

Candida-Leitlinie: Empfehlungen für die Diagnostik

Birgit Willinger

Abteilung für Klinische Mikrobiologie

Klinisches Institut für Labormedizin

Medizinische Universität Wien



Verfügbare mikrobiologische Untersuchungstechniken

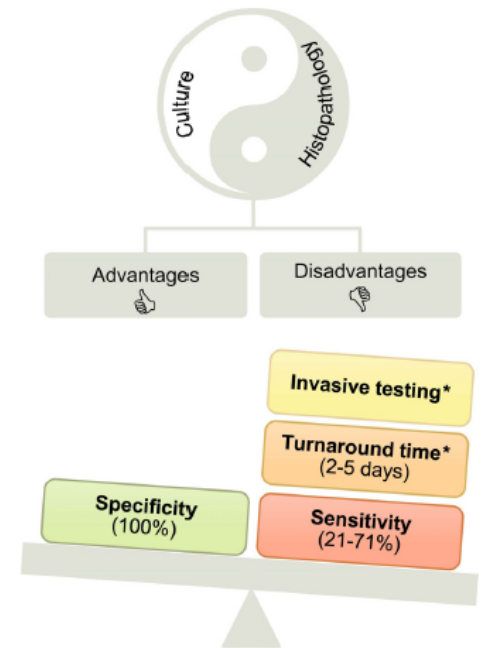
- Histologie - Biopsie
- Mikroskopie
- Kultur
- Antigen- und Antikörpernachweis
- Molekularbiologie

Rasche Diagnose wichtig!

Was ist Goldstandard?

- Histologie
- Kultur
 - Vorteile:
 - Erlaubt exakte ID
 - Erlaubt Empfindlichkeitsprüfung
 - Nachteile:
 - Langsam
 - Teilweise geringe Sensitivität
 - Störanfällig, wenn Transport mangelhaft etc.
 - Aussagekraft bei nicht sterilen Materialien

➡ **Herausforderung: einfach, rasch zuverlässig ... und billig**

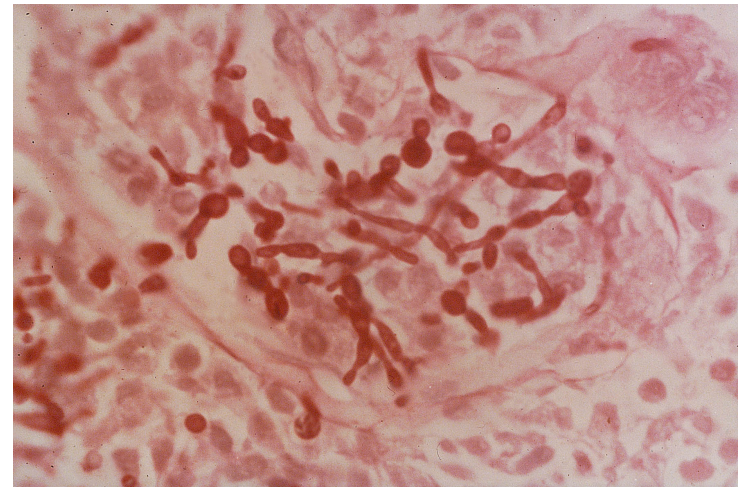


Histologischer Erregernachweis

Konventionell:

- PAS-Färbung
- Methenamin-Silbernitratfärbung (Grocott-Gomori)
- Ev. Hämatoxylin – Eosin
- Giemsa

- Besonders empfehlenswert, wenn Kulturen negativ bleiben
- In Kombination mit molekularen Methoden ID des Erregers möglich



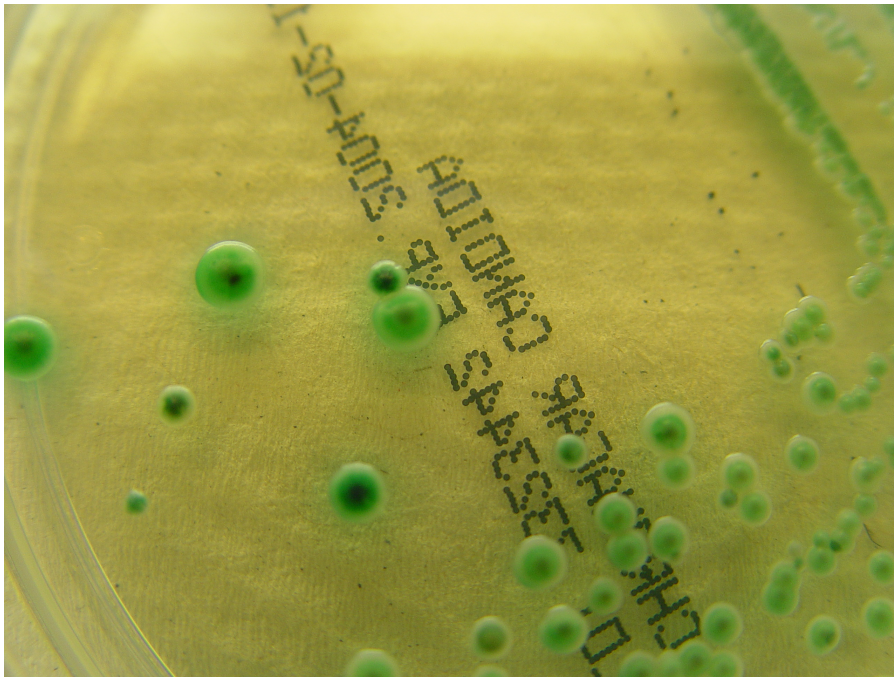
Kultureller Nachweis

- Nachweis der Infektion und Identifizierung des Erregers, günstig aus sterilen Materialien
- Nachteil: langsam, Sensitivität?
- Resistenzbestimmung
- Pilzmedien“ steigern Nachweisrate
- Sabouraud-Dextrose-Agar, chromogene Medien

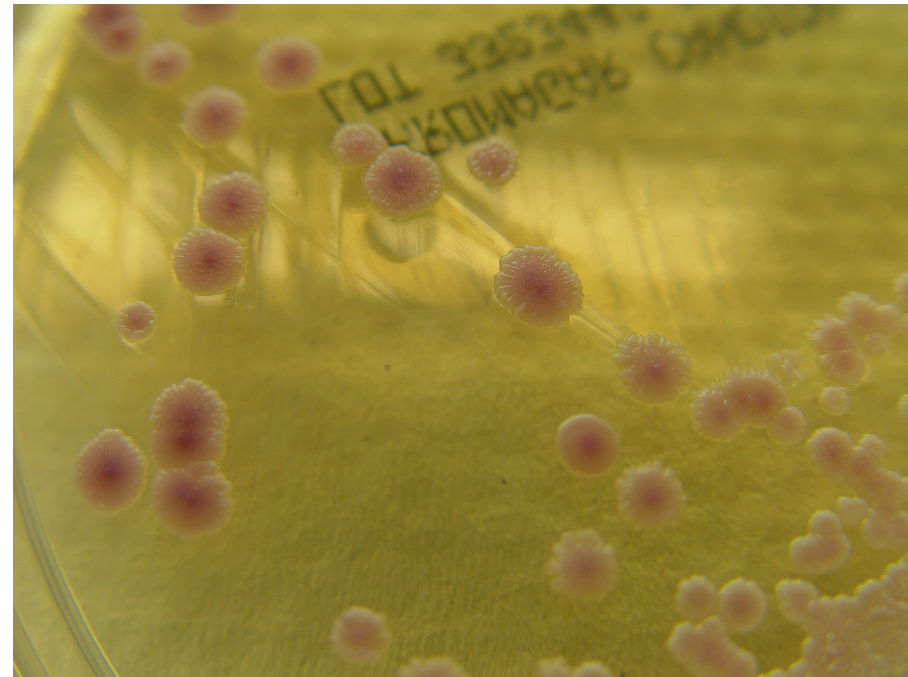
Chromogene Medien

- Beurteilung von Hefe-Kolonien auf Grund ihrer Pigmentierung
- Einfache Identifizierung bestimmter *Candida species*
 - *C. albicans* (cave: *C. dubliniensis*)
 - *C. tropicalis*
 - *C. krusei*
 - Keine Differenzierung: *C. glabrata* – *C. parapsilosis*
- Bessere Beurteilung von Mischkulturen
- Dauer zur optimalen Pigmentausbildung: 48h
- Wichtig: Vor Einführung Validierung

CHROMagarCandida (BD) – wichtig in der Routinediagnostik



C. albicans



C. parapsilosis?

Candida ID Agar (bioMerieux)



C. albicans



C. glabrata



C. lusitanae

Bei Fieber: Blutkultur abnehmen

- Blutmenge ist DER entscheidende Faktor
 - Erwachsene: 60 ml (6 x 10 ml; 3 x aerob und 3 x anaerob)
 - Kinder:
 - < 2 kg: 2 – 4 ml
 - 2 – 12 kg: 6 ml
 - 12 – 36 kg: 20 ml
- Mind. 2, besser 3 Abnahmen innerhalb von 30 min
- Venenpunktion an verschiedenen Stellen, besser als aus liegenden Kathetern
- Tägliche BK bei V.a. Candidämie!
- Sensitivität: 50 – 75%
- „Follow-up“ BK für Therapiedauer nötig (alle 1 – 2d)

BacT ALERT 3D



Inkubation: mind. 5 Tage

Zusätzlich zu beachten

- Niedrigere Sensitivität bei Patienten mit Neutropenie oder unter antimykotischer Therapie
- Cave: Nicht jeder Sprosspilz = Candida
- Die Speziesdiagnose ist verpflichtend
- Kulturen aus Biopsien und anderen sterilen Materialien, bes. bei tiefer Candidose sinnvoll

ID des Erregers:
rasch und zuverlässig



Blutkultur – Goldstandard bei Candidämie

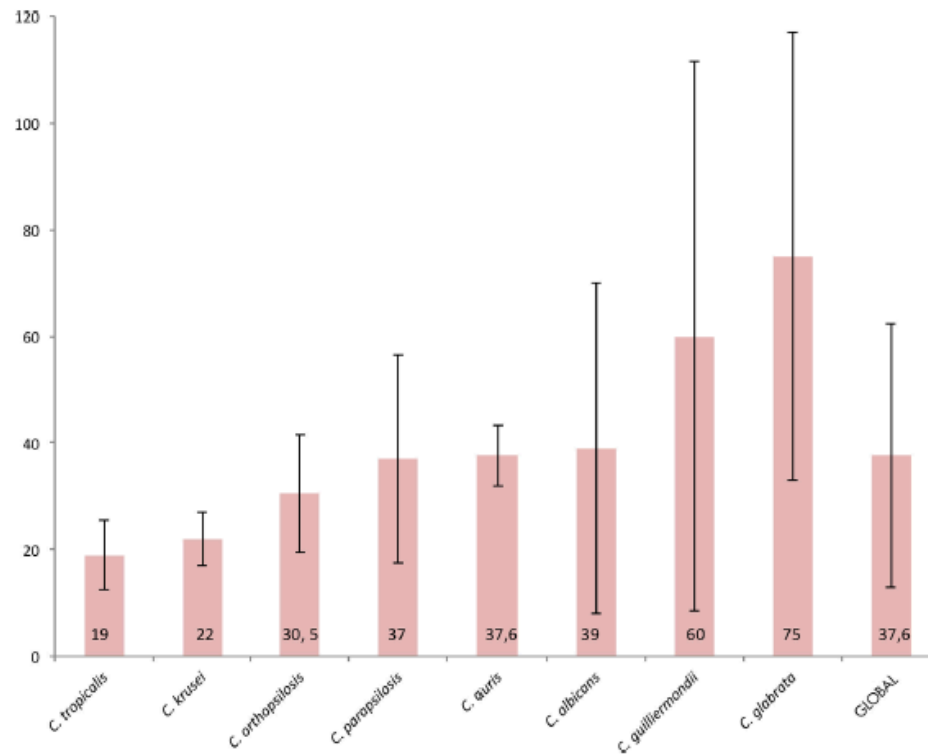


Figure 1 | Medium time of growth (hours) of different *Candida* species in blood cultures Data from 258 candidemia episodes in intensive care units at La Fe University Hospital

Dauer der ID aus der positiven Blutkultur

Chromagar, konventionelle ID	37 h	18 - 24 h
---------------------------------	------	-----------

Geht es nicht schneller?

Rasche ID aus der Blutkultur

- MALDI-TOF (MALDI-Biotyper - Bruker-Daltonik; Vitek MS - bioMerieux)
- **Vorteile:**
 - ID innerhalb 10 – 30 min nach Positivwerden der Blutkultur
 - ID bis auf Speziesebene
 - Niedrige Reagenzien- und Laborkosten
 - Einfach in der Durchführung
- **Nachteile:**
 - Positive Kultur erforderlich
 - Abhängig von Datenbank
 - Hohe Anschaffungskosten

Dauer der ID aus der positiven Blutkultur

Chromagar, konventionelle ID	37 h	18 - 24 h
---------------------------------	------	-----------

MALDI-TOF direkt	37 h	0,5h
------------------	------	------

Dauer der ID aus der positiven Blutkultur

Chromagar, konventionelle ID	37 h	18 - 24 h
MALDI-TOF direkt	37 h	0,5h
PNA-FISH	37 h	1,5 h

Gut,
aber eingeschränktes
Erregerspektrum

Rasche ID von Candida aus der Blutkultur

Filmarray BCID, bioMerieux Canada

Yeast grown in culture (no. of isolates) ^a	<i>Candida</i> species targeted by BCID panel	No. (%) of isolates correctly identified by BCID panel	No. of isolates not detected by BCID panel
<i>Candida albicans</i> (40)	Yes	40 (100)	0
<i>Candida glabrata</i> (16)	Yes	16 (100)	0
<i>Candida parapsilosis</i> (16)	Yes	16 (100)	0
<i>Candida tropicalis</i> (8)	Yes	8 (100)	0
<i>Candida krusei</i> (4)	Yes	4 (100)	0
<i>Candida dubliniensis</i> (4)	No		4
<i>Candida magnolia</i> (1)	No		1
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	No		2

Achtung: Detektion nur von *Candida* spp., die im Panel enthalten sind!

Dauer der ID aus der positiven Blutkultur

Chromagar, konventionelle ID	37 h	18 - 24 h
MALDI-TOF direkt	37 h	0,5h
PNA-FISH	37 h	1,5 h
Filmarray	37 h	1 h

Schnell und breit!

Katheterassoziierte Infektionen

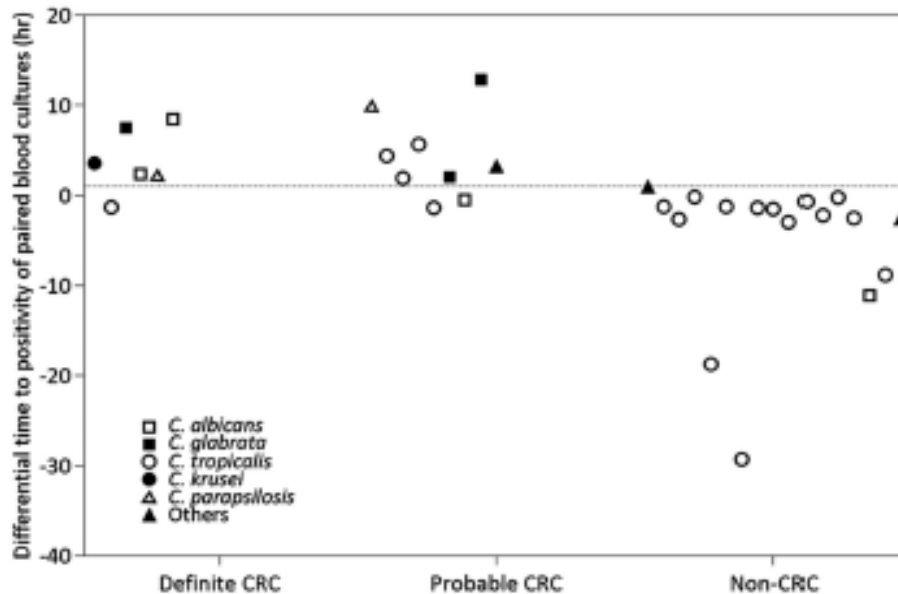
- 30-40% der Candidämien sind katheterassoziiert
- Bei liegendem zentralen Venenkatheter:
 - aus jedem Lumen des Katheters für je ein Set Blutkulturen entnehmen
 - zusätzlich ein Set Blutkulturen aus einer peripheren Vene abnehmen
- Bestimmung der “Time to positivity“ (TTP) zur Unterscheidung zwischen einer katheterassoziierten Candidämie und einer nicht-katheterassoziierten Candidämie

Katheterassoziierte Infektionen

- DTP als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Katheterassoziierten Infektionen (CRC) bei neutropenen Patienten
- 35 Patienten:
 - Gesicherte CRC: Katheterspitzen mit mind. 15 CFU und selber Candida sp. in BK
 - Wahrscheinliche CRC: Katheterspitzen mit mind. 1 - 14 CFU und selber Candida sp. in BK
 - Keine CRC: negative Katheterspitze oder andere Quelle für Candiämie
- 15 (43%) mit CRC vs 17 (49%) mit non-CRC

Katheterassoziierte Infektionen

- DTP als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Katheterassoziierten Infektionen (CRC) bei neutropenen Patienten



Ergebnisse:

- DTP > 1,45h
- Sensitivität: 80%
- Spezifität: 100%
- C. glabrata häufiger bei CRC
- C. tropicalis häufiger bei non CRC

Candida Kolonisationsindex

- CCI und cCCI (Pittet)
- Candida Score nach Leon (2006 und 2009) - präemptive antifungale Therapie
- Candida predictive rule (CPR) nach Ostrosky-Zeichner - Prophylaxe
- CaMed Score nach Ruiz-Ruigómez (2018)
- Italien prediction rule nach Sozio (2018)

Candida Kolonisationsindex

- CCI =

Anzahl unterschiedlicher Körperregionen mit Candida kolonisiert
Anzahl der kolonisierten Körperstellen

- Korrigierten CCI (cCCI)=

Anzahl unterschiedlicher Körperregionen mit starkem Wachstum
von Candida ($> 10^5$ KBE/ml)
Anzahl der kolonisierten Körperregionen

- Signifikant CCI $> 0,5$

Vorhersage des Risikos für eine Candidämie

Risikofaktor	Punkte
Parenterale Ernährung	+1 Punkt
ZVK	+1 Punkt
Peripher gelegter ZVK	+3 Punkte
Vorherige Antibiotikatherapie	+1 Punkt
Während stationärer Behandlung	+1 Punkt
Neurologische Verschlechterung	+1 Punkt
stationäre Behandlung innerhalb der letzten 3 Monate	+1 Punkt

Score \geq 4: **84% Sensitivität**
 76% Spezifität

Einsatz von Biomarker



Serologische Candidämie-Diagnostik

- Nachweis von Mannan und Antimannan
- Metaanalyse:
 - Sensitivität 83% (89 – 87%)
 - Spezifität: 86% (82 – 90%)
- Kombinierte Testung von ESCMID empfohlen
- u.U. Serienuntersuchungen
- hoher negativer Vorhersagewert

Nachweis von Beta-D-Glucan

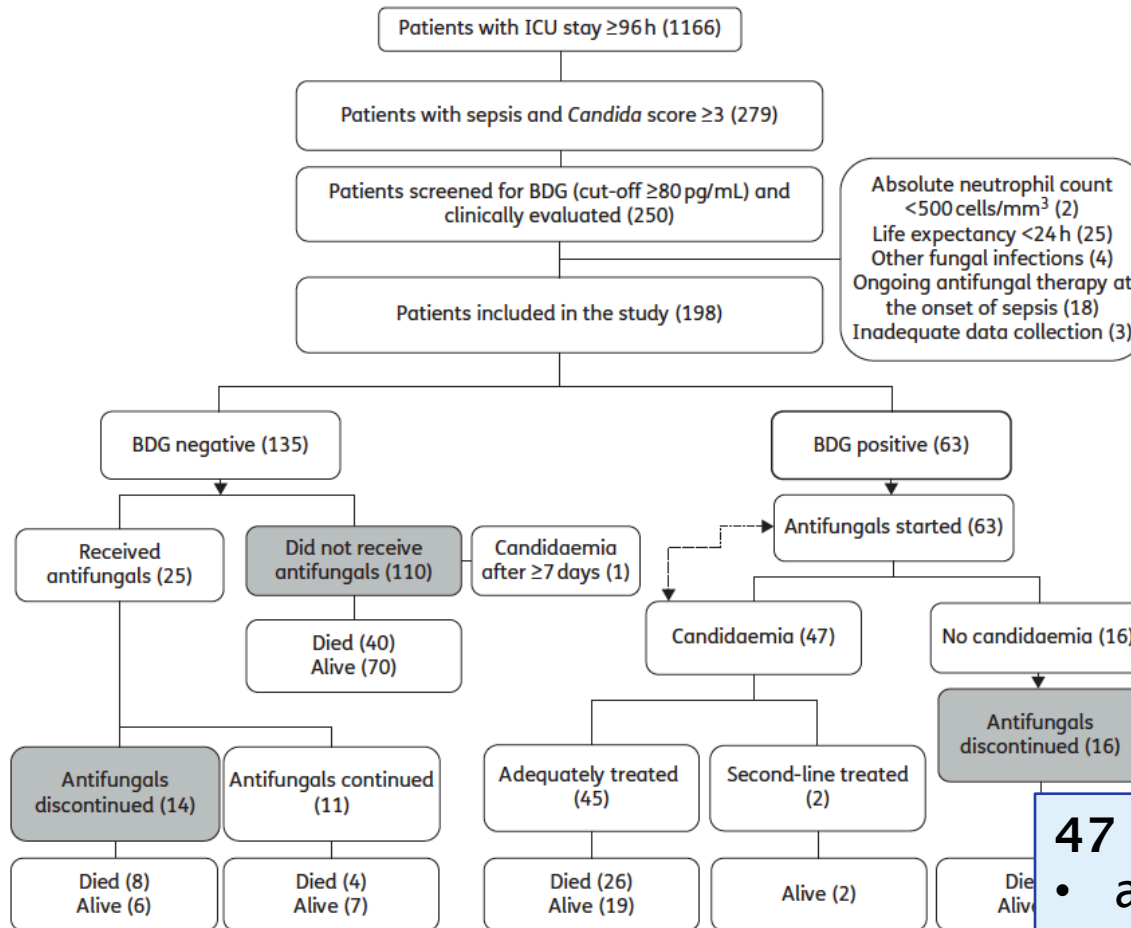
- Fungitell (Associates of Cape Cod, Inc.)
- β -Glucan-Test (Fujifilm Wako)
- Panfungaler Marker ohne Differenzierung
 - Kein Nachweis von Mucorales und Cryptococcus
- Häufig falsch positive Ergebnisse
 - Menschl. Blutprodukte
 - Hämodialyse
 - Hohe Triglyceride
 - Gaze
 - Glucan-hältige Materialien

Nachweis von Beta-D-Glucan

- **Candida**

- Zwei konsekutive Proben zur Beurteilung heranziehen
- Bessere Sensitivität als Blutkultur bei tiefer Candidose (62% vs 17%)
- Guter Vorhersagewert bei blutkultur-negativer intraabdominaler Candidose
- Empfehlung zum Einsatz zur Ausschlussdiagnostik bei systemischen Candidosen
- Wertvolle Ergänzung zur konventionellen Diagnostik

Einsatz von Fungitell im Sinne des Antifungal Stewardships



47 Candidämien:

- alle Fungitell positiv
- 16 falsch positiv

Einsatz von Fungitell im Sinne des Antifungal Stewardships

- Präemptive Strategie mit Früherkennung möglicher Candida-Infektionen
- Kein Effekt auf Gesamletalität
 - 112 Todesfälle von 198 Patienten, 21 davon auf Candidämie zurückzuführen
- Geringerer bzw. kürzerer Einsatz von Echinocandinen
 - Kostenersparnis pro Patient: 3540 €
 - Kostenersparnis gesamt: 438.960 € (124 Patienten)

Einsatz in dieser Richtung überlegenswert und weiter zu evaluieren!

Vergleich von Fungitell und β -Glucan-Test

120 Candidämie-Patienten 63 Pat. mit Pneumocystis jirovecii
200 Kontrollpatienten mit Bakteriämie oder negativer Blutkultur

Parameter	Fungitell assay result at:		Wako β -glucan test result at:	
	Manufacturer cutoff of ≥ 80 pg/ml	Optimized cutoff of ≥ 70 pg/ml	Manufacturer cutoff of ≥ 11 pg/ml	Optimized cutoff of ≥ 3.8 pg/ml
True positives	104	109	51	87
False negatives	16	11	69	33
True negatives (negative BC + bacteremia = total)	91 + 79 = 170	90 + 77 = 167	100 + 96 = 196	91 + 91 = 182
False positives (negative BC + bacteremia = total)	9 + 21 = 30	10 + 23 = 33	0 + 4 = 4	9 + 9 = 18
Sensitivity, % (95% CI)	86.7 (79.3–92.2)	90.8 (84.2–95.3)	42.5 (33.5–51.9)	72.5 (63.6–80.3)
Specificity, % (95% CI)	85.0 (79.3–89.7)	83.5 (77.6–88.4)	98.0 (95.0–99.5)	91.0 (86.2–94.6)
Positive likelihood ratio (95% CI)	5.78 (4.12–8.10)	5.51 (4.01–7.56)	21.25 (7.88–57.32)	8.06 (5.11–12.69)
Negative likelihood ratio (95% CI)	0.16 (0.10–0.25)	0.11 (0.06–0.19)	0.59 (0.50–0.69)	0.30 (0.23–0.41)
Positive predictive value, %				
All patients with blood culture	6.0 (1.3–16.5)	5.7 (1.3–15.5)	19.0 (1.1–62.5)	8.2 (1.4–23.7)
Patients with BSI ^a	36.4 (25.0–48.9)	35.3 (24.5–47.2)	67.8 (42.1–87.4)	44.3 (29.9–59.6)
ICU patients with BSI	39.4 (28.0–51.7)	38.2 (27.3–50.1)	70.5 (45.5–88.8)	47.5 (33.1–62.3)
Negative predictive value, %				
All patients with blood culture	99.8 (98.3–100.0)	99.9 (98.4–100.0)	99.4 (97.7–99.9)	99.7 (98.1–100.0)
Patients with BSI	98.5 (96.1–99.6)	98.9 (96.7–99.8)	94.5 (91.3–96.8)	97.1 (94.3–98.8)
ICU patients with BSI	98.3 (95.8–99.5)	98.8 (96.5–99.8)	93.8 (90.5–96.3)	96.7 (93.8–98.5)

^aBSI, bloodstream infection.

Molekularbiologische Assays

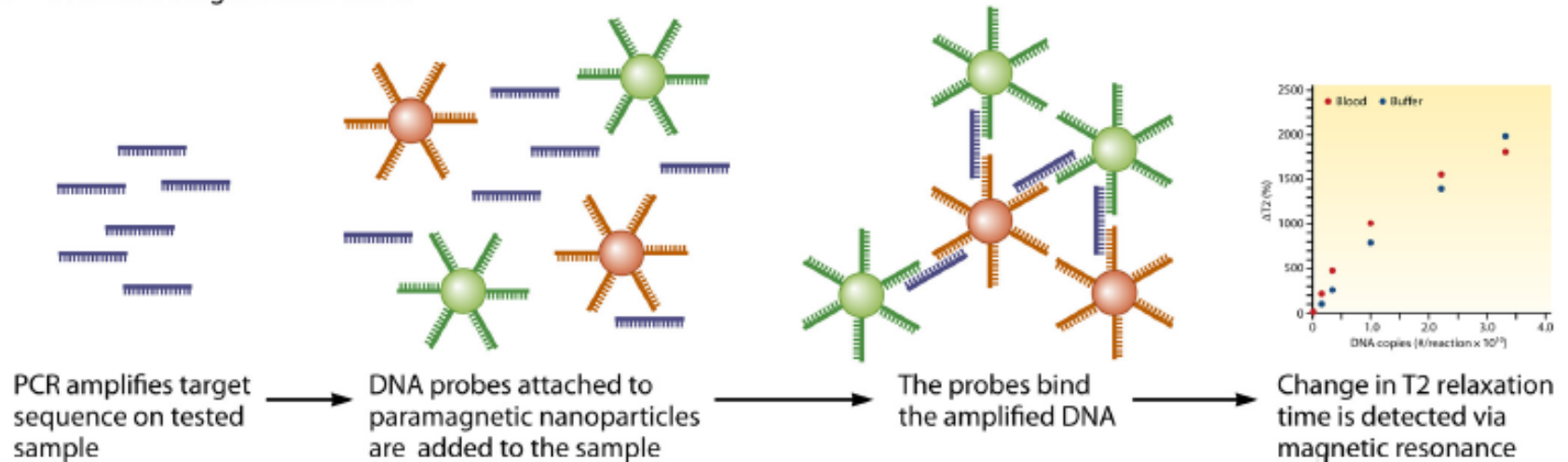
- Rasch und sensitiv
- Mehr und mehr kommerziell erhältliche Tests, z.B.
 - ~~Septifast (Roche Diagnostics):~~
 - ~~5 verschiedene Candida Arten~~
 - ~~*A. fumigatus*~~
 - Candida-PCR
 - Multiplex-PCRs
 - z.B. Nachweis von Erregern bei Dermato- und Onychomykose
 - T2 Candida

Nur mehr bis Ende 2019!



T2 Magnetic Resonance Assay

D T2 nuclear magnetic resonance



T2Candida

- Nachweis von:
 - *C. albicans*/*C. tropicalis*
 - *C. glabrata*/*C. krusei* LOD: 1-3 CFU/ml
 - *C. parapsilosis*

K2/K3 EDTA-Blut
Daten ausschließlich bei Candidämie

T2 Magnetic Resonance Assay zum Nachweis von Candidämien

- Blutproben aus Routinediagnostik von 1801 Patienten
- 1 Set aus aerober und anaerober BK-flasche
- 2 Röhren für T2MR und Negativkontrolle
- Zusatz von 5 verschiedenen Candida spp. (< 1 – 100 CFUs/ml)
- Ergebnis:
 - Sensitivität: 91,1%
 - Spezifität: 99,4%
 - LOD: 1 – 3 CFU/ml (Spezies abhängig)
 - NPV: 99,5% - 99%
 - Dauer: 4,2 ± 0,9 Stunden

Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel

Cornelius J. Clancy,¹ Peter G. Pappas,² Jose Vazquez,³ Marc A. Judson,⁴ Dimitrios P. Kontoyiannis,⁵ George R. Thompson III,⁶ Kevin W. Garey,⁷ Annette Reboli,⁸ Richard N. Greenberg,⁹ Senu Apewokin,¹⁰ G. Marshall Lyon III,¹¹ Luis Ostrosky-Zeichner,¹² Alan H. B. Wu,¹³ Ellis Tobin,¹⁴ M. Hong Nguyen,¹ and Angela M. Caliendo¹⁵

¹University of Pittsburgh Medical Center, Pennsylvania; ²University of Alabama at Birmingham Hospital; ³Medical College of Georgia, Augusta University; ⁴Albany Medical College, New York; ⁵M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas; ⁶University California Davis Medical Center, Sacramento; ⁷University of Houston College of Pharmacy, Texas; ⁸Cooper Medical School of Rowan University and Cooper University Healthcare, Camden, New Jersey; ⁹University of Kentucky Medical Center, Lexington; ¹⁰University of Arkansas Medical System, Little Rock; ¹¹Emory Healthcare, Atlanta, Georgia; ¹²University of Texas Health Science Center, Houston; ¹³University of California, San Francisco; ¹⁴St. Peters Healthcare System, Albany, New York; ¹⁵Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island

Follow-up-Blutkulturen bei Pat. mit Candidämien:
Positivitätsrate: T2 vs. Blutkultur: **45% vs. 24%**
➡ Steuerung der Therapie!

Conclusions. T2Candida was sensitive for diagnosing candidemia at the time of positive blood cultures. In patients receiving antifungal therapy, T2Candida identified bloodstream infections that were missed by cBCs. T2Candida may improve care by shortening times to *Candida* detection and species identification compared to blood cultures, retaining sensitivity during antifungal therapy and rendering active candidemia unlikely if results are negative.

T2 Candida

- Rasche Ergebnisse
- Hohe Sensitivität und Spezifität
- Keine Beeinflussung durch antifungale Therapie
- Ausschließlicher Nachweis von Spezies, die im Panel enthalten sind
 - Keine weitere Differenzierung (z.B. C. parapsilosis Komplex)
- **SEHR TEUER!**

Blutkultur

- Langsam
 - Mehrere Tage (C. glabrata: 5d)
- Sensitivität 50 – 75%
- Sensitivität sinkt unter antifungaler Therapie
- ID aller Isolate
- Empfindlichkeitsprüfung möglich