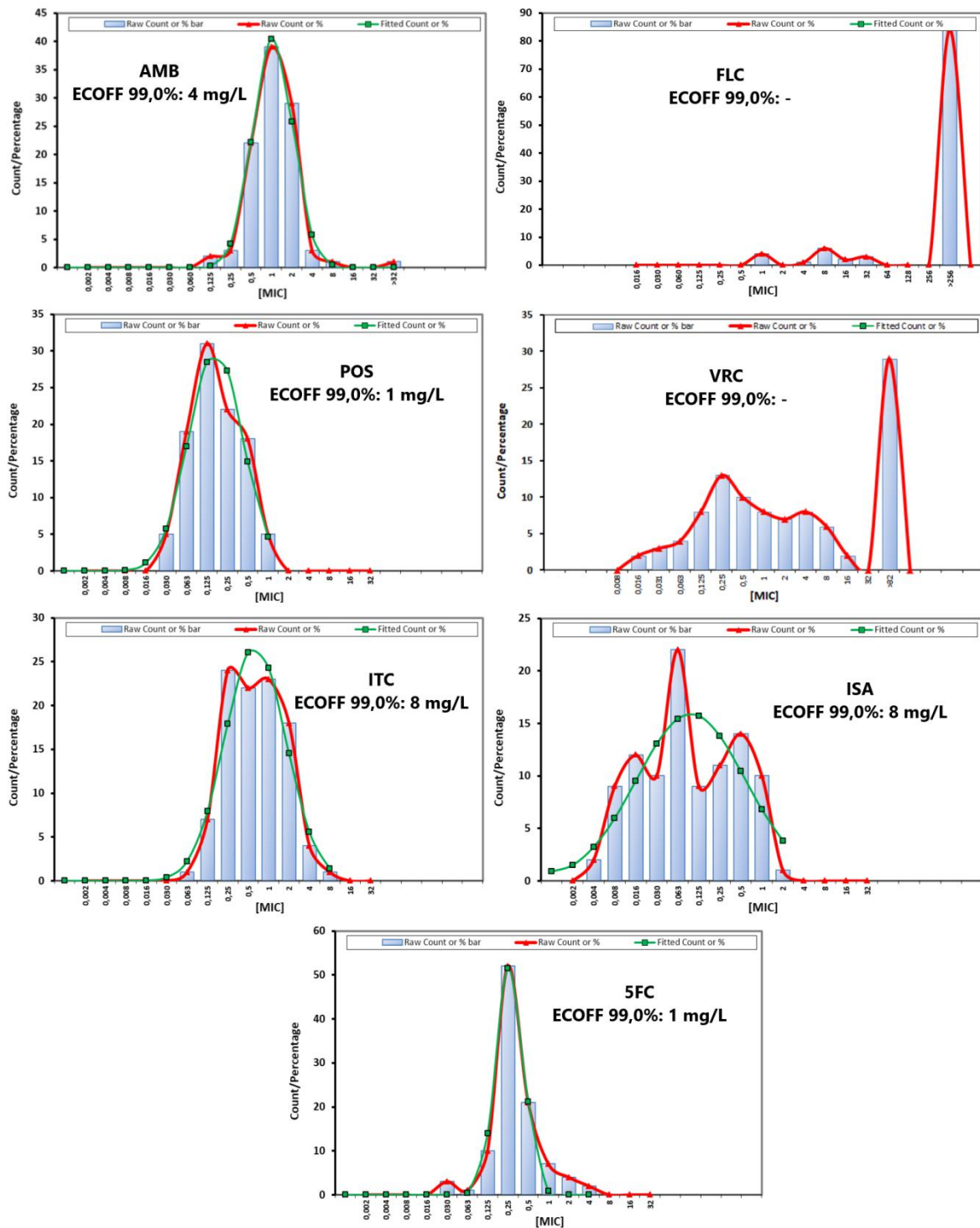
Όσον αφορά τις αζόλες, το εύρος κατανομής των τιμών MIC ήταν διευρυμένο και κάλυπτε τις 6 διπλάσιες αραιώσεις για FLC και POS, τις 8-10 για ITC και ISA και τις 12 για VRC, καθώς επίσης παρατηρήθηκαν και κλαδο-ειδικές διαφορές. Τα ποσοστά ανοχής στη FLC κυμαίνονταν από 60% και 67% για τα στελέχη κλάδου V και II, αντίστοιχα, έως 77%, 89% και 100% για τα στελέχη κλάδου IV, I και III, αντίστοιχα. Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για τα αντιμυκητικά VRC και ISA. Συγκεκριμένα για τη VRC, τα στελέχη των κλάδων I και V εμφάνισαν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC από τα στελέχη κλάδου III και IV (0,19-0,25 και 0,016 έναντι >32 mg/L, αντίστοιχα). Σχετικά με την ISA, τα στελέχη κλάδου I εμφάνισαν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC από τα στελέχη κλάδου III και IV (0,016 έναντι 0,064 mg/L, αντίστοιχα).

Σχετικά με τις εχινοκανδίνες, τα εύρη τιμών MIC που ελήφθησαν ήταν στενότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιμυκητικά (6-8 διπλάσιες αραιώσεις). Όλα τα στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*, ήταν R στις AFG, MFG και CAS και παρουσίασαν διασταυρούμενη ανοχή στη FLC (9/9, 100%), ενώ ένα ποσοστό (7/9, 78%) εμφάνισε μειωμένη ευαισθησία στην AMB.

Τέλος, τα περισσότερα στελέχη (87/100) εμφάνισαν χαμηλές τιμές MIC για το αντιμυκητικό 5FC (επικρατούσα τιμή MIC $\leq 0,38$ mg/L).



Εικόνα 45. Κατανομές MTS MICs των στελεχών *C. auris* ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris* [86].



Εικόνα 46. Τιμές MTS WT-ULV των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη *C. auris* ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και VRC WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικλήθηκε στο άνω άκρο της.

Πίνακας 16. Προφίλ *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris* (n=100) με την εμπορική μέθοδο MTS.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	CDC R BP (mg/L)	% αντοχή ^α	MTS WT-ULVs (mg/L)	% αντοχή ^β
AMB	0,75 (0,125->32)	0,75/1,5	2	34	4	2
FLC	0,25 (1->256)	>256/>256	32	83	ΔΠ	ΔΠ
POS	0,125 (0,023-0,75)	0,125/0,38	-	-	1	0
VRC	>32 (0,016->32)	2/>32	-	-	ΔΠ	ΔΠ
ITC	0,75 (0,064-6)	0,38/2	-	-	8	0
ISA	0,064 (0,004-2)	0,064/1	-	-	8	0
AFG	0,064 (0,064->32)	0,064/>32	4	11	32	11
MFG	0,064 (0,016->32)	0,064/0,38	4	10	4	10
CAS	0,25 (0,125->32)	0,5/>32	2	10	32	11
5FC	0,25 (0,023-3)	0,25/1	-	-	1	6

^αΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα είναι διαθέσιμα [86].

^βΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα δοκιμαστικά όρια αντοχής, που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder, για όσους συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα μπορούσαν να προσδιοριστούν.

Η ΕΑ εντός $\pm 1/\pm 2$ διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν υψηλή για το αντιμυκητικό AMB (85%/96%), καλή για τις εχινοκανδίνες AFG (68%/79%), MFG (77%/91%), CAS (72%/85%), μέτρια για την ISA (59%/82%) και χαμηλή για τις αζόλες VRC (31%/52%), ITC (20%/52%), FLC (11%/79%), POS (3%/21%) και τη 5FC (37%/69%).

Συνολικά οι MTS MICs ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με τις CLSI MICs για όλα τα αντιμυκητικά (2-6 διπλάσιες αραιώσεις), με εξαίρεση τις εχινοκανδίνες ($p = 0,1049-0,4338$), ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται, μεταξύ των μεθόδων, σημαντικά στατιστικές διαφορές ($p < 0,0001$).

Παρόλο που όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB με τη μέθοδο CLSI, το 34% των στελεχών κατατάχθηκε ως ανθεκτικό με τη μέθοδο MTS (66% CA, 34% MaE). Η εκτιμώμενη MTS AMB WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 4 mg/L (98% CA, 2% MaE). Οι κλαδο-ειδικές MTS AMB WT-ULVs ήταν 4 mg/L για τα στελέχη κλάδου I (96% CA, 4% MaE) και 2 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και IV (100% CA).

Όσον αφορά τις αζόλες, το 83% των στελεχών ερμηνεύτηκε ως R στη FLC, τόσο με τη μέθοδο CLSI, όσο και με τη MTS, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 98% (1% MaE, 1% VmE). Η εκτιμώμενη MTS WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 1 mg/L για την POS (100% CA) και 8 mg/L για τις αζόλες ITC και ISA (100% CA). Οι κλαδο-ειδικές MTS

WT-ULVs για την POS ήταν 0,25 mg/L, 0,5 mg/L και 0,5 mg/L, για την ITC ήταν 1 mg/L, 2 mg/L και 4 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα, ενώ για την ISA ήταν 0,125 mg/L για τα στελέχη κλάδου I και 0,25 mg/L για τα στελέχη κλάδου III. Η CA που αποδίδεται μεταξύ των δύο μεθόδων για την POS ήταν 72% (28% MaE), 100% και 91% (9% MaE), για την ITC ήταν 79% (21% MaE), 100% και 96% (4% MaE) και για την ISA ήταν 81% (19% MaE), 96% (4% MaE) και 100%, για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι κατανομές των τιμών MIC για τα αντιμυκητικά FLC και VRC περικόπηκαν στο ανώτερο άκρο, εντός του πιθανού WT πληθυσμού και επομένως δεν είναι δυνατή η εκτίμηση των WT-ULVs.

Σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για τις εχινοκανδίνες, η CA ήταν 97% (3% MaE) για την AFG, 99% (1% MaE) για τη MFG και 95% (5% MaE) για την CAS. Η εκτιμώμενη MTS WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 32 mg/L για τις εχινοκανδίνες AFG και CAS και 4 mg/L για τη MFG. Οι κλαδο-ειδικές MTS WT-ULVs για την AFG και τη MFG ήταν 0,5 mg/L, 0,06 mg/L και 0,125 mg/L και για την CAS ήταν 4 mg/L, 0,5 mg/L και 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα.

Εφαρμόζοντας τις MTS WT-ULVs, που προτείνονται στην παρούσα μελέτη, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 89% (11% MaE) για την AFG, 99% (1% MaE) για τη MFG και 89% (11% MaE) για την CAS. Υιοθετώντας τις κλαδο-ειδικές SYO WT-ULVs, η CA για την AFG ήταν 77% (23% MaE), 87% (13% MaE) και 86% (14% MaE), για τη MFG ήταν 98% (2% MaE), 96% (4% MaE) και 100% και για την CAS ήταν 77% (23% MaE), 96% (4% MaE) και 100% για τα στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα.

Τέλος, η εκτιμώμενη MTS 5FC WT-ULV, ανεξαρτήτως κλάδου, ήταν 1 mg/L (94% CA, 6% MaE), ενώ οι κλαδο-ειδικές WT-ULVs ήταν 1 mg/L για τα στελέχη κλάδου I (89% CA, 11% MaE) και 0,5 mg/L για τα στελέχη κλάδου III και IV (100% CA).

Πίνακας 17. Κλαδο-ειδικά CLSI και MTS δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών *C. auris*.

Αντιμυκητικό	Κλάδος	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)		% EA		CDC R BP (mg/L)	% CA (MaE, VmE) βάση CDC BP	MTS WT- ULV (mg/L) ^a	% CA (% σφάλμα) βάση MTS WT- ULV
		CLSI	MTS	±1	±2				
AMB	(I-V)	0,5 (0,25-1)	0,75 (0,125->32)	85	96	2	66 (34%, 0%)	4	98 (2%, 0%)
	I	1 (0,25-1)	2 (0,25->32)	72	91	2	32 (68%, 0%)	4	96 (4%, 0%)
	II	0,25 (0,25-0,5)	0,125 (0,125-0,5)	67	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (4)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-0,5)	0,75 (0,25-0,75)	83	100	2	100 (0%, 0%)	2	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,5-1)	0,75 (0,25-2)	95	100	2	98 (2%, 0%)	2	100 (0%, 0%)
	V	0,5 (0,5-1)	0,5 (0,5-1,5)	80	100	2	80 (20%, 0%)	ΔΠ (4)	100 (0%, 0%)
FLC	(I-V)	>64 (4->64)	>256 (1->256)	11	79	32	98 (1%, 1%)	ΔΠ	ΔΠ
	I	>64 (4->64)	>256 (1->256)	8	60	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	II	>64 (4->64)	>256 (1->256)	0	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	III	>64 (>64->64)	>256 (>256->256)	0	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
	IV	>64 (8->64)	>256 (8->256)	27	91	32	92 (4%, 4%)	ΔΠ	ΔΠ
	V	4/>64 (4->64)	1/>256 (1->256)	20	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ	ΔΠ
POS	(I-V)	0,016 (0,002-0,125)	0,125 (0,023-0,75)					1	100 (0%, 0%)
	I	0,016 (0,004-0,125)	0,064 (0,023-0,75)	3	21			0,25	72 (28%, 0%)
	II	0,002/0,008/0,016 (0,002-0,016)	0,023/0,5/0,75 (0,023-0,75)	0	0	-	-	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,008/0,016 (0,008-0,06)	0,19 (0,047-0,38)	0	9			0,5	100 (0%, 0%)
	IV	0,016 (0,008-0,125)	0,25 (0,094-0,75)	0	14			0,5	91 (9%, 0%)
	V	0,004/0,03 (0,004-0,03)	0,047/0,064/0,125/0,38/0,75 (0,047-0,75)	0	20			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
VRC	(I-V)	0,5 / 1 (≤0,008->8)	>32 (0,016->32)	31	52			ΔΠ	ΔΠ
	I	0,5 (≤0,008->8)	0,19/0,25 (0,032->32)	40	70	-	-	ΔΠ	ΔΠ
	II	0,125 (≤0,008-0,125)	0,023/1/2 (0,023-2)	0	33			ΔΠ	ΔΠ

	III	1 (0,03-8)	>32 (0,5->32)	9	13			ΔΠ	ΔΠ
	IV	1/2/4 (0,03-4)	>32 (0,064->32)	41	55			ΔΠ	ΔΠ
	V	0,125 (0,03-0,5)	0,016 (0,016->32)	20	60			ΔΠ	ΔΠ
	(I-V)	0,125 (≤0,004-4)	0,75 (0,064-6)	20	52			8	100 (0%, 0%)
	I	0,06/0,125 (0,008-1)	0,19 (0,064-4)	23	51			1	79 (21%, 0%)
ITC	II	0,125 (≤0,004-0,125)	0,125/1,5/3 (0,125-3)	0	0			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	III	0,125 (0,125-1)	0,75 (0,19-1,5)	26	74	-	-	2	100 (0%, 0%)
	IV	0,125 (0,03-4)	0,75 (0,38-6)	4	32			4	96 (4%, 0%)
	V	0,25 (0,06-0,25)	0,125/0,19/0,5/1/1,5 (0,125-1,5)	40	60			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,03 (≤0,008-0,5)	0,064 (0,04-2)	59	82			8	100 (0%, 0%)
	I	≤0,008 (≤0,008-0,5)	0,016 (0,004-2)	62	81			0,125	81 (19%, 0%)
ISA	II	≤0,008/0,125/0,25 (≤0,008-0,25)	0,004/0,19/0,75 (0,004-0,75)	67	100			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	III	0,03 (0,016-0,06)	0,064 (0,023-0,5)	61	91	-	-	0,25	96 (4%, 0%)
	IV	0,125 (≤0,008-0,5)	0,064 (0,064-1)	54	82			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	V	≤0,008 (≤0,008-0,25)	0,008 (0,008-1)	40	40			ΔΠ (8)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,06 (≤0,016-8)	0,064 (0,006->32)	68	79	4	97 (3%, 0%)	32	89 (11%, 0%)
	I	0,06 (≤0,016-8)	>32 (0,012->32)	49	62	4	94 (6%, 0%)	32	77 (23%, 0%)
AFG	II	0,03 (≤0,016-0,03)	0,064 (0,006-0,064)	33	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (32)	100 (0%, 0%)
	III	0,06 (0,03-0,06)	0,032 (0,012-0,125)	96	100	4	100 (0%, 0%)	0,06	87 (13%, 0%)
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,064 (0,023-0,38)	86	91	4	100 (0%, 0%)	0,125	86 (14%, 0%)
	V	0,06 (≤0,016-0,06)	0,023/0,032/0,25/0,38/ 0,75 (0,023-0,75)	80	80	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (32)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,03 (≤0,016->8)	0,064 (0,016->32)	77	91	4	99 (1%, 0%)	4	99 (1%, 0%)
MFG	I	0,03 (≤0,016->8)	0,094 (0,016->32)	55	81	4	98 (2%, 0%)	4	98 (2%, 0%)
	II	0,03 (0,03-0,03)	0,032 (0,016-0,032)	100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (4)	100 (0%, 0%)

CAS	III	0,03 (0,03-0,06)	0,047 (0,032-0,19)	96	100	4	100 (0%, 0%)	0,06	96 (4%, 0%)
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,064 (0,047-0,125)	100	100	4	100 (0%, 0%)	0,125	100 (0%, 0%)
	V	0,03 (0,03-0,06)	0,047 (0,016-0,125)	80	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (4)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,5 (0,125->8)	0,25 (0,125->32)	72	85	2	95 (5%, 0%)	32	89 (11%, 0%)
	I	0,5 (0,125->8)	>32 (0,125->32)	51	68	2	92 (8%, 0%)	32	77 (23%, 0%)
	II	0,5 (0,5-0,5)	0,19 (0,125-0,19)	67	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (32)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-1)	0,25 (0,19-1,5)	91	100	2	96 (4%, 0%)	0,5	96 (4%, 0%)
	IV	0,5 (0,25-0,5)	0,5 (0,19-0,75)	95	100	2	100 (0%, 0%)	1	100 (0%, 0%)
	V	0,25/0,5 (0,25-1)	0,19 (0,19-0,25)	80	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (32)	100 (0%, 0%)
	(I-V)	0,125 (≤0,03-0,25)	0,25 (0,023-3)	37	69			1	94 (6%, 0%)
5FC	I	0,06 (≤0,03-0,125)	0,25 (0,064-3)	8	42			1	89 (11%, 0%)
	II	0,06/0,125/0,25 (0,06-0,25)	0,023/0,032/0,19 (0,023-0,19)	67	100	-	-	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	III	0,06 (0,06-0,125)	0,19 (0,032-1,5)	56	91			0,5	100 (0%, 0%)
	IV	0,125 (≤0,03-0,25)	0,25 (0,19-0,5)	64	95			0,5	100 (0%, 0%)
	V	0,25 (0,125-0,25)	0,38 (0,25-1)	80	80			ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)

^aΓια κλάδους με λίγα στελέχη ή κλάδους που δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί WT-ULV (ΔΠ), χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV και παρουσιάζεται σε παρένθεση.

4.5 Συγκριτική αξιολόγηση CLSI BMD και Vitek 2

Τα αποτελέσματα των τιμών MIC με τη μέθοδο Vitek 2 ελήφθησαν μετά από 12,2 έως 18,7 ώρες επώασης (μέσος χρόνος μέχρι την ανάγνωση 14,6 ώρες).

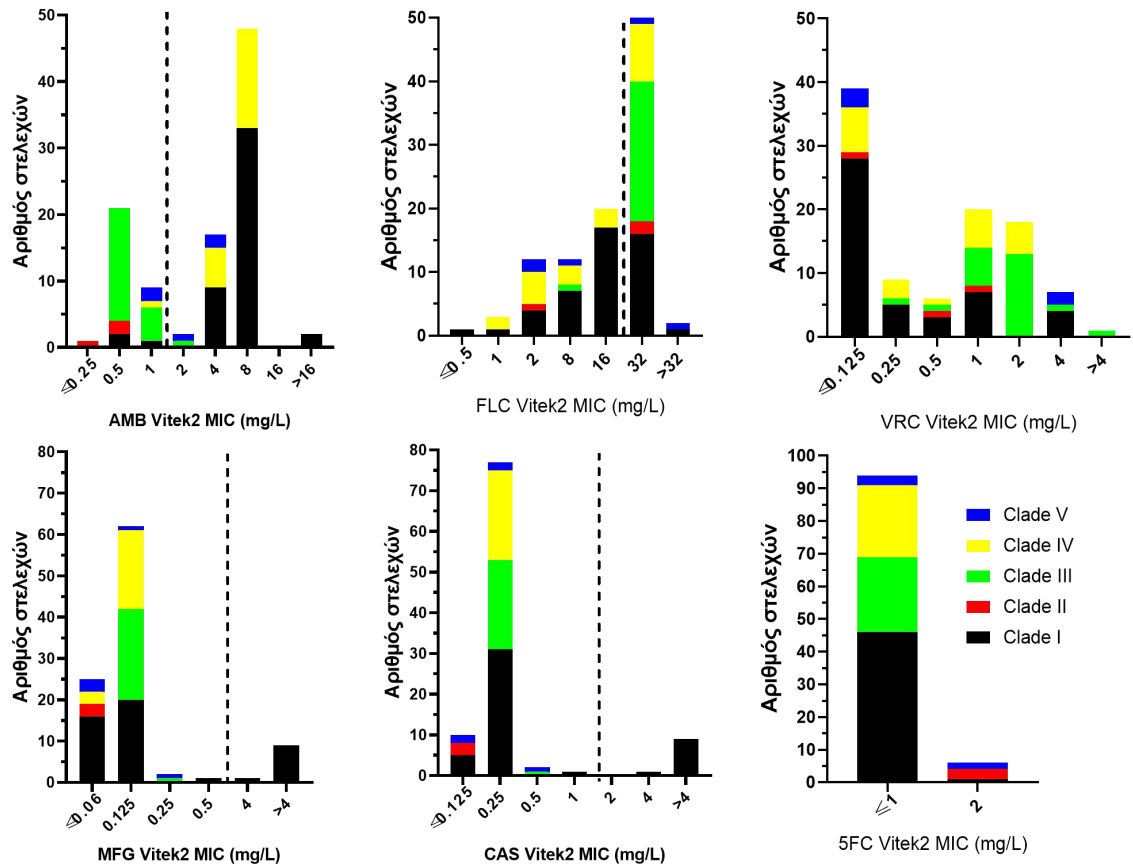
Η απόλυτη συμφωνία, η συμφωνία εντός ± 1 και ± 2 διπλάσιων αραιώσεων των επαναλήψεων για τις τιμές MIC που ελήφθησαν με τη μέθοδο Vitek 2 όλων των αντιμυκητικών, ήταν εξαιρετική 77%, 90% και 100%, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η CA μεταξύ των επαναλήψεων ήταν άριστη για τα αντιμυκητικά MFG 100%, CAS 100% και AMB 95%, ενώ για τη FLU ήταν 70%. Οι τιμές MIC για τα στελέχη ποιοτικού ελέγχου βρίσκονταν εντός των ορίων αναφοράς.

Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για την AMB, με τα στελέχη κλάδου II και III να εμφανίζουν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC (0,5 mg/L) σε σχέση με τα στελέχη κλάδου I και IV (8 mg/L) και κλάδου V (1-4 mg/l). Έτσι, όλα τα στελέχη κλάδου II και το 96% των στελεχών κλάδου III ερμηνεύτηκαν ως ευαίσθητα στην AMB (MIC \leq 0,5 mg/L), ενώ το ποσοστό ανθεκτικότητας για τα στελέχη κλάδου I, IV και V ήταν 94%, 95% και 60%, αντίστοιχα.

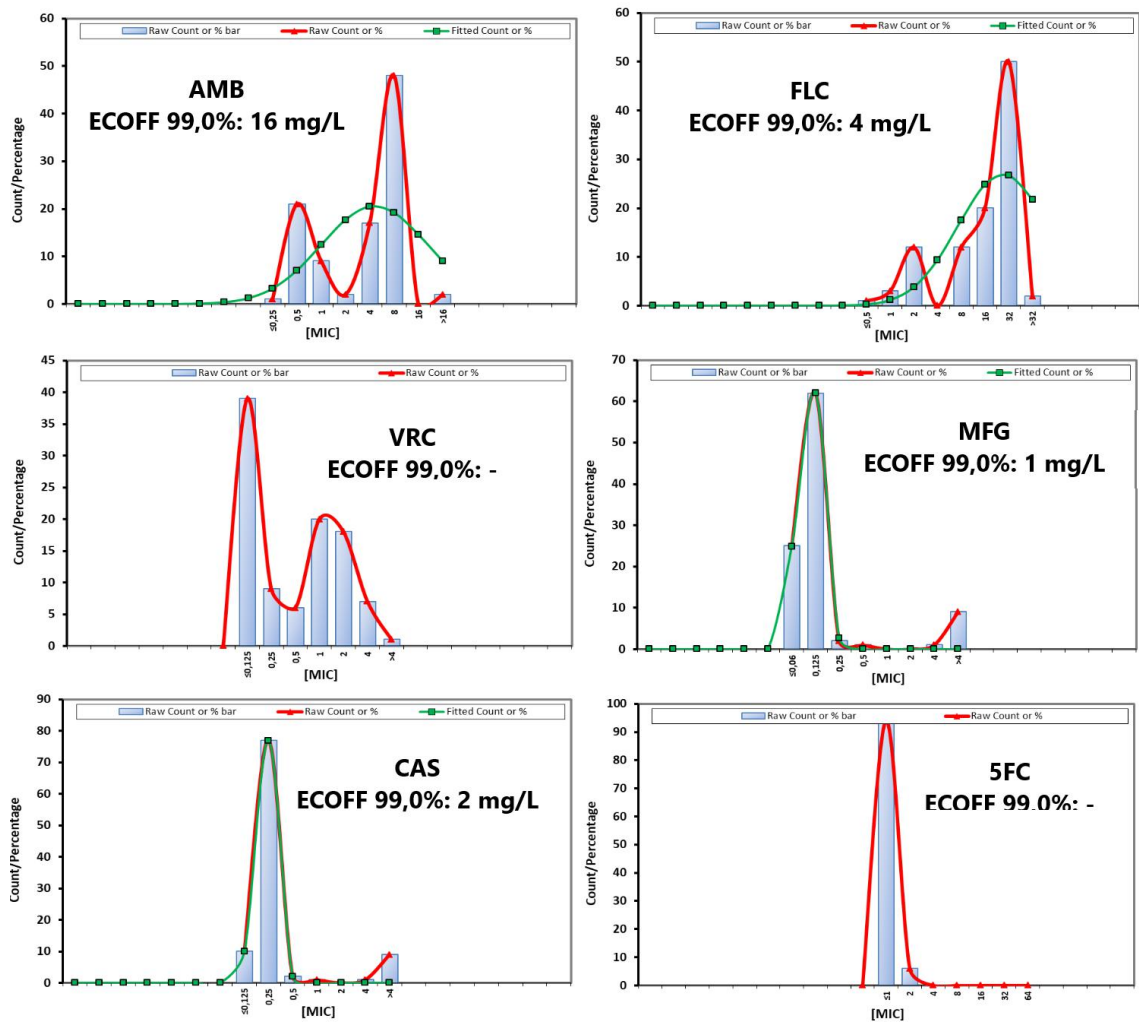
Όσον αφορά τις αζόλες, το εύρος κατανομής των τιμών MIC ήταν διευρυμένο και κάλυπτε τις 8 διπλάσιες αραιώσεις, καθώς επίσης παρατηρήθηκαν και κλαδο-ειδικές διαφορές. Τα ποσοστά ανοχής στη FLC κυμαίνονταν από 36%, 41% και 40% για τα στελέχη κλάδων I, IV και V, αντίστοιχα, έως 66% και 96% για τα στελέχη κλάδων II και III, αντίστοιχα. Βρέθηκαν κλαδο-ειδικές κατανομές MICs για το αντιμυκητικό VRC, με τα στελέχη του κλάδου I να εμφανίζουν χαμηλότερη επικρατούσα τιμή MIC από τα στελέχη κλάδου III (\leq 0,125 έναντι 2 mg/L, αντίστοιχα).

Όσον αφορά τις εχινοκανδίνες, τα εύρη τιμών MIC που ελήφθησαν ήταν στενά (4 διπλάσιες αραιώσεις), εκτός από τα στελέχη με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*. Όλα τα στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*, ήταν ανθεκτικά στη MFG και στη CAS και παρουσίασαν διασταυρούμενη ανοχή στην AMB (9/9, 100%), ενώ ένα ποσοστό (4/9, 44%) εμφάνισε μειωμένη ευαισθησία στη FLC.

Τέλος, τα περισσότερα στελέχη (94/100) παρουσίασαν χαμηλές τιμές MIC για το αντιμυκητικό 5FC εκτός κλίμακας (επικρατούσα τιμή MIC \leq 1 mg/L).



Εικόνα 47. Κατανομές Vitek2 MICs των στελεχών *C. auris* ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την *C. auris* [86].



Εικόνα 48. Τιμές Vitek 2 WT-ULV των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη *C. auris* ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και VRC WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περιόριστηκε στο άνω άκρο της.

Πίνακας 18. Προφίλ *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris* (n=100) με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Vitek 2.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (mg/L)	CDC R BP (mg/L)	% αντοχή ^α	Vitek 2 WT-ULV (mg/L)	% αντοχή ^β
AMB	8 (≤0,25->16)	4/8	2	69	16	2
FLC	32 (≤0,5->32)	32/32	32	52	4	84
VRC	≤0,125 (≤0,125-4)	0,5/2	-	-	ΔΠ	ΔΠ
MFG	0,125 (≤0,06-4)	0,125/0,5	4	10	1	10
CAS	0,25 (≤0,125-4)	0,25/1	2	10	2	10
5FC	≤1 (≤1-2)	≤1/≤1	-	-	ΔΠ	ΔΠ

^αΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για όσους συνδυασμούς *C. auris* – αντιμυκητικού παράγοντα είναι διαθέσιμα [86].

^βΗ αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα δοκιμαστικά όρια αντοχής που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder για όσου συνδυασμούς *C. auris* - αντιμυκητικού παράγοντα μπορούσαν να εκτιμηθούν.

Η ΕΑ εντός ±1 διαδοχικής διπλής αραιώσης ήταν χαμηλή για το αντιμυκητικό AMB (29%), ενώ ελαφρώς μεγαλύτερη ήταν η ΕΑ εντός ±2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων (40%). Συγκρίνοντας τις τιμές MIC που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές ($p < 0,0001$), που οφείλονται στη μετατόπιση της κατανομής Vitek 2 MIC (≤0,25 - >16) κατά μέσο όρο 3 διπλάσιες αραιώσεις υψηλότερα από την κατανομή CLSI MIC (0,25 - 1). Παρόλο που όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB με τη μέθοδο CLSI, το 69% των στελεχών κατατάχθηκε ως ανθεκτικό σύμφωνα με τη μέθοδο Vitek 2 (31% CA, 69% MaE).

Καθώς η κατανομή Vitek 2 MIC για το αντιμυκητικό AMB ήταν δικόρυφη, προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα ECOFFinder δύο κλαδο-ειδικές WT-ULVs, η μία στα 2 mg/L για τα στελέχη κλάδου II και III και η άλλη στα 16 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, IV και V. Σύμφωνα με αυτές τις WT-ULVs, οι αποκλίσεις ελαχιστοποιήθηκαν, αποδίδοντας 98% CA (2% MaE). Καθώς μέχρι στιγμής δεν είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες σχετικά με την κλαδο-ειδική ευαισθησία για τις AFST, αυτό που θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως WT-ULV είναι τα 16 mg/L, ανεξαρτήτως κλάδου, με την επιφύλαξη ότι μπορεί να «χαθούν» ορισμένα στελέχη κλάδου II και III με τιμές MIC 4-16 mg/L.

Σχετικά με τη FLC, η ΕΑ εντός ±1 διαδοχικής διπλής αραιώσης ήταν χαμηλή (16%), ενώ μεγαλύτερη ήταν η ΕΑ εντός ±2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων (78%). Οι τιμές MIC

που ελήφθησαν μεταξύ των δύο μεθόδων παρουσίασαν σημαντικά στατιστικές διαφορές ($p < 0,0001$) που οφείλονταν στη μετατόπιση της κατανομής Vitek 2 MIC ($\leq 0,5 - > 32$) κατά μέσο όρο 2 διπλάσιες αραιώσεις υψηλότερα από την κατανομή CLSI MIC (4 - > 64). Καταγράφηκαν αξιοσημείωτες ερμηνευτικές αποκλίσεις, καθώς το 83% των στελεχών ερμηνεύτηκε ως R στη FLC με τη μέθοδο CLSI, ενώ μόνο το 52% των στελεχών εμφάνισε αντοχή με τη μέθοδο Vitek 2 (69% CA, 31% VmE).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παραπάνω ψευδής ευαισθησία αφορά στελέχη που ανήκουν σε συγκεκριμένους κλάδους. Ειδικότερα, κανένα από τα R στη FLC στελέχη των κλάδων II και V δεν κατηγοριοποιήθηκε εσφαλμένα ως non-R στη FLC σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (MIC ≥ 32 mg/L). Αντιθέτως, 22/39 (56% VmE), 1/23 (4% VmE) και 8/17 (47% VmE) στελέχη κλάδου I, III και IV, αντίστοιχα, ερμηνεύτηκαν εσφαλμένα ως non-R στη FLC. Ωστόσο, εφαρμόζοντας μία ειδική για το Vitek 2 WT-ULV των 4 mg/L, ανεξαρτήτως κλάδου, η CA αυξάνεται σε 96% (1% MaE, 3% VmE). Σημειωτέον, η CA για τα στελέχη του κλάδου V θα ήταν υψηλότερη εφαρμόζοντας ως WT-ULV τα 8 mg/L (100% CA έναντι 80%).

Από την άλλη μεριά, η EA εντός ± 1 διαδοχικής διπλής αραιώσης για τις εχινοκανδίνες MFG (67%) και CAS (81%) ήταν μέτρια και εξαιρετική εντός ± 2 διαδοχικών διπλών αραιώσεων, 97% και 100%, αντίστοιχα. Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους για τις εχινοκανδίνες δεν παρουσίασαν σημαντικά στατιστικές διαφορές (MFG: $p > 0,7$, CAS: $p < 0,0001$). Ένα στέλεχος ταξινομήθηκε λανθασμένα ως R τόσο στη MFG, όσο και στην CAS με τη μέθοδο Vitek 2 (99% CA, 1% MaE).

Η εκτιμώμενη Vitek 2 WT-ULV που περιλαμβάνει $> 99\%$ των στελεχών ήταν 1 mg/L για τη MFG και 2 mg/L για την CAS (99% CA, 1% MaE). Οι κλαδο-ειδικές WT-ULVs για τις εχινοκανδίνες MFG/CAS ήταν 1/2 mg/L, 1/2 mg/L και 0,5/2 mg/L για τα στελέχη κλάδου I, III και V, αντίστοιχα. Οι τιμές MIC που προέκυψαν με τη μέθοδο Vitek 2 για τις εχινοκανδίνες από στελέχη κλάδου II ήταν εκτός κλίμακας, ομοίως και τα στελέχη του κλάδου IV και επομένως δεν ήταν αποδεκτές για την εκτίμηση των WT-ULVs.

Σχετικά με τη 5FC, η EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν χαμηλή (0%/3%). Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ($p < 0,0001$), που οφείλονταν στο ότι η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών (94%), με τη μέθοδο Vitek 2, εντοπίζονταν στο κατώτερο άκρο της κατανομής των τιμών MIC. Αντίθετα, η EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν μέτρια για το αντιμυκητικό VRC (61%/86%). Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους δεν

παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ($p = 0,97$), παρόλα αυτά το 40% των στελεχών, με τη μέθοδο Vitek 2, εντοπιζόταν στο κατώτερο άκρο της κατανομής των τιμών MIC.

Οι κατανομές των τιμών MIC για τα αντιμυκητικά 5FC και VRC περικόπηκαν στο κατώτερο άκρο, εντός του πιθανού WT πληθυσμού και επομένως δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση των WT-ULVs.

Πίνακας 19. Κλαδο-ειδικά CLSI και Vitek 2 δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών *C. auris*.

Αντιμυκητικό	Κλάδος	Επικρατούσα τιμή (εύρος) MIC (mg/L)		% EA		CDC R BP (mg/L)	% CA (MaE, VmE) βάση CDC BP	Vitek 2 WT-ULV (mg/L) ^a	% CA (% σφάλμα) βάση Vitek 2 WT-ULV
		CLSI	Vitek 2	±1	±2				
AMB	(I-V)	0,5 (0,25-1)	8 (≤0,25->16)	29	40	2	31 (69%, 0%)	16	98 (2%, 0%)
	I	1 (0,25-1)	8 (0,5->16)	6	19	2	6 (94%, 0%)	16	96 (4%, 0%)
	II	0,25 (0,25-0,5)	0,5 (≤0,25-0,5)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2) ^β	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-0,5)	0,5 (0,5-2)	87	100	2	96 (4%, 0%)	2 ^β	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,5-1)	8 (1-8)	5	5	2	4 (96%, 0%)	16	100 (0%, 0%)
	V	0,5 (0,5-1)	1/4 (1-4)	40	80	2	40 (60%, 0%)	ΔΠ (16)	100 (0%, 0%)
FLC	(I-V)	>64 (4->64)	32 (≤0,5->32)	16	78	32	69 (0%, 31%)	4	96 (1%, 3%)
	I	>64 (4->64)	16 (≤0,5->32)	26	79	32	53 (0%, 47%)	4	98 (0%, 2%)
	II	>64 (4->64)	32 (2-32)	33	100	32	100 (0%, 0%)	ΔΠ (4)	100 (0%, 0%)
	III	>64 (>64->64)	32 (8-32)	0	96	32	96 (0%, 4%)	4	100 (0%, 0%)
	IV	>64 (8->64)	32 (1-32)	0	55	32	64 (0%, 36%)	4	91 (0%, 9%)
	V	4/>64 (4->64)	2 (2->32)	60	80	32	100 (0%, 0%)	8 ^γ	100 (0%, 0%)
VRC	(I-V)	0,5 / 1 (≤0,008->8)	≤0,125 (≤0,125->4)	61	86			ΔΠ	ΔΠ
	I	0,5 (≤0,008->8)	≤0,125 (≤0,125-4)	57	87			ΔΠ	ΔΠ
	II	0,125 (≤0,008-0,125)	≤0,125/0,5/1 (≤0,125-1)	0	33			ΔΠ	ΔΠ
	III	1 (0,03-8)	2 (0,25->4)	70	83	-	-	ΔΠ	ΔΠ
	IV	1/2/4 (0,03-4)	≤0,125 (≤0,125-2)	73	100			ΔΠ	ΔΠ
	V	0,125 (0,03-0,5)	≤0,125 (≤0,125-2)	40	60			ΔΠ	ΔΠ
MFG	(I-V)	0,03 (≤0,016->8)	0,125 (≤0,06->4)	67	97	4	99 (1%, 0%)	1	99 (1%, 0%)
	I	0,03 (≤0,016->8)	0,125 (≤0,06->4)	70	96	4	98 (2%, 0%)	1	98 (2%, 0%)
	II	0,03 (0,03-0,03)	≤0,06 (≤0,06-≤0,06)	100	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)

	III	0,03 (0,03-0,06)	0,125 (0,125-0,25)	30	96	4	100 (0%, 0%)	1	100 (0%, 0%)
	IV	0,06 (0,03-0,06)	0,125 (\leq 0,06-0,125)	91	100	4	100 (0%, 0%)	ΔΠ (1)	100 (0%, 0%)
	V	0,03 (0,03-0,06)		80	100	4	100 (0%, 0%)	0,5 ^δ	100 (0%, 0%)
CAS	(I-V)	0,5 (0,125->8)	0,25 (\leq 0,125->4)	81	100	2	99 (1%, 0%)	2	99 (1%, 0%)
	I	0,5 (0,125->8)	0,25 (\leq 0,125->4)	72	100	2	98 (2%, 0%)	2	98 (2%, 0%)
	II	0,5 (0,5-0,5)	\leq 0,125 (\leq 0,125- \leq 0,125)	0	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	III	0,5 (0,25-1)	0,25 (0,25-0,5)	96	100	2	100 (0%, 0%)	2	100 (0%, 0%)
	IV	0,5 (0,25-0,5)	0,25 (0,25-0,25)	100	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
	V	0,25/0,5 (0,25-1)	\leq 0,125/0,25 (\leq 0,125-0,5)	60	100	2	100 (0%, 0%)	ΔΠ (2)	100 (0%, 0%)
5FC	(I-V)	0,125 (\leq 0,03-0,25)	\leq 1 (\leq 1-2)	0	3			ΔΠ	ΔΠ
	I	0,06 (\leq 0,03-0,125)	\leq 1 (\leq 1-2)	0	0			ΔΠ	ΔΠ
	II	0,06/0,125/0,25 (0,06-0,25)	2 (2-2)	0	0	-	-	ΔΠ	ΔΠ
	III	0,06 (0,06-0,125)	\leq 1 (\leq 1- \leq 1)	0	0			ΔΠ	ΔΠ
	IV	0,125 (\leq 0,03-0,25)	\leq 1 (\leq 1- \leq 1)	0	9			ΔΠ	ΔΠ
	V	0,25 (0,125-0,25)	\leq 1 (\leq 1-2)	0	20			ΔΠ	ΔΠ

^αΓια κλάδους με λίγα στελέχη ή κλάδους που δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί WT-ULV (ΔΠ), χρησιμοποιήθηκε η συνολική WT-ULV και παρουσιάζεται σε παρένθεση.

^βΓια τους κλάδους II και III, η WT-ULV 16 mg/L αποδίδει 100% CA (0% MaE, 0% VmE).

^γΗ WT-ULV 4 mg/L αποδίδει 80% CA (0% MaE, 20% VmE).

^δΗ WT-ULV 1 mg/L αποδίδει 100% CA (0% MaE, 0% VmE).

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

5.1 CLSI BMD έναντι EUCAST BMD

Η έγκαιρη χορήγηση κατάλληλης αντιμυκητικής θεραπείας με βάση τα ακριβή δεδομένα αντιμυκητικής ευαισθησίας θεωρείται ακρογωνιαίος λίθος στη διαχείριση των μυκητικών λοιμώξεων. Στην παρούσα μελέτη, η συγκριτική αξιολόγηση των δύο πρότυπων μεθόδων BMD CLSI και EUCAST έναντι παγκόσμιας συλλογής στελεχών *C. auris* έδειξε ότι τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν αξιοσημείωτα παρόμοια. Οι τιμές MIC που προέκυψαν από τον έλεγχο της *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας όλων των στελεχών *C. auris* και με τις δύο μεθόδους ήταν γενικά πολύ παρόμοιες, με διαφορά που δεν υπερέβαινε τις ± 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις, εκτός από το αντιμυκητικό ITC. Η EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διπλάσιων αραιώσεων ήταν η μεγαλύτερη για την AMB (100%/100%) και η χαμηλότερη για την POS (50%/85%) και την ITC (39%/68%). Οι αζόλες και οι εχινοκανδίνες παρουσίασαν καλή έως εξαιρετική EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διπλάσιων αραιώσεων (71-90%/88-98%). Η CA μεταξύ των μεθόδων ήταν εξαιρετική για όλα τα αντιμυκητικά που εξετάστηκαν ($\geq 97\%$).

Συγκριτικές αξιολογήσεις μεταξύ των δύο πρότυπων μεθόδων BMD για τον AFST έναντι στελεχών *C. auris* είναι περιορισμένες και βασίζονται σε στελέχη συγκεκριμένου γεωγραφικού εντοπισμού [87], [91], [92]. Μέχρι σήμερα, οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί εξετάζουν δεδομένα κυρίως με την πρότυπη BMD, αναφέροντας το κλαδο-εξαρτώμενο προφίλ ευαισθησίας της *C. auris* [24]. Σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους CLSI/EUCAST BMD το 86,2%/96%, το 9,8%/0% και το 5,7%/6,5% των στελεχών *C. auris* κλάδου I από την Ινδία εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC, AMB και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα [87], ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα στελέχη κλάδου IV από την Κολομβία ήταν 93,5%/80,6%, 0%/22,5% και 0%/0% [92], όπως και για τα στελέχη κλάδου II από τη Νότια Κορέα τα οποία εμφάνισαν 0%/0% ανθεκτικότητα στην AMB [91]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η CA που αποδίδεται μεταξύ των δύο μεθόδων για τη FLC ήταν 87,1% και 90,2% για στελέχη κλάδου IV και I, αντίστοιχα [87], [92], για την AMB ήταν 77,5%, 90,2% και 100%, για στελέχη κλάδου IV, I και II, αντίστοιχα [87], [91], [92], ενώ για τις εχινοκανδίνες ήταν 99,2% και 100% για στελέχη κλάδου I και IV, αντίστοιχα [87], [92].

Στην παρούσα μελέτη, τα *in vitro* δεδομένα (επικρατούσα MIC, εύρος MIC, MIC₅₀ και MIC₉₀) που προέκυψαν με τη μέθοδο CLSI και EUCAST ήταν σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές για όλα τα αντιμυκητικά, με διαφορά που δεν υπερέβαινε τις ± 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις. Συγκεκριμένα, με τις μεθόδους CLSI/EUCASBMD το 83%/83%, το 0%/0% και το 17-19%/21-23% των στελεχών κλάδου I εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC, AMB και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα στελέχη κλάδου IV ήταν 77%/73%, 0%/0% και 0%/0%, όπως και για τα στελέχη κλάδου II, τα οποία εμφάνισαν 0%/0% ανθεκτικότητα στην AMB. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η CA που αποδίδεται μεταξύ των δύο μεθόδων για τη FLC ήταν 98% (1% MaE, 1% VmE) και 100% για στελέχη κλάδου I και IV, αντίστοιχα, για την AMB ήταν 100%, ανεξαρτήτως κλάδου, ενώ για τις εχινοκανδίνες ήταν 98% (2% MaE) και 100% για στελέχη κλάδου I και IV, αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη, ανεξαρτήτως κλάδου, ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB (CDC R BP, MIC ≥ 2 mg/L) και με τις δύο μεθόδους (100% CA), ωστόσο κάποιες μελέτες έχουν αναφέρει χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας, 9,8% με τη μέθοδο CLSI για στελέχη κλάδου I (n=123) (επικρατούσα MIC, 0,5 mg/L) και 22,5% με τη μέθοδο EUCAST για στελέχη κλάδου IV (n=31) (επικρατούσα MIC, 1 mg/L) [87], [92]. Σημειωτέον, υιοθετώντας την προτεινόμενη EUCAST AMB WT-ULV των 2 mg/L, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων θα αυξανόταν στην περίπτωση των δύο προηγούμενων μελετών. Συγκεκριμένα, για τα στελέχη κλάδου I θα ήταν 93,5% έναντι 90,2% και για τα στελέχη κλάδου IV θα ήταν 100% έναντι 77,5% [87], [92].

Σύμφωνα με προηγουμένως δημοσιευμένα δεδομένα, τα ποσοστά ανθεκτικότητας που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη για τις εχινοκανδίνες AFG και MFG με τη μέθοδο CLSI/EUCASB I, συγκεκριμένα 17-19%/21-23% (n=47) έναντι 5,7%/6,5% (n=123) [87], ενώ όλα τα στελέχη του κλάδου IV ερμηνεύτηκαν ως non-R (100% CA), κάτι που επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες [92]. Σε αντίθεση με όλες τις συγκριτικές μελέτες [87], [91], [92], στην παρούσα συμπεριλήφθηκαν στελέχη R στις εχινοκανδίνες (που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*), τα οποία διαχωρίστηκαν σαφώς από τον κύριο πληθυσμό, γεγονός που εξηγεί τα ελαφρώς μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, υιοθετώντας την προτεινόμενη κλαδο-ειδική EUCAST AFG/MFG WT-ULV των 2/8 mg/L

(κλάδος I) και 0,25/0,125 mg/L (κλάδος IV), αντίστοιχα, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων θα παρέμενε ίδια στην περίπτωση των δύο παραπάνω μελετών.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει σημειωθεί η εμφάνιση περισσότερων από μία κορυφών στις κατανομές MIC των αζολών, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στην παρουσία περισσότερων από ένα είδη, είτε στην κακή διεξαγωγή των δοκιμών αντιμυκητικής ευαισθησίας, είτε ότι εντός του πληθυσμού που μελετάται βρίσκονται και στελέχη non-WT [87]. Η εμφάνιση δικόρυφων και τρικόρυφων κατανομών MIC, σε προηγούμενες συγκριτικές αξιολογήσεις αποδόθηκε στην παρουσία στελεχών non-WT εντός του προς μελέτη πληθυσμού [87], [92]. Ομοίως και στην παρούσα μελέτη, τα αντιμυκητικά ITC και ISA έδωσαν δικόρυφες ή/και τρικόρυφες κατανομές. Σε άλλα είδη *Candida*, αρκετοί μηχανισμοί αντίστασης στην αζόλη συχνά δρουν συντονισμένα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς βαθμούς αύξησης της MIC, ανάλογα με το συνδυασμό μεταλλάξεων, την έκφραση αντλιών εκροής, την ανοδική ρύθμιση του γονιδίου στόχου, κ.λπ. [123]. Σε ένα τέτοιο σενάριο, είναι αναμενόμενες οι δικόρυφες και τρικόρυφες κατανομές, όπως βρίσκονται εδώ για τα στελέχη *C. auris*, για τον λόγο αυτό, δε θα ήταν ασφαλές να γίνει οποιαδήποτε προσπάθεια υπολογισμού WT-ULV, καθώς υπάρχει περίπτωση να υπερεκτιμηθεί ο πραγματικός πληθυσμός non-WT.

Δεδομένου ότι δεν έχουν καθιερωθεί όρια ευαισθησίας ειδικά για την *C. auris*, οι Arendrup et al. προσδιόρισαν δοκιμαστικά CLSI ECVs και EUCAST ECOFFs για 8 αντιμυκητικά έναντι στελεχών *C. auris* ινδικής προέλευσης (κλάδου I) [87]. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν στελέχη παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής διαφορετικών κλάδων (I-V), προς αποφυγή υπερεκπροσώπησης κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών, καθώς και στελεχών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*. Παρόλα αυτά, τόσο τα ειδικά WT-ULVs για στελέχη κλάδου I, όσο και τα WT-ULVs ανεξαρτήτως κλάδου, που προτείνονται στην παρούσα μελέτη, διέφεραν σε σύγκριση με των Arendrup et al., αποδίδοντας μικρές ερμηνευτικές διαφορές, με εξαίρεση τα αντιμυκητικά AMB και POS. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται το κλαδο-ειδικό προφίλ ευαισθησίας της *C. auris*, καθιστώντας αναγκαία την εύρεση κλαδο-ειδικών WT-ULVs.

Πίνακας 20. Συγκριτική αξιολόγηση προτεινόμενων δοκιμαστικών CLSI ECVs και EUCAST ECOFFs αντοχής και CLSI/EUCAS WT-ULVs που περιλαμβάνουν το 99% των WT MIC έναντι στελεχών *C. auris* κλάδου I και κλάδων I-V.

Αντιμυκητικός παράγοντας	Πρότυπη μέθοδος AFST	Arendrup et al. [87]			Παρούσα μελέτη			
		Προτεινόμενα WT-ULVs (mg/L)	% αντοχή (κλάδος I)	% αντοχή (κλάδος I-V)	Προτεινόμενα WT-ULVs κλάδου I (mg/L)	% αντοχή (κλάδος I)	Συνολικά WT-ULVs (mg/L)	% αντοχή (κλάδος I-V)
AMB	CLSI	2	0	0	2	0	2	0
	EUCAST	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	2	0	1	0
FLC	CLSI	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
	EUCAST	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
POS	CLSI	0,25	0	0	0,06	6	0,06	4
	EUCAST	0,25	0	0	0,125	2	0,5	0
VRC	CLSI	32	0	0	4	1	16	0
	EUCAST	8	0	0	1	5	16	0
ITC	CLSI	1	0	1	2	0	2	1
	EUCAST	2	0	0	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
ISA	CLSI	2	0	0	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
	EUCAST	0,25	21	26	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
AFG	CLSI	0,25	25	12	2	17	2	8
	EUCAST	0,5	23	11	2	21	2	10
MFG	CLSI	0,25	25	12	2	19	2	9
	EUCAST	0,25	23	11	8	21	8	10

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτη υπογραμμίζουν την ομοιόμορφη ευαισθησία στην AMB και αντίσταση στη FLC, καθώς επίσης και τη μεταβλητή επίκτητη αντοχή σε άλλες αζόλες και εχινοκανδίνες με τις πρότυπες μεθόδους BMD. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα από μεμονωμένα εργαστήρια παγκοσμίως για τους επίσημους προσδιορισμούς των ECVs/ECOFFs.

5.2 CLSI BMD έναντι SYO

Στην παρούσα μελέτη, η συγκριτική αξιολόγηση της μεθόδου SYO και της πρότυπης μεθόδου CLSI BMD έναντι παγκόσμιας συλλογής στελεχών *C. auris* έδειξε ότι η εμπορική μέθοδος SYO εμφανίζει κλαδο-εξαρτώμενα και φαρμακο-εξαρτώμενα αποτελέσματα. Η συμφωνία μεταξύ των παρατηρητών εντός ± 1 διαδοχικής διπλής αραίωσης ήταν εξαιρετική (100%) για το SYO, ενώ η απόλυτη/ ± 1 διπλάσια αραίωση διαπειραματική συμφωνία μεταξύ των επαναλήψεων SYO (του τελικού σημείου χρώματος) ήταν 63%/94%. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ομοιόμορφη αντίσταση στη FLC, καθώς επίσης και τη μεταβλητή επίκτητη αντοχή σε άλλες αζόλες και εχινοκανδίνες. Συγκεκριμένα, τα SYO MICs για την AMB και τις αζόλες FLC και POS ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα CLSI MICs. Συνολικά, η EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διπλάσιων αραιώσεων μεταξύ των μεθόδων CLSI και SYO ήταν φτωχή για την POS (13%/24%), FLC (27%/85%) και AMB (36%/94%), μέτρια για τη VRC (48%/74%), ITC (63%/77%), καθώς και για τις εχινοκανδίνες (43-55%/70-86%) και καλή για τη 5FC (80%/91%). Όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB με τη μέθοδο CLSI, ενώ το 70% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην AMB με τη μέθοδο SYO (30% CA, 70% MaE). Αντιθέτως, δεν καταγράφηκαν σημαντικές ερμηνευτικές αποκλίσεις για τη FLC (96% CA, 1% VmE, 4% MaE) και τις εχινοκανδίνες (99% CA, 1% MaE), με εξαίρεση την CAS (87% CA, 12% MaE, 1% VmE).

Παρόλο που το SYO χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια ρουτίνας, υπάρχουν περιορισμένες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητά του στις δοκιμές αντιμυκητικής ευαισθησίας για την *C. auris*. Επιπλέον, υπάρχει έλλειψη συγκριτικών αξιολογήσεων με τις πρότυπες μεθόδους BMD, γεγονός που καθιστά δύσκολη συσχέτιση των δύο μεθοδολογιών. Επί του παρόντος, έχουν διεξαχθεί μόνο δύο μελέτες, που συγκρίνουν *in vitro* δεδομένα με τις πρότυπες μεθόδους CLSI και EUCAST BMD έναντι της εμπορικής SYO, αναφέροντας το κλαδο-εξαρτώμενο προφίλ ευαισθησίας

της *C. auris*. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Ruiz-Gaitán et al. εξετάστηκαν 56 κλωνικά συνδεδεμένα στελέχη ισπανικής προέλευσης (κλάδου III) έναντι 8 αντιμυκητικών παραγόντων [95]. Από την άλλη πλευρά, οι Siorpi et al. εξέτασαν 65 διακριτά κλινικά στελέχη παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής έναντι της AMB [94]. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες αναφορές, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε μεγαλύτερη συλλογή στελεχών *C. auris* (n=100 έναντι 56 και 65, αντίστοιχα) κλάδων I-V, έναντι 9 αντιμυκητικών παραγόντων, παρέχοντας πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το κλαδο-εξαρτώμενο προφίλ ευαισθησίας της *C. auris*.

Σύμφωνα με τη μέθοδο SYO το 100% και το 1,8% των στελεχών *C. auris* κλάδου III από την Ισπανία εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα [95], ενώ τα ποσοστά αντοχής στην AMB για τα στελέχη κλάδου I, II, III, IV και V ήταν 98%, 0%, 0-75%, 50% και 100%, αντίστοιχα [94], [95]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η CA που αποδίδεται μεταξύ των δύο μεθόδων για τη FLC ήταν 100% για στελέχη κλάδου III [95], για την AMB ήταν 2%, 100%, 0-25%, 50% και 0% για στελέχη κλάδου I, II, III, IV και V, αντίστοιχα [94], [95], ενώ για τις εχινοκανδίνες ήταν 98,2% (1,8% MaE) για στελέχη κλάδου III [94], [95].

Στην παρούσα μελέτη, τα ευρήματα του *in vitro* προφίλ ευαισθησίας της *C. auris* με τις μεθόδους CLSI/EUCAST BMD και SYO ήταν σύμφωνα με προηγούμενως δημοσιευμένα δεδομένα (εύρος MIC, MIC₅₀ κι MIC₉₀), για όλα τα αντιμυκητικά, με διαφορά που δεν υπερέβαινε τις ± 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις, με εξαίρεση τις POS και ITC με τη μέθοδο SYO, η διαφορά των οποίων ήταν εντός ± 3 διαδοχικές διπλές αραιώσεις (εύρος MIC, 0,125->8 mg/L και 0,25->8 mg/L έναντι 0,016-0,25 mg/L και 0,06-0,5 mg/L, αντίστοιχα), για στελέχη κλάδου III [94]. Όλα τα στελέχη με τις μεθόδους CLSI/EUCAST BMD ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, το 83%/82% ως R στη FLC και το 91-92%/90-91% ως R στις εχινοκανδίνες. Αντίστοιχα, με τη μέθοδο SYO το 100% και το 0% των στελεχών κλάδου III εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα, ενώ τα ποσοστά αντοχής στην AMB για τα στελέχη κλάδου I, II, III, IV και V ήταν 94%, 0%, 22%, 77% και 80%, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η CA που αποδίδεται μεταξύ των δύο μεθόδων για τη FLC και τις εχινοκανδίνες ήταν 100% για στελέχη κλάδου III και για την AMB ήταν 6% (93% MaE), 100%, 78% (22% MaE), 23% (77% MaE) και 20% (80% MaE) για στελέχη κλάδου I, II, III, IV και V, αντίστοιχα.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος SYO θα μπορούσε να αποκλείσει ή να προβλέψει επακριβώς

τα ποσοστά αντοχής για τα αντιμυκητικά FLU, AFG και MFG έναντι στελεχών *C. auris*. Ωστόσο, υπερεκτιμήθηκε η αντίσταση στην AMB και στην CAS, με τη μέθοδο SYO, όταν χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC ($MIC \geq 2$ mg/L), υπογραμμίζοντας ότι τα αντίστοιχα MICs με τη μέθοδο SYO θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

5.3 CLSI BMD έναντι MTS

Οι τιμές MIC που προέκυψαν από τον έλεγχο της *in vitro* αντιμυκητικής ευαισθησίας όλων των στελεχών *C. auris* και με τις δύο μεθόδους ήταν συνολικά πολύ παρόμοια για τα περισσότερα αντιμυκητικά με διαφορά που δεν υπερέβαινε τη ± 1 διαδοχική διπλή αραίωση μεταξύ τους, εκτός από τα αντιμυκητικά POS, ITC, VRC και 5FC. Η απόλυτη/ ± 1 διπλάσια αραίωση ενδοπειραματική συμφωνία με τη μέθοδο MTS ήταν 63%/100%. Τα MTS MICs για τις αζόλες POS, ITC, VRC και 5FC ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα CLSI MICs. Συνολικά, η ΕΑ εντός $\pm 1/\pm 2$ διαδοχικών διπλών αραιώσεων ήταν φτωχή για τις POS (3%/21%), ITC (20%/52%), VRC (31%/52%) και 5FC (37%/69%), και μέτρια έως εξαιρετική για τις ISA (59%/82%), AND (68%/79%), CAS (72%/85%), MFG (77%/91%) και AMB (85%/96%). Σχεδόν όλες οι CLSI MICs της FLC ήταν εκτός κλίμακας, αποκλείοντας την αντίστοιχη εκτίμηση της ΕΑ. Σημαντικές ερμηνευτικές αποκλίσεις παρατηρήθηκαν για το αντιμυκητικό AMB (66% CA, 34% MaE), ενώ η CA για τη FLC και τις εχινοκανδίνες ήταν εξαιρετική, 98% (1% MaE, 1% VmE) και 99-95% (1-5% MaE), αντίστοιχα.

Επί του παρόντος, υπάρχουν μόνο τέσσερις συγκριτικές αξιολογήσεις των πρότυπων μεθόδων CLSI/EUCAST BMD με τις εμπορικές Etest/MTS, που καταλήγουν σε κλαδο- και φαρμακο-εξαρτώμενα συμπεράσματα. Σύμφωνα με αυτές, με τις μεθόδους Etest και MTS, το 100%, 14,3% και 0% των στελεχών *C. auris* κλάδου III από την Ισπανία εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC, AMB και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα [95], ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα στελέχη κλάδου IV από την Κολομβία ήταν 93,5%, 9,7% και 0% [92]. Τα ποσοστά ανθεκτικότητας στην AMB κυμαίνονταν από 0%, για τα στελέχη κλάδου II, έως 1,1%, για τα στελέχη κλάδου I, ενώ τα ποσοστά ανθεκτικότητας στις εχινοκανδίνες για τα στελέχη κλάδου I ήταν 7,7% [10], [91]. Έτσι, η CA που αποδίδεται μεταξύ των μεθόδων για τη FLC ήταν 87,1% και 100%, για τα στελέχη κλάδου IV και III, αντίστοιχα [92], [95], για την AMB ήταν 85,7%, 87%, 87,2-90,3% και 100%, για τα στελέχη κλάδου III, I, IV και II, αντίστοιχα [10], [91], [92], [95], ενώ για τις εχινοκανδίνες

ήταν 99%, για τα στελέχη κλάδου I και 100% για τα στελέχη κλάδου III και IV [10], [92], [95].

Στην παρούσα μελέτη, τα *in vitro* δεδομένα που προέκυψαν με τη μέθοδο Etest (επικρατούσα MIC, εύρος MIC, MIC₅₀ και MIC₉₀) για στελέχη *C. auris* κλάδου II και III ήταν σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες με διαφορά που δεν υπερέβαινε τις ± 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις, με εξαίρεση τα αντιμυκητικά AMB, VRC και AFG, η διαφορά των οποίων ήταν εντός $\pm 3-4$ διαδοχικές διπλές αραιώσεις (εύρος MIC, 0,25-1 mg/L, 0,5->32 mg/L και 0,016-0,125 mg/L έναντι 0,016-2 mg/L, 8-64 mg/L και 0,008-1 mg/L, αντίστοιχα), για στελέχη κλάδου III. Ακόμη, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν συγκρίσιμα με προηγουμένως δημοσιευμένα δεδομένα (επικρατούσα MIC, εύρος MIC, MIC₅₀ και MIC₉₀ εντός ± 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις) για τα στελέχη κλάδου I και IV, με εξαίρεση τα αντιμυκητικά AMB και CAS για τα στελέχη κλάδου I και τη VRC για τα στελέχη κλάδου IV ($\pm 3-4$ διαδοχικές διπλές αραιώσεις).

Όλα τα στελέχη με τις μεθόδους CLSI/EUCAST BMD ερμηνεύτηκαν ως non-R στην AMB, το 83%/82% ως R στη FLC και το 91-92%/90-91% ως R στις εχινοκανδίνες. Αντίστοιχα, τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα αντιμυκητικά FLC, AMB και στις εχινοκανδίνες με τη μέθοδο Etest για τα στελέχη κλάδου I ήταν 89%, 68% και 21-28%, για τα στελέχη κλάδου II ήταν 67%, 0% και 0%, για τα στελέχη κλάδου III ήταν 100%, 0% και 4%, για τα στελέχη κλάδου IV ήταν 77%, 4,5% και 0% και, τέλος, για τα στελέχη κλάδου V ήταν 60%, 20% και 0%. Έτσι, η CA μεταξύ των μεθόδων κυμαινόταν από 92% (στελέχη κλάδου IV) έως 100% (στελέχη κλάδου I-III και V) για τη FLC, από 32% (στελέχη κλάδου I), 80-98% (στελέχη κλάδου IV και V) έως 100% (στελέχη κλάδου II και III) για την AMB και από 92-98% (στελέχη κλάδου I και III) έως 100% (στελέχη κλάδου II, IV και V) για τις εχινοκανδίνες.

Υιοθετώντας τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την AMB (MIC ≥ 2 mg/L), στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη ερμηνεύτηκαν ως ευαίσθητα με τη μέθοδο CLSI, ενώ το ποσοστό ανθεκτικότητας με τη μέθοδο MTS ήταν 66% (66% CA, 34% MaE). Το ποσοστό αυτό αφορούσε, ως επί το πλείστον, στελέχη κλάδου I. Συγκεκριμένα, αποτελούνταν από το 68% στελεχών κλάδου I (32/47) και το 4,5% στελεχών κλάδου IV (1/22). Αντίθετα, προηγούμενες αναφορές κάνουν λόγο για χαμηλότερα ποσοστά αντοχής στην AMB, 1,1%, 9,7% και 14,3%, εντός των κλάδων I (n=90), IV (n=31) και III (n=73), αντίστοιχα [10], [92], [95]. Σημειωτέον, υιοθετώντας την προτεινόμενη MTS AMB WT-

ULV των 4 mg/L, η CA μεταξύ των δύο μεθόδων θα αυξανόταν στην περίπτωση παραπάνω μελετών. Συγκεκριμένα, για τα στελέχη κλάδου I θα ήταν 96% έναντι 87%, για τα στελέχη κλάδου III θα ήταν 100% έναντι 85,7% και για τα στελέχη κλάδου IV θα ήταν 100% έναντι 87,2-90,3% [10], [92], [95].

Συνεπώς, η μέθοδος MTS παρουσίασε υψηλότερα MIC για τις αζόλες και τη FC, σε σύγκριση με τη μέθοδο CLSI. Φαίνεται πως η μέθοδος MTS θα μπορούσε να προβλέψει με ακρίβεια την αντίσταση στη FLU και στις εχινοκανδίνες μεταξύ στελεχών *C. auris*. Ωστόσο, υπερεκτίμησε την αντίσταση στην AMB όταν χρησιμοποιήθηκαν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC ($MIC \geq 2$ mg/L), υπογραμμίζοντας την ανάγκη για προσεκτική ερμηνεία.

5.4 CLSI BMD έναντι Vitek 2

Στην παρούσα μελέτη, η συγκριτική αξιολόγηση της μεθόδου Vitek 2 και της πρότυπης μεθόδου BMD CLSI έναντι παγκόσμιας συλλογής στελεχών *C. auris* έδειξε ότι η αυτοματοποιημένη μέθοδος Vitek 2 παρουσιάζει πρότυπα απόδοσης που σχετίζονται τόσο με τον κλάδο, όσο και με το φάρμακο που εξετάζεται. Τα MICs που προκύπτουν για το αντιμυκητικό AMB με τη μέθοδο Vitek 2 είναι σημαντικά υψηλότερα (29% EA) από τα MICs που προκύπτουν από τη μέθοδο CLSI και οδηγούν σε σημαντικά ερμηνευτικά σφάλματα (69% MaE), τα οποία περιορίστηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μία ειδική Vitek 2 WT-ULV 16 mg/L (2% MaE). Όσον αφορά τη FLC, τα MIC που συγκεντρώθηκαν με το Vitek 2 ήταν σημαντικά χαμηλότερα (16% EA) από εκείνα με τη μέθοδο CLSI, ως αποτέλεσμα να προκύψουν αξιοσημείωτες ερμηνευτικές διαφορές (0% MaEs, 31% VmE), οι οποίες περιορίστηκαν όταν εφαρμόστηκε μία ειδική για το Vitek 2 WT-ULV 4 mg/L (1% MaEs, 3% VmEs). Αντίθετα, οι τιμές MIC των εχινοκανδινών που ελήφθησαν και με τις δύο μεθόδους δε διέφεραν σημαντικά (67% και 81% EA για MFG και CAS, αντίστοιχα) και το Vitek 2 ταξινόμησε αξιόπιστα όλα τα στελέχη που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *FKSI* ως R στις εχινοκανδίνες (1% MaEs, 0% VmEs). Η EA μεταξύ των μεθόδων ήταν μέτρια για το αντιμυκητικό VRC (61%) και χαμηλή για το αντιμυκητικό 5FC (0%).

Παρόλο που η μέθοδος Vitek 2 χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινική εργαστηριακή ρουτίνα, συγκριτικές αξιολογήσεις με την πρότυπη μέθοδο CLSI σχετικά με την αντιμυκητική ευαισθησία έναντι στελεχών *C. auris* είναι περιορισμένες και βασίζονται σε

δοκιμές στελεχών από περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές, δηλαδή στελέχη που ανήκουν σε συγκεκριμένους κλάδους [10], [91], [92], [108]–[110]. Μέχρι σήμερα, οι μελέτες που εξετάζουν το προφίλ αντιμυκητικής ευαισθησίας για στελέχη *C. auris*, έχουν διεξαχθεί κυρίως με την πρότυπη μέθοδο BMD και δείχνουν ότι οι κατανομές MIC μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους [24]. Ενδεικτικά, έχει γίνει αναφορά σχετικά με τον έλεγχο αντιμυκητικής ευαισθησίας με την πρότυπη μέθοδο CLSI, σύμφωνα με την οποία το 38-62%, το 0-24% και το 0% των στελεχών *C. auris* κλάδου II από την Κορέα εμφάνισε ανθεκτικότητα στη FLC, AMB και στις εχινοκανδίνες, αντίστοιχα [91], [109], [110], ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα στελέχη κλάδου I από την Ινδία ήταν 55%, 0-15,5% και 0-8,8% [10], [108], σε αντίθεση με τα στελέχη κλάδου IV από την Κολομβία τα οποία εμφάνισαν 93,5%, 0% και 0% ανθεκτικότητα, αντίστοιχα [92]. Τέτοιες διαφορές μπορούν να αποδοθούν στη μορφολογία και τη δομή των κυττάρων του μύκητα, ιδιαίτερα στην ικανότητα παραγωγής συσσωματωμάτων [75], καθώς επίσης και στις μοναδικές μεταβολικές ιδιότητες [124] κάθε ειδικού για τον κλάδο φαινοτύπου *C. auris*.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα μεταβλητά περιφερειακά πρότυπα κλαδο-ειδικής αντιμυκητικής αντοχής που έχουν αναφερθεί, παρουσιάζονται εξαρτώμενα αντικρουόμενα χαρακτηριστικά στην απόδοση της μεθόδου Vitek 2 σχετικά με την αντιμυκητική ευαισθησία για την *C. auris*, που αποκλείουν την ασφαλή αναγωγή τους στο γενικό πληθυσμό (γενικό πλαίσιο). Συγκεκριμένα, οι Kwon et al. έδειξαν ότι η μέθοδος Vitek 2 μπορεί να είναι αξιόπιστο εργαλείο για τη μέθοδο αντιμυκητικής ευαισθησίας όσον αφορά το αντιμυκητικό FLC έναντι των στελεχών *C. auris* κλάδου II (97% EA εντός ± 2 διπλάσιων αραιώσεων, 93% CA) [109]. Αντίθετα, οι Ceballos-Garzon et al. αναφέρουν ότι τα δεδομένα που εξάγονται για τη FLC με τη μέθοδο Vitek 2 για τα στελέχη κλάδου IV, θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (61% CA, 39% VmEs) [92]. Μία πιθανή εξήγηση για αυτή την αξιοσημείωτη διαφορά θα μπορούσε να είναι συμπερίληψη πληθυσμού ανθεκτικού στη FLC, με βάση τη μέθοδο CLSI, στο σύνολο της συλλογής στελεχών *C. auris* που δοκιμάστηκαν (62% για τον κλάδο II έναντι 96% για τον κλάδο IV). Στην πραγματικότητα, οι μελέτες που συμπεριλαμβάνουν στην πλειοψηφία τους ευαίσθητα στα αντιμυκητικά στελέχη, παρουσιάζουν ασυνήθιστα VmEs, σε αντίθεση με μελέτες που διεξάγονται και ελέγχουν στην πλειοψηφία τους στελέχη ανθεκτικά στα αντιμυκητικά [85], [125]. Παρόμοια αντιφατικά αποτελέσματα, εξαρτώμενα από τον κλάδο, βρέθηκαν και για το αντιμυκητικό AMB. Η μέθοδος Vitek2 παρουσίασε εξαιρετική απόδοση για τον έλεγχο

αντιμυκητικής ευαισθησίας στην AMB έναντι στελεχών κλάδου II (100% EA εντός ± 2 διπλάσιων αραιώσεων, 100% CA) [91], [109], παρόλο που αυτό δεν ίσχυε για τα στελέχη κλάδου I (15-16% CA, 84-85% MaEs) [10], [108], καθώς επίσης και για τα στελέχη κλάδου IV (10% CA, 90% MaEs) [92]. Συμπερασματικά, οι κλαδο- ειδικές διαφορές που εμφανίστηκαν στις τιμές MIC που συγκεντρώθηκαν με τη μέθοδο CLSI για το αντιμυκητικό AMB, ευθύνονται για τη αυτή μειωμένη απόδοση, καθώς η επικρατούσα τιμή MIC για τα στελέχη κλάδου I [10] και IV [92] ήταν μόλις μία και δύο διπλάσιες αραιώσεις χαμηλότερα από τα δοκιμαστικά όρια ευαισθησίας που έχει θεσπίσει ο CDC (2 mg/L) [86], ενώ η επικρατούσα τιμή MIC για τα στελέχη κλάδου II ήταν 0,5 mg/L [91].

Στην παρούσα μελέτη γίνεται για πρώτη φορά η απόπειρα αξιολόγησης της απόδοσης του Vitek 2 για την αντιμυκητική ευαισθησία της *C. auris* έναντι καλά χαρακτηρισμένων, γενετικά διακριτών στελεχών *C. auris* από ποικίλες γεωγραφικές προελεύσεις που καλύπτουν και τους πέντε κλάδους. Αυτό το κριτήριο επιλογής περιορίζει, επίσης, τον κίνδυνο υπερεκπροσώπησης κλωνικών στελεχών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την παρούσα αξιολόγηση, καθώς και τη μελλοντική συνολική σύγκριση απόδοσης της ανάλυσης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα στελέχη γονοτυπήθηκαν σε μία από τις προηγούμενες μελέτες [10], [91], [92], [108], [110] και επομένως δεν μπορεί να αποκλειστεί η χαμηλή γενετική μεταβλητότητα. Εξάλλου, στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν στελέχη πραγματικά ανθεκτικά στις εχινοκανδίνες (που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*), εν αντιθέσει με όλες τις προηγούμενες συγκριτικές μελέτες [10], [91], [92], [108]–[110]. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι οι εχινοκανδίνες ενδείκνυνται, επί του παρόντος, ως θεραπεία πρώτης γραμμής για λοιμώξεις από *C. auris* [73]. Ωστόσο, έχει αναφερθεί μία, άνευ προηγουμένου, έξαρση λοιμώξεως *C. auris*, κυρίως σχετιζόμενη με καθετήρες, που συνοδεύεται από στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* [126]–[131]. Συνεπώς, η ακριβής εξαγωγή δεδομένων αντιμυκητικής ευαισθησίας για την *C. auris* σχετικά με τις εχινοκανδίνες αποτελεί σημαντικό συστατικό δυνητικού αποτελεσματικού θεραπευτικού σχήματος και επομένως είναι κρίσιμης σημασίας η εξέταση ενός πάνελ ανθεκτικών, αλλά και ευαίσθητων στελεχών, εάν επιδιώκεται η πραγματική απόδοση μίας δοκιμασίας αντιμυκητικής ευαισθησίας.

Τα δεδομένα που προέκυψαν, στην παρούσα μελέτη, με τη μέθοδο CLSI για το αντιμυκητικό MFG συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (επικρατούσα MIC και MIC₉₀ 0,03 και 0,5 mg/L έναντι 0,03-0,125 και 0,25-0,5 mg/L, αντίστοιχα) [92], [110], [132]. Η

πλειοψηφία των τιμών MIC που συγκεντρώθηκαν να είναι 4 διπλάσιες αραιώσεις χαμηλότερα από τα δοκιμαστικά όρια ευαισθησίας που έχει θεσπίσει ο CDC (4 mg/L) [86]. Στελέχη κλάδου I που έφεραν μεταλλάξεις S630F ή ΔF635 έδωσαν υψηλότερες τιμές MIC με τη μέθοδο CLSI για το αντιμυκητικό MFG (4- >8 mg/L), συγκριτικά με τα στελέχη WT, που περιγράφηκαν προηγουμένως [132]. Οι τιμές MIC που συγκεντρώθηκαν με τη μέθοδο Vitek 2 για το αντιμυκητικό MFG ήταν 1-2 διπλάσιες αραιώσεις υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές MIC με τη μέθοδο CLSI, δηλαδή κοντά στα δοκιμαστικά όρια ευαισθησίας που έχει θεσπίσει ο CDC, αποδίδοντας 99% CA (1% MaEs, 0% VmEs), η οποία συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (100%) [92], [108]–[110]. Η 100% CA που προέκυψε από προηγούμενες μελέτες δεν θα άλλαζε εάν υιοθετούνταν η ειδική για τη μέθοδο Vitek 2 WT-ULV για τη MFG (1 mg/L) που προτείνεται στην παρούσα μελέτη, η οποία είναι κοντά στα προτεινόμενα ECVs του CLSI (0,5 mg/L) [87], [133]. Απαιτούνται περαιτέρω αξιολογήσεις επαλήθευσης, που να ενσωματώνουν στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* με τιμές MIC 1-3 διπλάσιες αραιώσεις υψηλότερα από το ECV, προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν ένα σημείο διακοπής 4 mg/L ή πιο κοντά στο ECV προβλέπει την κλινική έκβαση.

Αυτό που πρέπει να ληφθεί υπόψη σχετικά με την CAS είναι ο αμφίβλος ρόλος της ως υποκατάστατο στην αντίσταση στις εχινοκανδίνες, λόγω της έντονης ενδοεργαστηριακής μεταβλητότητας που έχει παρατηρηθεί μεταξύ των τιμών MIC που έχουν συγκεντρωθεί από μεθόδους μικροαραιώσεων σε ζωμό για *Candida spp.* [134]. Ειδικότερα για την *C. auris*, η εφαρμογή ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας που βασίζεται σε μεθόδους μικροαραιώσεων σε ζωμό αναφορικά με την CAS έχει μειωθεί, καθώς η CAS εμφανίζει αυξημένα αποτελέσματα eagle effect που οδηγούν στην υπερεκτίμηση του WT πληθυσμού, ενώ μόνο τα στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* είναι πραγματικά ανθεκτικά στις εχινοκανδίνες [135]. Αξίζει να σημειωθεί πως η μέθοδος Vitek 2 ταξινομήσε αξιόπιστα όλα τα στελέχη *C. auris* που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI* ως ανθεκτικά στην CAS σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (2 mg/L) [86]. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες κατέταξαν το 37% των στελεχών *C. auris* ως ανθεκτικό στην CAS και με τις δυο μεθόδους, χωρίς όμως να παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τη γονοτύπηση των στελεχών (αλληλούχιση του γονιδίου *FKSI* με τη χρήση γνωστών *C. glabrata* εκκινητών για το γονίδιο αυτό) [10]. Αυτό το ποσοστό θα μπορούσε να αποδοθεί στην τάση των στελεχών να παρουσιάζουν paradoxical growth effect με το συγκεκριμένο αντιμυκητικό. Ως εκ τούτου, εάν δεν είναι

εφικτή η αλληλούχηση του γονιδίου *FKSI* στην καθημερινή εργαστηριακή ρουτίνα, οι τιμές MIC με τη μέθοδο Vitek 2 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως δείκτες ανθεκτικότητας στις εχινονακανδίνες.

Η θεραπεία με λιποσωμική AMB θα μπορούσε να θεωρηθεί μία εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για τις λοιμώξεις από *C. auris* [73]. Σημαντική ανησυχία προκαλούν οι παραπλανητικά αυξημένες τιμές MIC που προκύπτουν για την AMB με τη μέθοδο Vitek 2 για την πλειοψηφία των στελεχών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη (EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διπλάσιων αραιώσεων 29%/40%), αποδίδοντας 31% CA (69% MaEs), η οποία είναι σύμφωνη με προηγούμενες αναφορές [92], [108], [110]. Μόνο τα στελέχη κλάδου II δεν κατηγοριοποιήθηκαν εσφαλμένα ως ανθεκτικά στην AMB σύμφωνα με τη μέθοδο Vitek 2 (100% CA), σε αντίθεση με άλλες μελέτες [91], [109]. Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη για το αντιμυκητικό AMB με τη μέθοδο CLSI συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (επικρατούσα MIC και MIC₉₀ 0,5 και 2 mg/L έναντι 1 και 2 mg/L, αντίστοιχα) [75], [92], [109], [132], με την πλειοψηφία των τιμών MIC να συγκεντρώνονται μεταξύ 1-2 διπλάσιων αραιώσεων χαμηλότερα από τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (2 mg/L) [86]. Στελέχη με γνωστούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας δεν συμπεριλήφθηκαν στην σύγκριση των μεθόδων CLSI-Vitek 2. Σημειωτέων, δεν έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ των φαινοτυπικά ανθεκτικών στην AMB στελεχών *C. auris* μεταλλάξεις εντός των γονιδίων *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* και/ή *ERG10*, που είχαν συσχετιστεί με αντίσταση στην AMB σε άλλα *Candida spp.*, επομένως η αντίσταση δεν μπορούσε να επαληθευτεί μοριακά [130], [136], [137]. Στην πραγματικότητα, οι πρώτοι μηχανισμοί που σχετίζονται με κλινική αντίσταση στην AMB για την *C. auris*, μόλις πρόσφατα αποδόθηκαν σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERG6* [81] και *ERG3* [127]. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντίσταση στην AMB για την *C. auris* είναι επαγωγίμη και παροδική, με τις τιμές MIC μερικών στελεχών να μειώνονται μετά τη μετάβασή τους στο εργαστήριο [138].

Ανεξαρτήτως κλάδου, έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες [75], [92], [109], [132] μονοκόρυφες κατανομές τιμών MIC για την AMB με τη μέθοδο CLSI, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματά μας, που δείχνουν χαμηλή αντοχή στο συγκεκριμένο αντιμυκητικό. Τα παραπάνω επικυρώνονται περαιτέρω από μία πρόσφατη μετα- ανάλυση στην παγκόσμια επιδημιολογία της *C. auris*, που υποδεικνύει ένα συνολικό ποσοστό αντίστασης στην AMB 12% [9]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC (2 mg/L), έχει αναφερθεί, με τη μέθοδο Vitek 2, ένα ποσοστό ανθεκτικότητας στην AMB 94% (επικρατούσα MIC και MIC₉₀, 8 και >16 mg/L, αντίστοιχα), το οποίο

αποτελούνταν από 48 στελέχη *C. auris* από την Κολομβία [92], [139]. Ενδιαφέρον παρουσίασε η επαναξιολόγηση αυτού του ποσοστού με τη μέθοδο Etest, το οποίο μειώθηκε στο 15% (επικρατούσα MIC και MIC₉₀, 1 και 2 mg/L, αντίστοιχα) [92], [139]. Αντίστοιχα αποτελέσματα, ελέγχθησαν για 90 στελέχη *C. auris* από την Ινδία, των οποίων το ποσοστό ανθεκτικότητας στην AMB ήταν 100% με βάση τα εξαγόμενα αποτελέσματα με τη μέθοδο Vitek 2 (επικρατούσα MIC και MIC₉₀, 8 και >16 mg/L, αντίστοιχα), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό με τη μέθοδο Etest ήταν μόλις 1% (επικρατούσα MIC και MIC₉₀, 0,5 και 0,5 mg/L, αντίστοιχα) [108]. Ανησυχητική φαίνεται, ακόμη, η υπερεκτίμηση του ποσοστού αντοχής στην AMB, που αποδείχθηκε και με την ευρέως χρησιμοποιούμενη εμπορική μέθοδο ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας που βασίζεται στη BMD, SYO [94]. Τα παραπάνω επισημαίνουν την αξιοσημείωτη μεταβλητότητα στις τιμές MIC στην AMB που παρουσιάζονται για την *C. auris* με διάφορες μεθόδους ελέγχου, όπως υποστηρίζεται πρόσφατα από τη CLSI [93], και απαιτούν τον ορισμό ειδικών για τη μέθοδο ECVs. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το ποσοστό αντοχής για τα προαναφερθέντα στελέχη *C. auris* από την Κολομβία και την Ινδία, θα μειωνόταν στο 8% και 0%, αντίστοιχα, εάν υιοθετούνταν η ειδική για το Vitek 2 WT-ULV της AMB των 16 mg/L που προτείνονται στην παρούσα μελέτη.

Καθώς τα περισσότερα στελέχη *C. auris*, είναι ανθεκτικά στη FLC (91%) [9], υπάρχουν ευαίσθητα στη FLC στελέχη, ιδιαίτερα εντός του κλάδου II και σε μικρότερα ποσοστά εντός των κλάδων I και IV [137], κάτι που συμφωνεί με τις ειδικές για τον κλάδο κατανομές CLSI για τη FLC που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Παρόλο που έχουν αναφερθεί επίμονες ή εκ διαφυγής λοιμώξεις από *C. auris* προερχόμενες από ευαίσθητα στη FLC στελέχη (MICs 2-8 mg/L) [140], που αμφισβητούν τα δοκιμαστικά όρια ευαισθησίας που προτείνει ο CDC (32 mg/L) [86], φαίνεται κρίσιμης σημασίας η ύπαρξη μιας μεθόδου ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας που θα παρέχει υψηλό ποσοστό ακριβών και αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τα ευρήματα στην παρούσα μελέτη, κανένα από τα παραπάνω κριτήρια δεν φαίνεται να καλύπτονται με τη μέθοδο Vitek 2 για το αντιμυκητικό FLC έναντι στελεχών *C. auris*. Συνολικά, τα MIC που ελήφθησαν με τη μέθοδο Vitek 2 για το αντιμυκητικό FLC ήταν 2 διαδοχικές διπλές αραιώσεις χαμηλότερα από τα MIC που ελήφθησαν με την πρότυπη μέθοδο CLSI (EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διαδοχικές διπλές αραιώσεις, 16%/78%), οδηγώντας σε 69% CA (0%, MaEs, 31% VmEs), όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες [92], [108], [110]. Επιπλέον,

καταγράφηκε 30% κατηγορική ασυμφωνία μεταξύ των ανεξάρτητων επαναληπτικών δόκιμων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Vitek 2 ήταν τόσο ειδο-, όσο και φαρμακο- ειδική, καθώς το πάνελ ευαισθησίας δεν είναι ακόμη επικυρωμένο για μεθόδους ελέγχου αντιμυκητική ευαισθησίας στελεχών *C. auris*. Ωστόσο, δεν είναι ασυνήθιστο για τα εργαστήρια να «εκμεταλλεύονται» τις κάρτες μικροαραιώσεων του Vitek 2 αλλάζοντας τον ορισμό του είδους σε έναν έγκυρο, ώστε να επιτρέπεται η επεξεργασία του στελέχους από το μηχάνημα σε περιπτώσεις που χρειάζεται να ληφθούν άμεσα θεραπευτικές αποφάσεις. Περιέργως, οι Korem et al. έδειξαν ότι η τροποποίηση της κάρτας AST-YS08 για την αξιολόγηση της επάρκειας των τιμών MIC της FLC για την *C. glabrata* ρυθμίζοντας το λογισμικό Vitek 2 να αξιολογεί τις τιμές MIC έναντι *C. albicans*, οδήγησε σε 12% VmEs [141]. Ως εκ τούτου, τα εργαστήρια θα πρέπει να γνωρίζουν ότι η τροποποίηση του είδους μπορεί να μην είναι ακριβής προσέγγιση για τη δόκιμη ευαισθησίας της *C. auris* στη FLC. Ωστόσο, μία εναλλακτική προσέγγιση για την ανίχνευση ανθεκτικών στη FLC στελεχών *C. auris* θα μπορούσε να είναι η υιοθέτηση της ειδικής για το Vitek 2 WT-ULV της FLC των 4 mg/L, που προτείνεται στην παρούσα μελέτη, η οποία θα αύξανε την CA στο 96% (1% MaEs, 3% VmEs).

Αν και τα ανθεκτικά στη FLC στελέχη *C. auris* μπορεί να ανταποκρίνονται περιστασιακά σε άλλες τριαζόλες, κρίνεται επί του παρόντος σημαντική η χρήση ενός προφίλ ευαισθησίας στη FLC ως δείκτης εκτίμησης της ευαισθησίας σε τριαζόλες δεύτερης γενιάς [86]. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη για τη VRC με τη μέθοδο CLSI είναι συγκρίσιμα με εκείνα που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες, ότι δηλαδή επιδεικνύουν κατανομές MIC ευρείας κλίμακας (που εκκλίνονται από 5 έως 12 διπλάσιες αραιώσεις) ανεξαρτήτως κλάδου [26], [75], [92], [108], [109]. Οι τιμές MIC για τη VRC με τη μέθοδο Vitek 2 δεν διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες τιμές MIC με τη μέθοδο CLSI (EA εντός $\pm 1/\pm 2$ διπλάσιες αραιώσεις, 61%/86%), κάτι που συμφωνεί με άλλες αναφορές [109], [110].

Είναι πολύ πιθανό για την ευρεία κατανομή των τιμών MIC που παρουσιάστηκε, να ευθύνεται η συσσώρευση πολλαπλών μηχανισμών αντίστασης των στελεχών *C. auris*, και επομένως τα περισσότερα από τα στελέχη θα πρέπει να θεωρούνται ανθεκτικά, καθώς οι τιμές MIC της VRC που συλλέχθηκαν με τη μέθοδο CLSI συσχετίστηκαν με εκείνες της FLC με την ίδια μέθοδο (Pearson r (95% CI) 0,62 (0,48-0,73), $p < 0,0001$). Λαμβάνοντας

υπόψη τη FLC ως υποκατάστατο δείκτη αντοχής στις αζόλες, μία WT-ULV για τη VRC των 0,06 mg/L θα είχε ως αποτέλεσμα 90% CA μεταξύ των δύο φαρμάκων με 6% MaE και 4% VmE (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), καθιστώντας τα περισσότερα στελέχη ανθεκτικά στη VRC, όπως και στη FLC. Μία WT-ULV των 0,06 mg/L για τη VRC είναι χαμηλότερη από το εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθεται στις κάρτες Vitek 2 (κατώτατο εύρος τιμών MIC =0,125 mg/L) [121], το οποίο σε συνδυασμό με τις τιμές MIC που εντοπίζονται στα άκρα της κατανομής, δυσκολεύει την εκτίμηση της CA με τη μέθοδο CLSI.

Σχετικά με τη 5FC, τα δεδομένα για την ευαισθησία με τη μέθοδο CLSI που συγκεντρώθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι σύμφωνα με αυτά που περιγράφηκαν σε προηγούμενες αναφορές (επικρατούσα MIC και MIC₉₀, 0,125, 0,06 και 0,125 mg/L έναντι 0,06-0,125 και 0,25-64 mg/L, αντίστοιχα) [75], [110], [132]. Η ΕΑ μεταξύ CLSI και Vitek 2 ήταν χαμηλή (0% και 3% εντός ±1 και ±2 διπλάσιων αραιώσεων, αντίστοιχα), καθώς η συντριπτική πλειοψηφία (94%) των τιμών MIC με τη μέθοδο Vitek 2 συγκεντρώνονταν στο κατώτερο εύρος συγκεντρώσεων που παρατίθεται στις κάρτες Vitek 2, όπως περιγράφηκε προηγουμένως [110]. Δεδομένου ότι η τιμή 1 mg/L είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που περιέχεται στην κάρτα Vitek 2 AST-YS08 [121], το εύρος των συγκεντρώσεων της θα πρέπει να επεκταθεί για να καταστήσει δυνατή την περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας της *C. auris*.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η *C. auris* μπορεί να γίνει η κινητήριος δύναμη στην ευρεία εφαρμογή μεθόδων ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας λόγω των υψηλών επιπέδων τεκμηριωμένης αντίστασης, τα οποία μπορούν να χαρακτηριστούν από τοπικά πρότυπα. Η μέθοδος Vitek 2 επιτρέπει τη σωστή κατηγοριοποίηση όλων των ανθεκτικών στις εχινοκανδίνες στελεχών που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FKSI*. Αντίθετα, η ευαισθησία της *C. auris* στη FLC και στην AMB θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή, σύμφωνα με τα δοκιμαστικά όρια ευαισθησίας που έχει θεσπίσει ο CDC (32 και 2 mg/L, αντίστοιχα) [86], εάν η αυτοματοποιημένη μέθοδος ελέγχου αντιμυκητικής ευαισθησίας, Vitek 2, χρησιμοποιείται για την καθοδήγηση θεραπευτικών αποφάσεων. Τα εργαστήρια θα πρέπει να λάβουν υπόψη ότι τα στελέχη *C. auris* που εμφανίζουν τιμές MIC στην AMB ≤ 16 mg/L μπορεί να υποδηλώνουν ευαισθησία, ενώ τιμές MIC >4 mg/L για τη FLC μπορεί να υποδεικνύουν αντίσταση, με τη μέθοδο Vitek 2. Απαιτούνται περαιτέρω πολυκεντρικές αξιολογήσεις για να επιβεβαιωθούν τα τρέχοντα ευρήματα και

να καθοριστούν τα ειδικά για το Vitek 2 ECVs, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ερμηνεία των δεδομένων ευαισθησίας με τη μέθοδο Vitek 2.

Συνοψίζοντας, το σύστημα Vitek 2 επέτρεψε τη σωστή κατηγοριοποίηση όλων των R στις εχνοκανδίνες στελεχών *C. auris*. Αντίθετα, η ευαισθησία της *C. auris* στη FLU και την AMB θα πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή σύμφωνα με δοκιμαστικά όρια των CDC, εάν το σύστημα Vitek 2 χρησιμοποιείται για την καθοδήγηση θεραπευτικών αποφάσεων.

Συμμετοχή σε δράσεις διάχυσης μελέτης

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό *Journal of Clinical Microbiology*

M. Siopi, I. Pachoulis, S. Leventaki, B. Spruijtenburg, J. F. Meis, S. Pournaras, G. Vrioni, A. Tsakris, J. Meletiadis. Evaluation of the Vitek 2 system for antifungal susceptibility testing of *C. auris* using a representative international panel of clinical isolates: overestimation of amphotericin B resistance and underestimation of fluconazole resistance. *JCM* 2024 (ahead of print)

Επιπλέον, έγιναν δεκτά για παρουσίαση σε διεθνή συνέδρια με κριτές. Ειδικότερα,

1. S. Leventaki, I. Pachoulis, M. Siopi, M.-I. Beredaki, I. Peroukidou, B. Spruijtenburg, T. de Groot, J. F. Meis, S. Pournaras, G. Vrioni, A. Tsakris, J. Meletiadis. Comparative evaluation of Sensititre YeastOne and CLSI reference method for antifungal susceptibility testing of *C. auris* (P059, αναρτημένη ανακοίνωση). 11th Trends in Medical Mycology, 20-23/10/2023, Athens, Greece - **Η εργασία έλαβε το Young Investigator Travel Award**

2. I. Pachoulis, S. Leventaki, M. Siopi, B. Spruijtenburg, T. de Groot, J. F. Meis, S. Pournaras, G. Vrioni, A. Tsakris, J. Meletiadis. Discrepancies in susceptibility testing of *C. auris* with the Vitek 2 system using a representative international panel of clinical isolates (P063, αναρτημένη ανακοίνωση). 11th Trends in Medical Mycology, 20-23/10/2023, Athens, Greece

3. M. Siopi, I. Pachoulis, S. Leventaki, B. Spruijtenburg, J. F. Meis, S. Pournaras, G. Vrioni, A. Tsakris, J. Meletiadis. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution MICs of ten antifungal agents using a representative international collection of *C. auris* isolates (flash eposter). 34th ECCMID, 27-30/04/2024, Barcelona, Spain

4. M. Siopi, S. Leventaki, I. Pachoulis, B. Spruijtenburg, J. F. Meis, S. Pournaras, G. Vrioni, A. Tsakris, J. Meletiadis. Comparative evaluation of gradient concentration strip and reference CLSI methods for antifungal susceptibility testing of *C. auris* using a representative international panel of isolates (αναρτημένη ανακοίνωση). 34th ECCMID, 27-30/04/2024, Barcelona, Spain

Βιβλιογραφία

- [1] K. Satoh, K. Makimura, Y. Hasumi, Y. Nishiyama, K. Uchida, and H. Yamaguchi, “Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital,” *Microbiol. Immunol.*, vol. 53, no. 1, pp. 41–44, 2009, doi: 10.1111/J.1348-0421.2008.00083.X.
- [2] A. Chowdhary *et al.*, “New clonal strain of Candida auris, Delhi, India,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 10, pp. 1670–1673, Oct. 2013, doi: 10.3201/EID1910.130393.
- [3] R. E. Magobo, C. Corcoran, S. Seetharam, and N. P. Govender, “Candida auris-associated candidemia, South Africa,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 7, Jul. 2014, doi: 10.3201/EID2007.131765.
- [4] S. Vallabhaneni *et al.*, “Investigation of the First Seven Reported Cases of Candida auris, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016,” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 65, no. 44, pp. 1234–1237, Nov. 2016, doi: 10.15585/MMWR.MM6544E1.
- [5] S. Schelenz *et al.*, “First hospital outbreak of the globally emerging Candida auris in a European hospital,” *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 5, no. 1, Oct. 2016, doi: 10.1186/S13756-016-0132-5.
- [6] C. R. Lan *et al.*, “Incursions of Candida auris into Australia, 2018,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 6, pp. 1326–1328, Jun. 2020, doi: 10.3201/EID2606.190936.
- [7] A. Chakrabarti and P. Sood, “On the emergence, spread and resistance of Candida auris: host, pathogen and environmental tipping points,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 70, no. 3, Feb. 2021, doi: 10.1099/JMM.0.001318.
- [8] A. Ruiz-Gaitán *et al.*, “Detection and treatment of Candida auris in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 17, no. 4, pp. 295–305, Apr. 2019, doi: 10.1080/14787210.2019.1592675.
- [9] J. Chen *et al.*, “Is the superbug fungus really so scary? A systematic review and meta-analysis of global epidemiology and mortality of Candida auris,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 20, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1186/S12879-020-05543-0.
- [10] S. Kathuria *et al.*, “Multidrug-Resistant Candida auris Misidentified as Candida haemulonii: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of

Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 6, pp. 1823–1830, Jun. 2015, doi: 10.1128/JCM.00367-15.

[11]L. Černáková, M. Roudbary, S. Brás, S. Tafaj, and C. F. Rodrigues, “Candida auris: A Quick Review on Identification, Current Treatments, and Challenges,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 9, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22094470.

[12]A. Chowdhary, C. Sharma, and J. F. Meis, “Candida auris: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally,” *PLoS Pathog.*, vol. 13, no. 5, May 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1006290.

[13]A. M. Tortorano, A. Prigitano, G. Morroni, L. Brescini, and F. Barchiesi, “Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches,” *Infect. Drug Resist.*, vol. 14, pp. 5543–5553, 2021, doi: 10.2147/IDR.S274872.

[14]S. Khojasteh *et al.*, “Candida auris and COVID-19: A health threatening combination,” *Curr. Med. Mycol.*, vol. 8, no. 3, p. 44, Sep. 2022, doi: 10.18502/CMM.8.3.11211.

[15]K. Vinayagamoorthy, K. C. Pentapati, and H. Prakash, “Prevalence, risk factors, treatment and outcome of multidrug resistance Candida auris infections in Coronavirus disease (COVID-19) patients: A systematic review,” *Mycoses*, vol. 65, no. 6, pp. 613–624, Jun. 2022, doi: 10.1111/MYC.13447.

[16]“2019 Antibiotic Resistance Threats Report | CDC.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>

[17]“WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>

[18]“A Mysterious Infection, Spanning the Globe in a Climate of Secrecy - The New York Times.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.nytimes.com/2019/04/06/health/drug-resistant-candida-auris.html>

[19]J. Rhodes and M. C. Fisher, “Global epidemiology of emerging Candida auris,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 52, pp. 84–89, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.MIB.2019.05.008.

[20]A. D. Chybowska, D. S. Childers, and R. A. Farrer, “Nine Things Genomics Can Tell Us About Candida auris,” *Front. Genet.*, vol. 11, Apr. 2020, doi: 10.3389/FGENE.2020.00351.

- [21]J. F. Muñoz *et al.*, “Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41467-018-07779-6.
- [22]P. Saluja and G. S. Prasad, “*Candida ruelliae* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers of *Ruellia* sp. (Acanthaceae),” *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 660–666, Jun. 2008, doi: 10.1111/J.1567-1364.2008.00372.X.
- [23]S. A. Wang, J. H. Jia, and F. Y. Bai, “*Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 94, no. 2, pp. 257–265, Aug. 2008, doi: 10.1007/S10482-008-9238-Y.
- [24]N. A. Chow *et al.*, “Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses,” *MBio*, vol. 11, no. 2, Mar. 2020, doi: 10.1128/MBIO.03364-19.
- [25]G. Bravo Ruiz and A. Lorenz, “What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*?,” *Microbiol. Res.*, vol. 242, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.MICRES.2020.126621.
- [26]B. Spruijtenburg *et al.*, “Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 11, no. 1, pp. 2405–2411, 2022, doi: 10.1080/22221751.2022.2125349.
- [27]N. A. Chow, T. De Groot, H. Badali, M. Abastabar, T. M. Chiller, and J. F. Meis, “Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 25, no. 9, pp. 1780–1781, 2019, doi: 10.3201/EID2509.190686.
- [28]J. F. Muñoz *et al.*, “Clade-specific chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins in *Candida auris*,” *Genetics*, vol. 218, no. 1, May 2021, doi: 10.1093/GENETICS/IYAB029.
- [29]N. A. Chow *et al.*, “Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey,” *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 12, p. 1377, Dec. 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30597-8.
- [30]A. Hamprecht *et al.*, “*Candida auris* in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 25, no. 9, pp. 1763–1765, 2019, doi: 10.3201/EID2509.190262.
- [31]S. R. Lockhart *et al.*, “Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris*

- on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 64, no. 2, pp. 134–140, Jan. 2017, doi: 10.1093/CID/CIW691.
- [32] A. Casadevall, D. P. Kontoyiannis, and V. Robert, “Environmental *Candida auris* and the Global Warming Emergence Hypothesis,” *MBio*, vol. 12, no. 2, pp. 1–3, Mar. 2021, doi: 10.1128/MBIO.00360-21.
- [33] B. R. Jackson *et al.*, “On the Origins of a Species: What Might Explain the Rise of *Candida auris*?” *J. fungi (Basel, Switzerland)*, vol. 5, no. 3, Sep. 2019, doi: 10.3390/JOF5030058.
- [34] R. Ben-Ami *et al.*, “Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 1, pp. 195–203, Feb. 2017, doi: 10.3201/EID2302.161486.
- [35] A. M. Borman, A. Szekely, and E. M. Johnson, “Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species,” *mSphere*, vol. 1, no. 4, Aug. 2016, doi: 10.1128/MSPHERE.00189-16.
- [36] A. B. Akinbobola, R. Kean, S. M. A. Hanifi, and R. S. Quilliam, “Environmental reservoirs of the drug-resistant pathogenic yeast *Candida auris*,” *PLoS Pathog.*, vol. 19, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1011268.
- [37] N. Thatchanamoorthy, V. Rukumani Devi, S. Chandramathi, and S. T. Tay, “*Candida auris*: A Mini Review on Epidemiology in Healthcare Facilities in Asia,” *J. Fungi*, vol. 8, no. 11, p. 1126, Nov. 2022, doi: 10.3390/JOF8111126.
- [38] R. Biran *et al.*, “Nationwide Outbreak of *Candida auris* Infections Driven by COVID-19 Hospitalizations, Israel, 2021–2022,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 29, no. 7, p. 1302, Jul. 2023, doi: 10.3201/EID2907.221888.
- [39] A. F. Kurt *et al.*, “*Candida auris* Fungemia and a local spread taken under control with infection control measures: First report from Turkey,” *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 39, no. 2, pp. 228–230, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.IJMMB.2021.03.007.
- [40] R. Dangarembizi, S. Wasserman, and J. C. Hoving, “Emerging and re-emerging fungal threats in Africa,” *Parasite Immunol.*, vol. 45, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1111/PIM.12953.
- [41] N. P. Govender *et al.*, “*Candida auris* in South Africa, 2012–2016,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 11, p. 2036, Nov. 2018, doi: 10.3201/EID2411.180368.
- [42] R. D. Adam *et al.*, “Analysis of *Candida auris* fungemia at a single facility in Kenya,”

Int. J. Infect. Dis., vol. 85, pp. 182–187, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ijid.2019.06.001.

[43]R. Oladele, J. N. Uwanibe, I. B. Olawoye, A. W. O. Ettu, J. F. Meis, and C. T. Happi, “Emergence and Genomic Characterization of Multidrug Resistant *Candida auris* in Nigeria, West Africa,” *J. Fungi*, vol. 8, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.3390/JOF8080787.

[44]H. Zerrouki *et al.*, “Emergence of *Candida auris* in intensive care units in Algeria,” *Mycoses*, vol. 65, no. 7, p. 753, Jul. 2022, doi: 10.1111/MYC.13470.

[45]“Epidemiological Alert: *Candida auris* outbreaks in health care services in the context of the COVID-19 pandemic - 6 February 2021 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-candida-auris-outbreaks-health-care-services-context-covid-19>

[46]M. Lyman *et al.*, “Worsening Spread of *Candida auris* in the United States, 2019 to 2021,” <https://doi.org/10.7326/M22-3469>, vol. 176, no. 4, pp. 489–495, Mar. 2023, doi: 10.7326/M22-3469.

[47]K. Benedict, K. Forsberg, J. A. W. Gold, J. Baggs, and M. Lyman, “*Candida auris*–Associated Hospitalizations, United States, 2017–2022,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 29, no. 7, pp. 1485–1487, Jul. 2023, doi: 10.3201/EID2907.230540.

[48]“Tracking *Candida auris* | *Candida auris* | Fungal Diseases | CDC.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>

[49]P. Escandón, D. H. Cáceres, D. Lizarazo, S. R. Lockhart, M. Lyman, and C. Duarte, “Laboratory-based surveillance of *Candida auris* in Colombia, 2016–2020,” *Mycoses*, vol. 65, no. 2, p. 222, Feb. 2022, doi: 10.1111/MYC.13390.

[50]C. C. de Melo, B. R. de Sousa, G. L. da Costa, M. M. E. Oliveira, and R. G. de Lima-Neto, “Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 13, Jan. 2023, doi: 10.3389/FCIMB.2023.1033707.

[51]A. Kohlenberg *et al.*, “*Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017,” *Eurosurveillance*, vol. 23, no. 13, Mar. 2018, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.13.18-00136.

[52]D. Plachouras *et al.*, “*Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area*, January 2018 to

May 2019,” *Eurosurveillance*, vol. 25, no. 12, p. 1, Mar. 2020, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.2000240.

[53] A. Kohlenberg *et al.*, “Increasing number of cases and outbreaks caused by *Candida auris* in the EU/EEA, 2020 to 2021,” *Eurosurveillance*, vol. 27, no. 46, Nov. 2022, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.46.2200846.

[54] A. Stathi *et al.*, “Isolation of *Candida auris* from cystic fibrosis patient, Greece, April 2019,” *Euro Surveill.*, vol. 24, no. 29, Jul. 2019, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.29.1900400.

[55] M. Katsiari *et al.*, “Emergence of Clonally-Related South Asian Clade I Clinical Isolates of *Candida auris* in a Greek COVID-19 Intensive Care Unit,” *J. Fungi*, vol. 9, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/JOF9020243/S1.

[56] M. Siopi *et al.*, “Epidemiological Trends of Fungemia in Greece with a Focus on Candidemia during the Recent Financial Crisis: a 10-Year Survey in a Tertiary Care Academic Hospital and Review of Literature,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 64, no. 3, 2020, doi: 10.1128/AAC.01516-19.

[57] “M. Siopi, P. Paranos, A. Tarpatzi, S. Pournaras, J. Meletiadis, ‘Alarming change in epidemiology of ICU-acquired candidaemia in a Greek teaching hospital during the COVID-19 era: worrisome emergence of *Candida auris*.’,” 33d ECCMID, Copenhagen, Denmark, 2023.

[58] S. M. Chew, N. Sweeney, S. E. Kidd, and C. Reed, “*Candida auris* arriving on our shores: an Australian microbiology laboratory’s experience,” *Pathology*, vol. 51, no. 4, pp. 431–433, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.pathol.2019.01.009.

[59] S. Fox-Lewis *et al.*, “*Candida auris*: lessons learnt from the first detected case in Aotearoa New Zealand,” *N. Z. Med. J.*, vol. 136, no. 1580, pp. 78–80, Aug. 2023, Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37536315/>

[60] T. Vila, D. Montelongo-Jauregui, H. Ahmed, T. Puthran, A. S. Sultan, and M. A. Jabra-Rizk, “Comparative Evaluations of the Pathogenesis of *Candida auris* Phenotypes and *Candida albicans* Using Clinically Relevant Murine Models of Infections,” *mSphere*, vol. 5, no. 4, Aug. 2020, doi: 10.1128/MSPHERE.00760-20.

[61] M. Abe *et al.*, “Potency of gastrointestinal colonization and virulence of *Candida auris* in a murine endogenous candidiasis,” *PLoS One*, vol. 15, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0243223.

- [62]S. L. Lima, L. Rossato, and A. Salles de Azevedo Melo, “Evaluation of the potential virulence of *Candida haemulonii* species complex and *Candida auris* isolates in *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model and correlation to their biofilm production capacity,” *Microb. Pathog.*, vol. 148, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.MICPATH.2020.104461.
- [63]D. Romera *et al.*, “The *Galleria mellonella* infection model as a system to investigate the virulence of *Candida auris* strains,” *Pathog. Dis.*, vol. 78, no. 9, Dec. 2020, doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA067.
- [64]M. V. Horton *et al.*, “*Candida auris* Forms High-Burden Biofilms in Skin Niche Conditions and on Porcine Skin,” *mSphere*, vol. 5, no. 1, Feb. 2020, doi: 10.1128/MSPHERE.00910-19.
- [65]M. Polke, B. Hube, and I. D. Jacobsen, “*Candida* survival strategies,” *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 91, pp. 139–235, 2015, doi: 10.1016/BS.AAMBS.2014.12.002.
- [66]S. Chatterjee, S. V. Alampalli, R. K. Nageshan, S. T. Chettiar, S. Joshi, and U. S. Tatu, “Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*,” *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, Sep. 2015, doi: 10.1186/S12864-015-1863-Z.
- [67]S. Fanning and A. P. Mitchell, “Fungal biofilms,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 4, 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002585.
- [68]C. J. Johnson, J. M. Davis, A. Huttenlocher, J. F. Kernien, and J. E. Nett, “Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack,” *MBio*, vol. 9, no. 4, Jul. 2018, doi: 10.1128/MBIO.01403-18.
- [69]J. E. Nett, “*Candida auris*: An emerging pathogen ‘incognito’?,” *PLoS Pathog.*, vol. 15, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1007638.
- [70]C. A and S. S, “Multidrug-resistant *Candida auris*: an epidemiological review,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 18, no. 6, 2020, doi: 10.1080/14787210.2020.1750368.
- [71]D. Satala *et al.*, “Similarities and Differences among Species Closely Related to *Candida albicans*: *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, and *C. auris*,” *Cell. Microbiol.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/2599136.
- [72]T. Di Mambro, I. Guerriero, L. Aurisicchio, M. Magnani, and E. Marra, “The Yin and Yang of Current Antifungal Therapeutic Strategies: How Can We Harness Our Natural Defenses?,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. FEB, 2019, doi: 10.3389/FPHAR.2019.00080.
- [73]“Treatment and Management of *C. auris* Infections and Colonization | *Candida auris* | Fungal Diseases | CDC.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available:

<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>

- [74]R. Kean and G. Ramage, “Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*,” *mSphere*, vol. 4, no. 4, Aug. 2019, doi: 10.1128/MSPHERE.00458-19.
- [75]A. Szekely, A. M. Borman, and E. M. Johnsona, “*Candida auris* Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 57, no. 5, May 2019, doi: 10.1128/JCM.02055-18.
- [76]S. Hu *et al.*, “Retrospective Analysis of the Clinical Characteristics of *Candida auris* Infection Worldwide From 2009 to 2020,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.658329.
- [77]L. Rossato and A. L. Colombo, “*Candida auris*: What Have We Learned About Its Mechanisms of Pathogenicity?,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. DEC, Dec. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.03081.
- [78]A. Yadav *et al.*, “*Candida auris* on Apples: Diversity and Clinical Significance,” *MBio*, vol. 13, no. 2, Apr. 2022, doi: 10.1128/MBIO.00518-22.
- [79]B. Ostrowsky *et al.*, “*Candida auris* Isolates Resistant to Three Classes of Antifungal Medications - New York, 2019,” *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 69, no. 1, pp. 6–9, Jan. 2020, doi: 10.15585/MMWR.MM6901A2.
- [80]C. Sharma, N. Kumar, R. Pandey, J. F. Meis, and A. Chowdhary, “Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation,” *New microbes new Infect.*, vol. 13, pp. 77–82, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.NMNI.2016.07.003.
- [81]J. M. Rybak *et al.*, “In vivo emergence of high-level resistance during treatment reveals the first identified mechanism of amphotericin B resistance in *Candida auris*,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 28, no. 6, p. 838, 2022, doi: 10.1016/J.CMI.2021.11.024.
- [82]S. Tsay, A. Kallen, B. R. Jackson, T. M. Chiller, and S. Vallabhaneni, “Approach to the Investigation and Management of Patients With *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 66, no. 2, pp. 306–311, Jan. 2018, doi: 10.1093/CID/CIX744.
- [83]E. K. Dennis, S. Chaturvedi, and V. Chaturvedi, “So Many Diagnostic Tests, So Little Time: Review and Preview of *Candida auris* Testing in Clinical and Public Health

- Laboratories,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, Oct. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.757835.
- [84]T. P. McCarty, P. M. Luethy, J. W. Baddley, and P. G. Pappas, “Clinical utility of antifungal susceptibility testing,” *JAC-Antimicrobial Resist.*, vol. 4, no. 3, Jun. 2022, doi: 10.1093/JACAMR/DLAC067.
- [85]E. L. Berkow, S. R. Lockhart, and L. Ostrosky-Zeichner, “Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 3, Jul. 2020, doi: 10.1128/CMR.00069-19.
- [86]“Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation | Candida auris | Fungal Diseases | CDC.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>
- [87]M. C. Arendrup, A. Prakash, J. Meletiadis, C. Sharma, and A. Chowdhary, “Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.1128/AAC.00485-17.
- [88]“EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts”.
- [89]“CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.” Accessed: Jan. 22, 2024. [Online]. Available: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>
- [90]M. Cuenca-Estrella and J. L. Rodriguez-Tudela, “The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 8, no. 3, pp. 267–276, Mar. 2010, doi: 10.1586/ERI.10.2.
- [91]J. H. Shin *et al.*, “Detection of Amphotericin B Resistance in *Candida haemulonii* and Closely Related Species by Use of the Etest, Vitek-2 Yeast Susceptibility System, and CLSI and EUCAST Broth Microdilution Methods,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 6, p. 1852, Jun. 2012, doi: 10.1128/JCM.06440-11.
- [92]A. Ceballos-Garzon *et al.*, “Head-to-head comparison of CLSI, EUCAST, Etest and VITEK®2 results for *Candida auris* susceptibility testing,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 59, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2022.106558.
- [93]“AST News Update June 2022: Hot Topic.” Accessed: Dec. 15, 2023. [Online].

Available: <https://clsi.org/about/blog/ast-news-update-june-2022-hot-topic/>

[94] M. Siopi *et al.*, “Overestimation of Amphotericin B Resistance in *Candida auris* with Sensititre YeastOne Antifungal Susceptibility Testing: a Need for Adjustment for Correct Interpretation,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 11, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1128/SPECTRUM.04431-22.

[95] A. C. Ruiz-Gaitán, E. Cantón, M. E. Fernández-Rivero, P. Ramírez, and J. Pemán, “Outbreak of *Candida auris* in Spain: A comparison of antifungal activity by three methods with published data,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 53, no. 5, pp. 541–546, May 2019, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2019.02.005.

[96] “Instructions for Use Thermo Scientific Sensititre YeastOne Susceptibility Plates,” 2017, Accessed: Dec. 16, 2023. [Online]. Available: www.trekds.com/techinfo.

[97] S. E. Kidd, L. C. Crawford, and C. L. Halliday, “Antifungal Susceptibility Testing and Identification,” *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 35, no. 2, pp. 313–339, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.IDC.2021.03.004.

[98] E. Cantón *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* Species as Determined by the Colorimetric Sensititre YeastOne Method,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 12, p. 3921, Dec. 2012, doi: 10.1128/JCM.01730-12.

[99] A. Espinel-Ingroff *et al.*, “Multicenter Study of Epidemiological Cutoff Values and Detection of Resistance in *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Miconazole Using the Sensititre YeastOne Colorimetric Method,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 11, p. 6725, Nov. 2015, doi: 10.1128/AAC.01250-15.

[100] A. Espinel-Ingroff *et al.*, “Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Triazole Resistance in *Candida* and *Aspergillus* Species for the Sensititre YeastOne Colorimetric Broth and Etest Agar Diffusion Methods,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 63, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1128/AAC.01651-18.

[101] E. Dannaoui and A. Espinel-Ingroff, “Antifungal Susceptibility Testing by Concentration Gradient Strip Etest Method for Fungal Isolates: A Review,” *J. Fungi*, vol. 5, no. 4, Dec. 2019, doi: 10.3390/JOF5040108.

[102] “Etest antifungal susceptibility testing.” [Online]. Available: <https://www.illexmedical.com/files/E-test-Package->

Insert/AntifungalSusceptibilityTesting.pdf%0A%0A

[103] “© Liofilchem ®-MTS™ MTS™ Instructions For Use 2022.,” p. 6, Accessed: Dec. 16, 2023. [Online]. Available: www.liofilchem.com/MTS/US

[104] A. Espinel-Ingroff *et al.*, “Multicenter Study of Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to Amphotericin B and Echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1128/AAC.01792-16.

[105] A. Espinel-Ingroff *et al.*, “Etest ECVs/ECOFFs for Detection of Resistance in Prevalent and Three Nonprevalent *Candida* spp. to Triazoles and Amphotericin B and *Aspergillus* spp. to Caspofungin: Further Assessment of Modal Variability,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 65, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.1128/AAC.01093-21.

[106] C. Durand, D. Maubon, M. Cornet, Y. Wang, D. Aldebert, and C. Garnaud, “Can We Improve Antifungal Susceptibility Testing?,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 11, Sep. 2021, doi: 10.3389/FCIMB.2021.720609.

[107] N. P. Wiederhold, “Antifungal Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians,” *Open forum Infect. Dis.*, vol. 8, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.1093/OFID/OFAB444.

[108] P. Mathur, F. Hasan, P. K. Singh, R. Malhotra, K. Walia, and A. Chowdhary, “Five-year profile of candidaemia at an Indian trauma centre: High rates of *Candida auris* blood stream infections,” *Mycoses*, vol. 61, no. 9, pp. 674–680, Sep. 2018, doi: 10.1111/MYC.12790.

[109] Y. J. Kwon *et al.*, “*Candida auris* Clinical Isolates from South Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Genotyping,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 57, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1128/JCM.01624-18.

[110] H. Lee *et al.*, “Comparison of Six Antifungal Susceptibilities of 11 *Candida* Species Using the VITEK2 AST-YS08 Card and Broth Microdilution Method,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 2, Apr. 2022, doi: 10.1128/SPECTRUM.01253-21.

[111] H. J. Lim *et al.*, “Evaluation of Two Commercial Broth Microdilution Methods Using Different Interpretive Criteria for the Detection of Molecular Mechanisms of Acquired Azole and Echinocandin Resistance in Four Common *Candida* Species,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 64, no. 11, Oct. 2020, doi: 10.1128/AAC.00740-20.

[112] T. de Groot, Y. Puts, I. Berrio, A. Chowdhary, and J. F. Meis, “Development of

Candida auris Short Tandem Repeat Typing and Its Application to a Global Collection of Isolates,” *MBio*, vol. 11, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1128/MBIO.02971-19.

[113] T. de Groot, B. Spruijtenburg, L. A. Parnell, N. A. Chow, and J. F. Meis, “Optimization and Validation of *Candida auris* Short Tandem Repeat Analysis,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 5, Oct. 2022, doi: 10.1128/SPECTRUM.02645-22.

[114] M. Asadzadeh *et al.*, “Molecular characterisation of *Candida auris* isolates from immunocompromised patients in a tertiary-care hospital in Kuwait reveals a novel mutation in FKS1 conferring reduced susceptibility to echinocandins,” *Mycoses*, vol. 65, no. 3, pp. 331–343, Mar. 2022, doi: 10.1111/MYC.13419.

[115] X. Hou, A. Lee, C. Jiménez-Ortigosa, M. Kordalewska, D. S. Perlin, and Y. Zhao, “Rapid Detection of ERG11-Associated Azole Resistance and FKS-Associated Echinocandin Resistance in *Candida auris*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 63, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1128/AAC.01811-18.

[116] M. Cuenca-Estrella *et al.*, “Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST),” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 9, no. 6, pp. 467–474, Jun. 2003, doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00592.x.

[117] “CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.”, Accessed: Feb. 05, 2024. [Online]. Available: www.clsi.org.

[118] “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST”, Accessed: Feb. 05, 2024. [Online]. Available: <http://www.eucast.org>.

[119] “SENSITITRE® YEASTONE® For in vitro Diagnostic Use”, Accessed: Feb. 05, 2024. [Online]. Available: www.trekds.com/techinfo.

[120] “Sensititre™ YeastOne™ YO9 AST Plate Guide.” Accessed: Feb. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMBD%2Fbrochures%2FSensititre-Plate-Guide-Booklet-EN.pdf>

[121] “AST-YS08 Biomerieux 2016.”, Accessed: Dec. 15, 2023. [Online]. Available:

[https://www.ilexmedical.com/files/Vitk2 MSDS/AST-YS08 insert.pdf](https://www.ilexmedical.com/files/Vitk2%20MSDS/AST-YS08%20insert.pdf)

[122] “EUCAST: MIC and zone distributions and ECOFFs.” Accessed: Nov. 09, 2023. [Online]. Available: https://www.eucast.org/mic_and_zone_distributions_and_ecoffs

[123] R. H. Jensen *et al.*, “Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestr[1] R. H. Jensen *et al.*, “Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* o,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 9, p. 2551, Sep. 2015, doi: 10.1093/JAC/DKV140.

[124] P. Brandt *et al.*, “High-Throughput Profiling of *Candida auris* Isolates Reveals Clade-Specific Metabolic Differences,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 11, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1128/SPECTRUM.00498-23.

[125] M. A. Pfaller, D. J. Diekema, G. W. Procop, and N. P. Wiederholdc, “Multicenter evaluation of the new Vitek 2 yeast susceptibility test using new CLSI clinical breakpoints for fluconazole,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 6, pp. 2126–2130, 2014, doi: 10.1128/JCM.00658-14.

[126] “M. Asadzadeh, E. Mokaddas, S. Ahmad, A. A Abdullah, T. de Groot, J. F. Meis, S. A Shetty "Molecular characterisation of *Candida auris* isolates from immunocompromised patients in a tertiary-care hospital in Kuwait reveals a novel mutation in FKS1 conferrin,” *Mycoses*, vol. 65, no. 3, 2022, doi: 10.1111/MYC.13419.

[127] F. Ben Abid *et al.*, “Molecular characterization of *Candida auris* outbreak isolates in Qatar from patients with COVID-19 reveals the emergence of isolates resistant to three classes of antifungal drugs,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 29, no. 8, pp. 1083.e1-1083.e7, Aug. 2023, doi: 10.1016/J.CMI.2023.04.025.

[128] B. Spruijtenburg *et al.*, “Whole genome sequencing analysis demonstrates therapy-induced echinocandin resistance in *Candida auris* isolates,” *Mycoses*, vol. 66, no. 12, pp. 1079–1086, Dec. 2023, doi: 10.1111/MYC.13655.

[129] I. Al-Obaid *et al.*, “Fatal Breakthrough Candidemia in an Immunocompromised Patient in Kuwait Due to *Candida auris* Exhibiting Reduced Susceptibility to Echinocandins and Carrying a Novel Mutation in Hotspot-1 of FKS1,” *J. fungi (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/JOF8030267.

[130] S. E. Jacobs *et al.*, “*Candida auris* Pan-Drug-Resistant to Four Classes of Antifungal Agents,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 66, no. 7, Jul. 2022, doi:

10.1128/AAC.00053-22.

[131] M. J. Biagi *et al.*, “Development of High-Level Echinocandin Resistance in a Patient With Recurrent *Candida auris* Candidemia Secondary to Chronic Candiduria,” *Open forum Infect. Dis.*, vol. 6, no. 7, Jun. 2019, doi: 10.1093/OFID/OFZ262.

[132] C. A *et al.*, “A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 73, no. 4, 2018, doi: 10.1093/JAC/DKX480.

[133] G. W. Procop *et al.*, “M57S-Ed4 August 2022 Replaces M59-Ed3 Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing,” 2022.

[134] A. Espinel-Ingroff *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.*, vol. 57, no. 12, pp. 5836–5842, Dec. 2013, doi: 10.1128/AAC.01519-13.

[135] M. Kordalewska *et al.*, “Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1128/AAC.00238-18.

[136] J. Rhodes *et al.*, “Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41426-018-0045-X.

[137] T. G. Maphanga *et al.*, “In Vitro Antifungal Resistance of *Candida auris* Isolates from Bloodstream Infections, South Africa,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 65, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.1128/AAC.00517-21.

[138] S. R. Lockhart, “*Candida auris* and multidrug resistance: Defining the new normal,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 131, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.FGB.2019.103243.

[139] S. E. Morales-López *et al.*, “Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris*, Colombia,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 1, pp. 162–164, Jan. 2017, doi: 10.3201/EID2301.161497.

[140] W. G. Lee *et al.*, “First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 3139–3142, Sep. 2011, doi: 10.1128/JCM.00319-11.

[141] M. Korem, Y. Geffen, and S. Amit, “Don’t mess with the machine - evaluation of

fluconazole susceptibility testing for *Candida glabrata* using the new VITEK2 AST-YS08 card following species modification,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 96, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2019.114896.

Παραρτήματα

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 . Η εμφάνιση και η εξάπλωση της <i>C. auris</i> . Παγκόσμιος χάρτης απεικόνισης των χωρών όπου έχει απομονωθεί <i>C. auris</i> και χρονοδιάγραμμα πρώτης απομόνωσης του παθογόνου σε αυτές από το 1996 έως το 2020, δείχνοντας σχεδόν ταυτόχρονη εμφάνισή του στην Ασία, στην Αφρική και στη Νότια Αμερική μεταξύ 2008 και 2013. Οι περισσότερες χώρες έχουν καταγράψει πολλαπλά κρούσματα σε περισσότερα από ένα ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης, με ορισμένες από αυτές να δηλώνουν συρροές κρουσμάτων, ενώ άλλες έχουν αναφέρει μόνο μεμονωμένα κρούσματα χωρίς περαιτέρω μετάδοση [7].....	1
Εικόνα 2 . Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καντιναιμίας από διαφορετικά <i>Candida</i> spp., ποσοστά αντοχής σε διαθέσιμους αντιμυκητικούς παράγοντες και ενδεδειγμένη θεραπεία [13].....	3
Εικόνα 3 . Περιστατικά καντιναιμίας από <i>C. auris</i> σε ασθενείς με COVID-19 σε διάφορες χώρες (ροζ ράβδοι). Δεδομένα από 11 μελέτες που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της πανδημίας [15].....	4
Εικόνα 4 . Έκθεση απειλών αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των CDC, 2019 [16].....	5
Εικόνα 5 . Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ της <i>C. auris</i> και συγγενικών ειδών [21].....	6
Εικόνα 6 . Παγκόσμια κατανομή των διαφορετικών κλάδων της <i>C. auris</i> . (α) Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών ολόκληρου του γονιδιώματος 304 στελεχών που συγκεντρώνονται σε τέσσερις (I-IV) διακριτούς κλάδους. (β) Χάρτης απεικόνισης της διασποράς στελεχών διαφορετικών κλάδων ανά χώρα. (γ) Φυλογενετικό δέντρο του εκάστοτε κλάδου [24].	7
Εικόνα 7 . Κατανομή διαφορετικών κλάδων της <i>C. auris</i> εντός των ΗΠΑ κατά την περίοδο 2013-2017 [29].....	9
Εικόνα 8 . Χρονολογική σειρά εμφάνισης των κλάδων I-IV της <i>C. auris</i> [24].....	10
Εικόνα 9 . Η ταυτόχρονη εμφάνιση και διασπορά των κλάδων I-IV της <i>C. auris</i> σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές παγκοσμίως [31].....	10
Εικόνα 10 . Πιθανές οδοί για την εισαγωγή της <i>C. auris</i> στο περιβάλλον [32].	12
Εικόνα 11 . Χρονοδιάγραμμα της παγκοσμίως διευρυνόμενης αντίχρευσσης της <i>C. auris</i> [19].....	13

Εικόνα 12 . Παγκόσμιος χάρτης με την καταγραφή κρουσμάτων <i>C. auris</i> (πάνω), ακριβής αριθμός κρουσμάτων ανά χώρα παρουσιαζόμενα με φθίνουσα σειρά (αριστερά) και ετήσια επιδημιολογική καμπύλη καταγραφής τους (δεξιά) ως και το 2019 [9].....	14
Εικόνα 13 . Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων <i>C. auris</i> στις διάφορες πολιτείες των ΗΠΑ έως τις 31 Δεκεμβρίου 2022 [48].	17
Εικόνα 14 . Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων <i>C. auris</i> (n=620) σε χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ στο διάστημα 2013-2017 [51].....	18
Εικόνα 15 . Γεωγραφική κατανομή και προέλευση κρουσμάτων <i>C. auris</i> (n=26) σε χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ στο διάστημα Ιανουάριος 2013-Μάιος 2019 [52].....	19
Εικόνα 16 . Επιδημιολογικά στάδια διασποράς της <i>C. auris</i> σε 30 χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ για το έτος 2022 [53].	20
Εικόνα 17 . Παράγοντες παθογένειας της <i>C. auris</i> [70].....	22
Εικόνα 18 . Μηχανισμοί δράσης αντιμυκητικών παραγόντων [72].....	23
Εικόνα 19 . Ποσοστά αντοχής της <i>C. auris</i> έναντι 8 αντιμυκητικών παραγόντων [76].....	24
Εικόνα 20 . Ποσοστά αντιμυκητικής αντοχής της <i>C. auris</i> ανά κλάδο [24].....	25
Εικόνα 21 . Ποσοστά αντιμυκητικής αντοχής της <i>C. auris</i> ανά χώρα και ανά μέθοδο προσδιορισμού της <i>in vitro</i> ευαισθησίας. Ο χάρτης θερμότητας απεικονίζει το ποσοστό των R στελεχών στη φλουκοναζόλη (FLU), στην αμφοτερικίνη Β (AMB) και στις εχινοκανδίνες (ECH) [74].	25
Εικόνα 22 . Σχηματική αναπαράσταση αποθηκευμένων μύλων ως πιθανή δεξαμενή επιλογής και μετάδοσης R στις αζόλες στελεχών <i>C. auris</i> [78].....	26
Εικόνα 23 . Μηχανισμοί δράσης αντιμυκητικών παραγόντων και ανάπτυξης αντοχής στα αντιμυκητικά στην <i>C. auris</i> . (Α) Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιμυκητικών που διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα. (Β) Μηχανισμός αναστολής της σύνθεση του μυκητικού DNA/RNA στον πυρήνα. (Γ) Μηχανισμοί αντοχής στα αντιμυκητικά που δρουν στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρικό τοίχωμα [20]...	27
Εικόνα 24 . Συχνότητα εμφάνισης των σημειακών μεταλλάξεων Y132F, K143R και F126L στο γονίδιο ERG11 ανά κλάδο για 296 στελέχη <i>C. auris</i> [24].....	28
Εικόνα 25 . Εσφαλμένη ταυτοποίηση της <i>C. auris</i> με τη χρήση κοινών εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων ταυτοποίησης ζυμομυκήτων που βασίζονται στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε είδους [11].....	30
Εικόνα 26 . Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μεθόδων ταυτοποίησης της <i>C. auris</i> που εφαρμόζονται σε εργαστήρια που δε διαθέτουν προηγμένα μέσα ταυτοποίησης του είδους (αριστερά) και σε εξελιγμένα εργαστήρια που χρησιμοποιούν τεχνικές PCR και	

χρωματογραφίας μάζας για την ανίχνευσή της (δεξιά) [83].	31
Εικόνα 27 . Προτεινόμενα CLSI/EUCAST δοκιμαστικά ECVs/ECOFFs αντοχής για 8 αντιμυκητικούς παράγοντες έναντι της <i>C. auris</i> [87].	35
Εικόνα 28 . Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των κατά ISO αραιώσεων αντιμυκητικού παράγοντα που διαλύεται σε οργανικό διαλύτη [88], [89].	55
Εικόνα 29 . Σχηματική αναπαράσταση του τελικού σταδίου της παρασκευής διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, το οποίο διαλύεται σε οργανικό διαλύτη και η δραστηριότητα του οποίου θα ελεγχθεί σύμφωνα με τη EUCAST BMD [88].	56
Εικόνα 30 . Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας μικροαραιώσεων όταν οι αραιώσεις των αντιμυκητικών τοποθετούνται σε οριζόντια (αριστερά) ή κάθετη (δεξιά) διάταξη.	57
Εικόνα 31 . Προσδιορισμός CLSI MICs αντιμυκητικών κατόπιν οπτικής αξιολόγησης της ανάπτυξης στελέχους <i>C. auris</i> σε πλάκα μικροαραιώσεων με τη βοήθεια αναστροφου καθρέπτη.	59
Εικόνα 32 . Σχηματική αναπαράσταση του φωτομετρικού προσδιορισμού των EUCAST MICs με τη βοήθεια της συσκευής Infinite® M200 και του συνοδευτικού λογισμικού Magellan PRO.	60
Εικόνα 33 . Σχηματική αναπαράσταση της πλάκας μικροαραιώσεων SYO YO10 [120].	61
Εικόνα 34 . Σχηματική αναπαράσταση του AFST με τη χρωματομετρική μέθοδο SYO [119].	62
Εικόνα 35 . Προσδιορισμός SYO MICs. (A) Ως SYO AMB MIC καταγράφεται το πρώτο βοθρίο με μπλε χρώμα (1 mg/L). (B) Για τις εχινοκανδίνες, τις αζόλες και την 5FC, ως SYO MIC καταγράφεται το πρώτο βοθρίο με μπλε ή μωβ χρώμα (0,25 mg/L) [119].	62
Εικόνα 36 . Σχηματική αναπαράσταση του AFST με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού MTS [103].	64
Εικόνα 37 . Περιεχόμενο και χαρακτηριστικά των καρτών AST-YS08 για τον AFST με το σύστημα Vitek 2 [121].	65
Εικόνα 38 . Σχηματική αναπαράσταση του AFST με το σύστημα Vitek 2 [121].	66
Εικόνα 39 . Κατανομές των CLSI MICs των στελεχών <i>C. auris</i> ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την <i>C. auris</i> [86].	70
Εικόνα 40 . Τιμές CLSI WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη <i>C. auris</i> ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και ISA WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της ή ήταν τρικόρυφη.	71

Εικόνα 41 . Κατανομές EUCAST MICs των στελεχών <i>C. auris</i> ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την <i>C. auris</i> [86].....	76
Εικόνα 42 . Τιμές EUCAST WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη <i>C. auris</i> ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC, ITC και ISA WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της ή ήταν δικόρυφη.....	77
Εικόνα 43 . Κατανομές SYO MICs των στελεχών <i>C. auris</i> ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την <i>C. auris</i> [86].....	85
Εικόνα 44 . Τιμές SYO WT-ULVs των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη <i>C. auris</i> ανεξαρτήτως κλάδου. Η FLC WT-ULV δεν μπορούσε να εξαχθεί με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της.....	86
Εικόνα 45 . Κατανομές MTS MICs των στελεχών <i>C. auris</i> ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την <i>C. auris</i> [86].....	93
Εικόνα 46 . Τιμές MTS WT-ULV των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη <i>C. auris</i> ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και VRC WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της.	94
Εικόνα 47 . Κατανομές Vitek2 MICs των στελεχών <i>C. auris</i> ανά κλάδο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα δοκιμαστικά όρια αντοχής των CDC για την <i>C. auris</i> [86].....	101
Εικόνα 48 . Τιμές Vitek 2 WT-ULV των υπό μελέτη αντιμυκητικών παραγόντων για στελέχη <i>C. auris</i> ανεξαρτήτως κλάδου. Οι FLC και VRC WT-ULVs δεν μπορούσαν να εξαχθούν με ασφάλεια δεδομένου ότι η κατανομή των MICs περικόπηκε στο άνω άκρο της.	102

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1 . Δοκιμαστικά όρια αντοχής της <i>C. auris</i> στις τριαζόλες, στην AMB και στις εχινοκανδίνες, όπως ορίστηκαν από τα CDC [86].....	34
Πίνακας 2 . Τεχνικές διαφορές μεταξύ των CLSI και EUCAST μεθοδολογιών BMD για τον AFST έναντι <i>Candida</i> spp. [88], [89].	36
Πίνακας 3 . Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ των μεθοδολογιών CLSI και EUCAST BMD για τον AFST έναντι της <i>C. auris</i>	38
Πίνακας 4 . Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας	

CLSI/EUCAST BMD και της εμπορικά διαθέσιμης μεθόδου SYO για τον AFST έναντι της <i>C. auris</i>	42
Πίνακας 5 . Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας CLSI/EUCAST BMD και των εμπορικά διαθέσιμων ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμυκητικού για τον AFST έναντι της <i>C. auris</i>	44
Πίνακας 6 . Συγκεντρωτικά δεδομένα συγκριτικών μελετών μεταξύ της μεθοδολογίας CLSI/EUCAST BMD και του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2 για τον AFST έναντι της <i>C. auris</i>	47
Πίνακας 7 . Συστατικά και τρόπος παρασκευής 1 L θρεπτικού υλικού RPMI 1640 (2×) για τον AFST με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD [88], [89].....	52
Πίνακας 8 . Διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων φαρμάκου, συγκέντρωση του εκάστοτε stock διαλύματος και εύρος των τελικών συγκεντρώσεων αντιμυκητικών παραγόντων που εξετάστηκαν με τη μεθοδολογία CLSI/EUCAST BMD στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης.	54
Πίνακας 9 . Κατά ISO αραιώσεις για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας αντιμυκητικού, με επιθυμητό εύρος τελικών εξεταζόμενων συγκεντρώσεων 0,125-64 mg/L, η δραστηριότητα του οποίου θα ελεγχθεί σύμφωνα με την EUCAST BMD [88].....	55
Πίνακας 10 . Αντιμυκητικοί παράγοντες που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη με ταινίες MTS και εύρος των συγκεντρώσεών τους που εμπεριέχονται σε αυτές [103].....	63
Πίνακας 11 . Κλαδο-ειδικό προφίλ της <i>in vitro</i> αντιμυκητικής ευαισθησίας της <i>C. auris</i> (n=100) με την πρότυπη μέθοδο CLSI BMD.....	72
Πίνακας 12 . Προφίλ <i>in vitro</i> αντιμυκητικής ευαισθησίας της <i>C. auris</i> (n=100) με την πρότυπη μέθοδο EUCAST.....	78
Πίνακας 13 . Κλαδο-ειδικά CLSI και EUCAST δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών <i>C. auris</i>	81
Πίνακας 14 . Προφίλ <i>in vitro</i> αντιμυκητικής ευαισθησίας της <i>C. auris</i> (n=100) με την εμπορική μέθοδο SYO.....	87
Πίνακας 15 . Κλαδο-ειδικά CLSI και SYO δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών <i>C. auris</i>	89
Πίνακας 16 . Προφίλ <i>in vitro</i> αντιμυκητικής ευαισθησίας της <i>C. auris</i> (n=100) με την εμπορική μέθοδο MTS.....	95
Πίνακας 17 . Κλαδο-ειδικά CLSI και MTS δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών <i>C. auris</i>	97
Πίνακας 18 . Προφίλ <i>in vitro</i> αντιμυκητικής ευαισθησίας της <i>C. auris</i> (n=100) με την	

αυτοματοποιημένη μέθοδο Vitek 2.....	103
Πίνακας 19 . Κλαδο-ειδικά CLSI και Vitek 2 δεδομένα MICs για τα αντιμυκητικά AMB, FLC, POS, VRC, ITC, ISA, AFG, MFG, CAS, 5FC έναντι στελεχών <i>C. auris</i>	106
Πίνακας 20 . Συγκριτική αξιολόγηση προτεινόμενων δοκιμαστικών CLSI ECVs και EUCAST ECOFFs αντοχής και CLSI/EUCAST WT-ULVs που περιλαμβάνουν το 99% των WT MIC έναντι στελεχών <i>C. auris</i> κλάδου I και κλάδων I-V.....	111