MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Neue Testmethoden zum Nachweis invasiver Mykosen

Birgit Willinger
Klinische Abteilung für Klinische Mikrobiologie
Klinisches Institut für Labormedizin
Medizinische Universität Wien

Einsatz von modernen Techniken zur frühen Erfassung von invasiven Mykosen

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- Bildgebung
- Galactomannan EIA aus Serum oder BAL (IA)
- ß-1,3-D-Glucan
- Lateral Flow Test (LFT)
- Pilz-DNA (PCR)
- Atemtest (2-Pentylfuran) für IA

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Lateral Flow Test (LFT)

LFT zum Nachweis einer IA Muriner Antikörper JF5

- Immunochromatographischer Test (Schwangerschaftstest)
- Muriner Antikörper JF5
  - erkennt extrazelluläres Glykoprotein von Aspergillus spp.
  - Antigen wird von wachsenden Hyphenanteilen sezerniert (≠ Konidien)
  - Rasch (15 min) und zuverlässig

Thornton et al. 2008

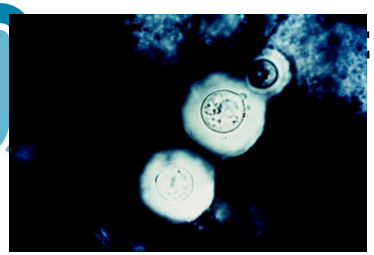
LFT im Vergleich

268 BALs von 221 Patienten mit pulmonaler Grunderkrankung
14% proven und probable invasive Aspergillosen

Test Methods	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
BAL GM > 0.5 ODI	72 (41/57)	80 (169/211)	49 (41/83)	91 (169/185)
BAL GM > 1.0 ODI	53 (30/57)	93 (196/211)	66 (30/45)	88 (196/223)
BAL GM > 3.0 ODI	33 (19/57)	99 (208/211)	86 (19/22)	88 (208/246)
BDG > 80 pg/mL	78 (43/55)	42 (84/199)	27 (43/158)	88 (84/96)
BDG > 200 pg/mL	64 (35/55)	61 (122/199)	29 (35/112)	86 (122/142)
LFD	75 (43/57)	92 (195/211)	73 (43/59)	93 (195/209)
Conventional Culture	16 (9/57)	97 (205/211)	60 (9/15)	81 (205/253)
BAL GM > 3.0 ODI and/or positive LFD	88 (50/57)	91 (192/211)	72 (50/69)	96 (192/199)

Prattes et al 2015;
Am J Respir an Crit Care Med 190:922-929

C. neoformans



- Antigen-Nachweis (Glucuronoxylmannan – Kapsel)
  - **Neuerdings auch Lateral Flow Test**
  - Sehr hohe Sensitivität (56 -100%) und Spezifität (bis zu 100%)
    - Höchste Sensitivität bei Meningitis
  - Daten in erster Linie von HIV-positiven Patienten und Patienten nach Organtransplantation

Backx et al. 2014 B J Hosp Med 75: 197-201
Binnicker et al. 2012 CVI 19: 1988-1990

Cryptococcus neoformans – Antigennachweis

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

TABLE 2 Comparison of four cryptococcal antigen assays to a consensus of the test panel using serum specimens ($n = 633$)[a]

Assay and result	No. of samples with consensus of test panel results[b]		Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	Agreement (%) (95% CI)	Kappa
	Positive	Negative				
Meridian LA						
Positive	9	0	100 (65.5, 100)	100 (99.3, 100)	100 (99.3, 100)	1.0
Negative	0	624				
Premier EIA						
Positive	5	0	55.6 (26.6, 81.2)	100 (99.3, 100)	99.4 (98.3, 99.8)	0.71
Negative	4	624				
Alpha CrAg EIA						
Positive	9	1	100 (65.5, 100)	99.8 (99.0, 99.9)	99.8 (99.0, 99.9)	0.95
Negative	0	623				
CrAg LFA						
Positive	9	0	100 (65.5, 100)	100 (99.3, 100)	100 (99.3, 100)	1.0
Negative	0	624				

[a] LA, latex agglutination; EIA, enzyme immunoassay; LFA, lateral flow assay; 95% CI, 95% confidence interval.

[b] A consensus of the test panel results was defined as at least 3 of 4 cryptococcal antigen results being in agreement. There was one sample that did not yield a consensus result; therefore, only 633 sera were included in this analysis.

Binnicker et al. 2012 CVI 19: 1988-1990

Molekularbiologische Assays

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- Rasch und sensitiv
- Mehr und mehr kommerziell erhältliche Tests, z.B.
  - Septifast (Roche Diagnostics):
    - 5 verschiedene Candida Arten
    - Nur *A. fumigatus*
  - Verschiedene Aspergillus-PCRs
    - gattungsspezifisch
    - speziesspezifisch
  - Multiplex-PCRs

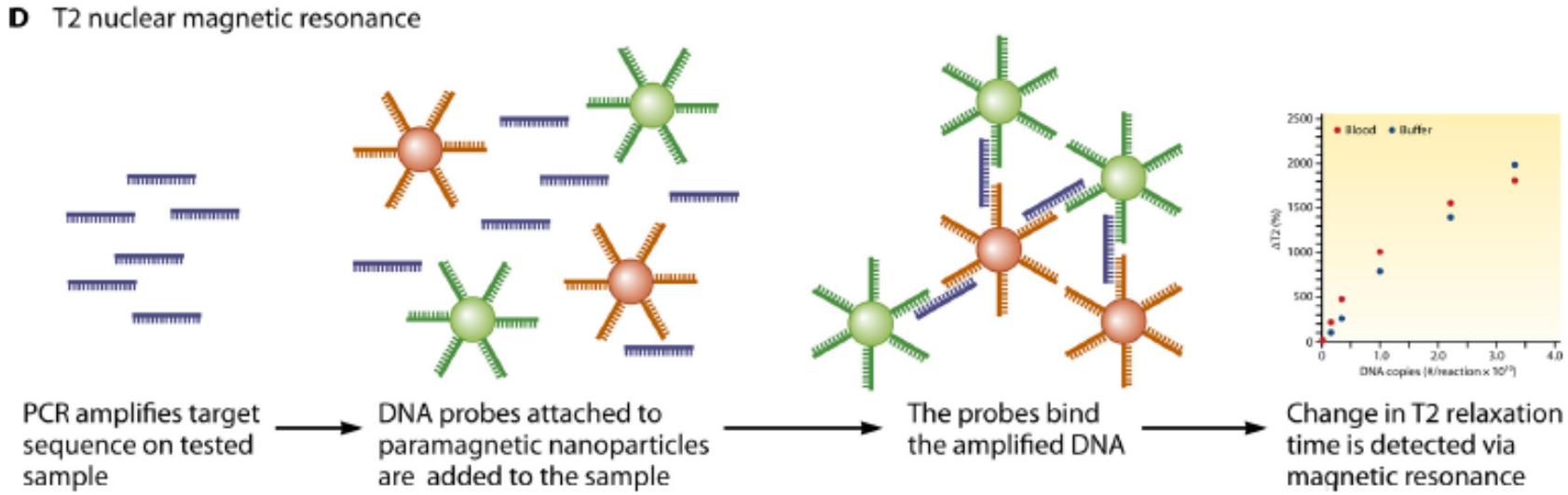
- allerdings geringe Standardisierung
- Problem falsch positiver Ergebnisse
- Vergleich der einzelnen Tests auf Grund unterschiedlicher Formate schwierig

Candida und PCR

- Candidämie nach wie vor häufigste systemische Pilzinfektion im Krankenhaus mit relativ hoher Letalität (ca. 40%)
- Blutkultur nach wie vor Goldstandard, aber nicht optimal
- PCR: Sensitivität: 80 – 100%, Spezifität: 90 – 100% in den meisten Studien
- Viele Studien deuten darauf hin, dass Candida-PCR bei Hochrisikopatienten besser als Blutkulturen abschneidet
- Standardisierung fehlt vielfach

Innings et al 2007; JCM 45: 874-880
Lewis et al. 2009; FEMS Microbiol lett 296: 1-10
Arvanatis et al. CMR 2014; 27: 490-526

T2 Magnetic Resonance Assay



Arvanatis et al. CMR 2014; 27: 490-526

Current Workflows for Species-Specific Result

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

40-50% of *Candida* infections are missed by blood culture[1]

2-5 days

Blood Culture

Species Identification (PCR, MALDI-TOF, FilmArray, Verigene)
REQUIRES POSITIVE BLOOD CULTURE

2+ hours

3-5 hours to result

Whole blood collection

T2 Magnetic Resonance

Species Specific Pathogen Detection Enables Targeted Therapy

Pfeiffer et al. (2011). *JCM*, 49(8), 2879-2883.

T2 Magnetic Resonance Assay zum Nachweis von Candidämien

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- Blutproben aus Routinediagnostik von 1801 Patienten
- 1 Set aus aerober und anaerober BK-Flasche
- 2 Röhrchen für T2MR und Negativkontrolle
- Zusatz von 5 verschiedenen Candida spp. (< 1 – 100 CFUs/ml)
  - C. albicans
  - C. glabrata
  - C. tropicalis
  - C. parapsilosis
  - C. krusei

Mylonaki et al. 2015; CID 60: 892-99

T2 Magnetic Resonance Assay zum Nachweis von Candidämien

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- Blutproben aus Routinediagnostik von 1801 Patienten
- 1 Set aus aerober und anaerober BK-flasche
- 2 Röhrchen 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

Mylonaki et al. 2015; CID 60: 892-99

PCR zum Nachweis von IA

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

	Sample type	Sample volume	Cell wall disruption*	DNA extraction methods*	PCR method†	Target gene	Appropriate controls		Minimum samples needed for positive PCR	Methods used (refs)
							Negative‡	Positive§		
Hebart et al (2000)[18]	Whole blood	5 mL	Zymolyase	QIAamp	PCR-ELISA	18S rRNA	Yes	Serial dilutions	1 and 2	36
Hebart et al (2000)[19]	Whole blood	5 mL	Zymolyase	QIAamp	PCR-ELISA	18S rRNA	Yes	Serial dilutions	1	37
Williamson et al (2000)[95]	Serum	600 µL	Lyticase	QIAamp	Nested PCR	28S rRNA	Yes	*A fumigatus* DNA (10 fg) or inhibition control	1	37
Buchheidt et al (2001)[21]	Whole blood and BALF	3–5 mL	Lyticase	Phenol-chloroform	Nested PCR	18S rRNA	Yes	Serial dilutions	1	38
Ferns et al (2002)[25]	Whole blood	2 mL	Zymolyase	QIAamp	Nested PCR	mtDNA	Yes	Serial dilutions	1	39,40
Raad et al (2002)[33]	Whole blood							ntrol (*ras*	1 and 2	39
Buchheidt et al (2004)[22]	Whole blood and BALF							ons	1 and 2	38
Kawazu et al (2004)[21]	Plasma							products in ons	1 and 2	41
Lass-Floerl et al (2004)[37]	Whole blood	10 mL	Zymolyase	QIAamp	PCR-ELISA	18S rRNA	Yes	Inhibition control	1	37
Halliday et al (2006)[27]	Whole blood	500 µL	Lyticase	Phenol-	Nested PCR	18S rRNA	Yes	Inhibition control	2	42
Jordanides et al (2005)[30]									1	37,42
Scotter et al (2005)[34]									1 and 2	38
El Mahallawi et al (2006)[24]									2	36
Florent et al (2006)[26]	Serum	..	QIAamp DNA	QIAamp	PCR-ELISA	mtDNA	Yes	*A fumigatus* DNA	2	39
White et al (200										
Cesaro et al (20										

Sensitivität: 43 – 100%

Spezifität: 64 – 100%

Nur wenig Standardisierung

↓

The European Aspergillus Initiative

Mengoli et al. 2009; Lancet /Infection 89-96

Vergleich von Biomarkern

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Characteristic	GM-EIA to Date	β-D-Glucan to Date	PCR to Date
Methodological recommendations	Single commercial assay with SOP: Platelia *Aspergillus* antigen (BioRad)	Five different commercial assays available utilizing different methods and materials: Fungitell (Associates of Cape Cod) Fungitec G-Test MK (Seikagaku Corporation) B-G Star (Maruha Corporation) (limited clinical validation reported) B-Glucan Test Wako (Wako Pure Chemicals) Dynamiker Fungus (1–3)-β-D-Glucan Assay (Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co, Ltd (limited clinical validation reported)	Several commercial assays: Pathonostics Aspergenius Roche Septifast Myconostica MycAssay Ademtech Mycogenie Renishaw Fungiplex Procedural recommendations for DNA extraction (EAPCRI)
Control material	Controls supplied by the manufacturer No independent material available	Controls supplied by the manufacturer No independent material available	Controls supplied by the manufacturer International DNA calibrator available
Quality control	Internal – BioRad Proficiency panel	No	Independent – QCMD and EAPCRI panels
Sensitivity range[a], %	Blood: 79.3 BAL: 83.6–85.7	Blood: IA: 56.8–77.1	Blood: 84–88 BAL: 76.8–79.6
Specificity range[a], %	Blood: 80.5–86.3 BAL: 89.0–89.4	Blood: 81.3–97.0	Blood: 75–76 BAL: 93.7–94.5
False positives	Yes	Yes	Yes
False negatives	Yes	Yes	Yes
Clinical utility	Yes[b,c,d]	No	Yes[b,c,d]

BDG: panfungaler Marker

White et al. 2015; CID 61:1293-1303

Kombinationen sind besser ....

Test	Sensitivity (n=8)	Specificity (n=15)	PPV	NPV
GM (0.8)	87.50 % (47.38 % to 97.93 %)	66.67 % (38.41 % to 88.05 %)	58.33 % (27.75 % to 84.68 %)	90.91 % (58.67 % to 98.49 %)
GM (1.0)	75 % (35.05 % to 96.07 %)	66.67 % (38.41 % to 88.05 %)	54.55 % (23.50 % to 83.08 %)	83.33 % (51.58 % to 97.42 %)
qPCR	100 % (62.91 % to	86.67 % (59.51 % to	80 % (44.43 % to	100 % (75.12% to

Test	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
qPCR + LFD	100 % (62.91 % to 100 %)	85.71 % (57.16 % to 97.80 %)	80 % (44.43 % to 96.89 %)	100 % (73.35 % to 100 %)

Schlussfolgerungen:

- **Alle drei Tests nützlich!**
- **Besonders günstig für IA: Kombination PCR +LFD!**

Johnson et al. JCM 2015, epub

Andere Techniken?

- Aspergillus Atemtest
  - Patient atmet in eine Kammer mit Filter
  - Gaschromatographie mit Massenspektroskopie identifiziert die verschiedenen volatilen Komponenten und Metaboliten von Aspergillus.

Koo et al. 2014, CID

Einfache Tests – mit attraktivem Testformat!

ABER: Test zielt ausschließlich auf *einen Erreger*

Für die Klinik wird aber Plattform, die unterschiedliche Erreger detektieren kann, gewünscht!

Eine Kasuistik .....

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- 24 a, männl. Patient mit akuter Leukämie mixed phenotype
- Induktionstherapie mit kompletter Remission
- Danach Konsolidierungstherapie mit komplikativem Verlauf
  - Ulzerierende Ileitis mit Perforation und Peritonitis, septischem Schock
  - Entero-enterale Fistel mit operativer Sanierung
  - Hydronephrose bds mit narbiger Verziehung des Ureter
- Geplante allo-Stammzelltransplantation wird vom Patienten abgelehnt

Ein Jahr später

- Wiedervorstellung in der hämatologischen Ambulanz wegen Schwächegefühl, Lymphadenopathie, sowie einer **druckdolenten Schwellung cervikal links**.
- Beckenkammbiopsie: Rezidiv der bekannten akuten Leukämie
- → Chemotherapie, Steroidtherapie, Pilzprophylaxe mit Posaconazol
- Tumor cervikal trotz Chemotherapie größenprogredient, einhergehend mit zunehmender Dyspnoe durch Druck auf Halsweichteile

Weiterer Verlauf

- CT: deutlich größenprogrediente Formation li cervikal (5,6 x 4,5 cm), Kompression der V. jugularis interna auf ein fadendünnes Lumen.
- Lokale Bestrahlung der cervikalen Region
- Verlegung auf Intensivstation bei beginnender CO_2-Narkose
- Tracheotomie und Biopsie des Tumors
- Im Verlauf neurologische Verschlechterung mit Hemisymptomatik rechts

  - CCT: ausgedehnter Mediainsult links mit akuten Hirndruckzeichen

trotz Trepanation verstirbt der Patient

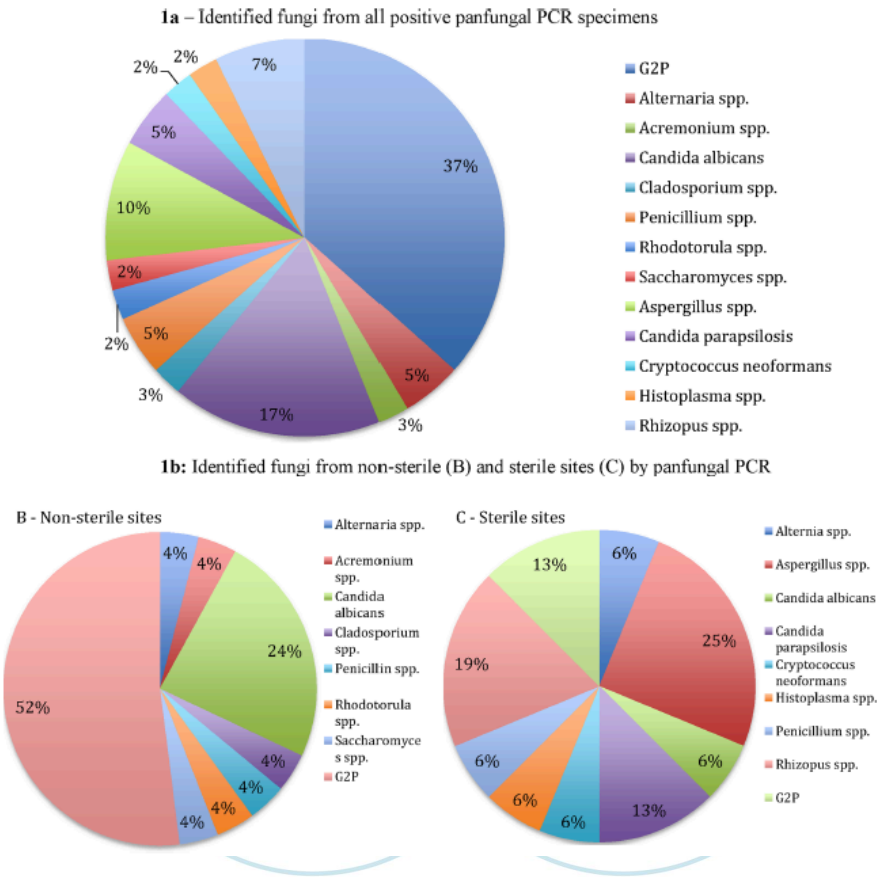
Labordiagnostik

- **Histologie** der PE:
  zahlreiche Pilzhyphen in Gefäßen und Bindegewebe

- Mikrobiologie:
  - Candida-PCR: negativ
  - Aspergillus-PCR: negativ
  - Kultur: Wachstum einige Tage später
  - GM: negativ
  - BDG: negativ
  - **Panfungale PCR: *Lichtheimia corymbifera***

ABER:
- Geringere Sensitivität der panfungalen PCR im Vergleich zu spezifischen PCRs!
- Detektiert auch Kontaminationen und Besiedelung!

Panfungale PCR



- Größte Aussagekraft bei sterilen Materialien
- Nicht-sterile Proben problematisch
- BAL problematisch: 82% > 2 PCR Produkte oder Hefen
- Empfehlung als Zusatz zu histopathologischen Untersuchung um Sensitivität und Spezifität zu verbessern

Trubiano et al. 2016; Med Mycol 54: 138-46

Vor- und Nachteile panfungaler PCR-Assays

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

PRO

- Nachweis eines breiten Spektrums von Pilzen
  - Verringert die Gefahr übersehener IFIs
- Kann seltene und „emerging“ Erreger entdecken
- Schneller als konventionelle Methoden

CON

- Geringere Sensitivität als spezifische Assays
- Falsch positive Ergebnisse auf Grund von Kontaminationen durch Umweltpilze
- Sensitivität ev. durch Begleitflora beeinträchtigt
- Nur geringe Standardisierung

Neues am Horizont?

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

PCR Electron Spray Ionisation TOF IRIDICA

- Traditional nucleic acid tests:

  "Is infectious organism X in my sample?"
- The PCR/ESI-MS method:

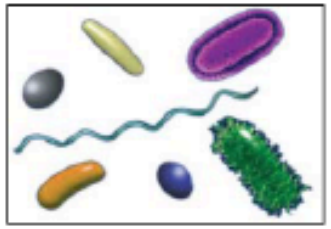
  "What infectious organisms are in my sample?"

Huttner et al CMI 2014 (20): O1059-O1066

PCR Electron Spray Ionisation TOF IRIDICA (Abbott)

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

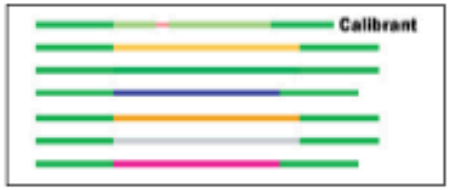
- Innovative diagnostische Plattform
- Nachweis und ID von > 1000 Infektionserreger in < 6 h in Blut, sterile Flüssigkeiten, Gewebe und BAL



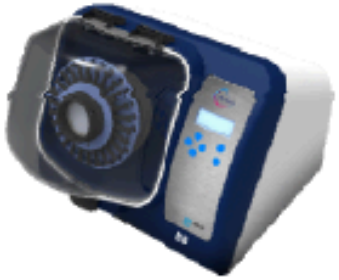
Sample Lysis

Nucleic Acids Extraction & PCR Setup

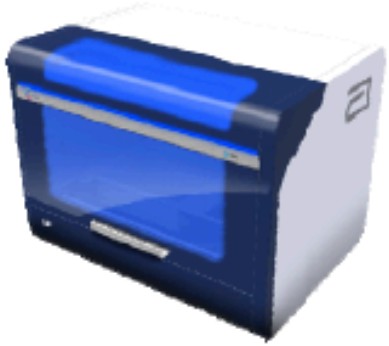
PCR Amplification



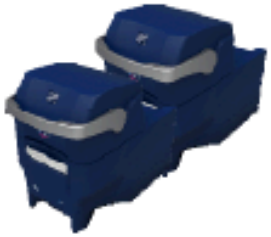
Desalting & ESI-TOF MS Analysis



Bead Beater (BB)

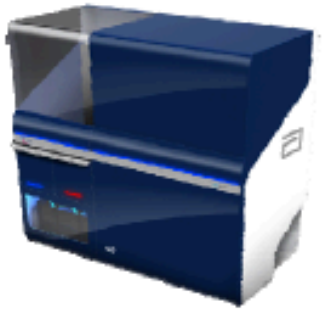


Sample Prep (SP)



Thermal Cycler (TC)

Desalter (DS)



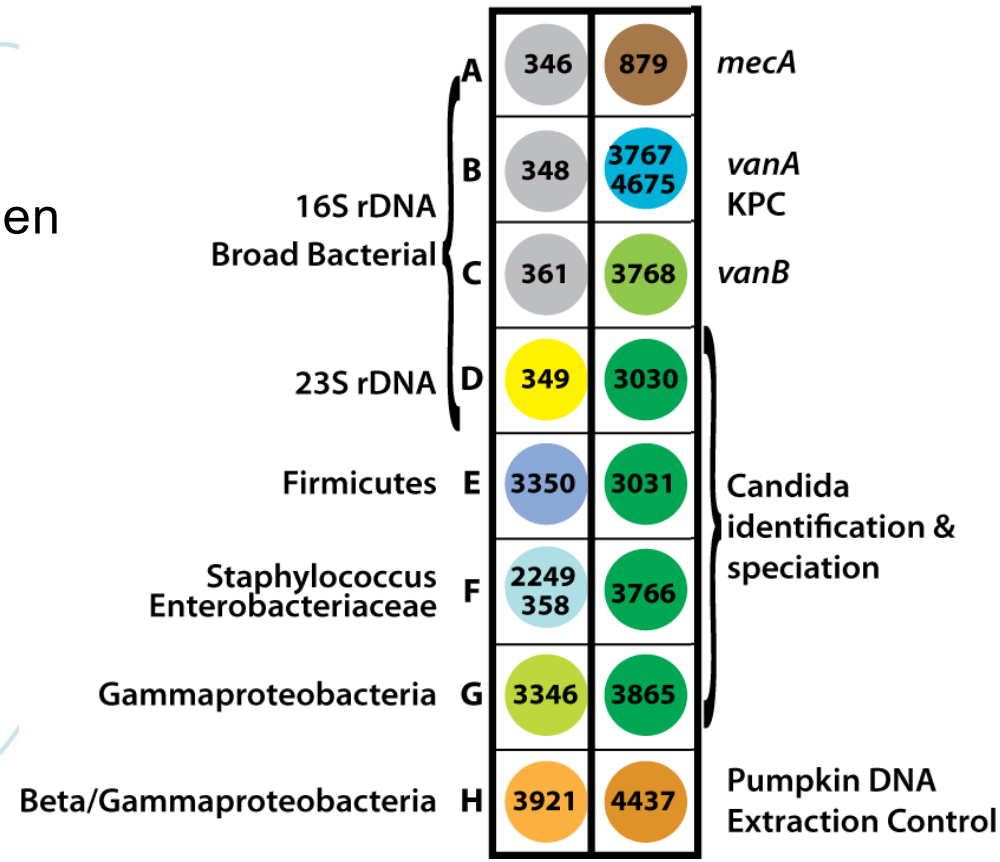
Masspectrometer (MS)

iridica
Abbott
DS
TC

IRIDICA System – PCR + ESI-MS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- Multiple Amplifikationsreaktionen:
  9 Primerpaare für Prokaryonten;
  4 Primerpaare für *Candida* spp.;
  4 Primerpaare für Resistenzgene
  (*mecA*, KPC, *vanA, vanB*)
- Messung der Gesamtmasse des Amplicons der positiven Reaktionen mittels ESI-MS, danach Suche in angeschlossener Datenbank
- Amplicon "Profile" von > 800 Spezies in der Datenbank
- PCR/ESI-MS kann mehrere gleichzeitig in einer Probe enthaltene Mikroorganismen detektieren und identifizieren



Abbott

IRIDICA (Abbott) - Fungaler Kit

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Kingdom Fungi

Genus Candida

Genus Aspergillus

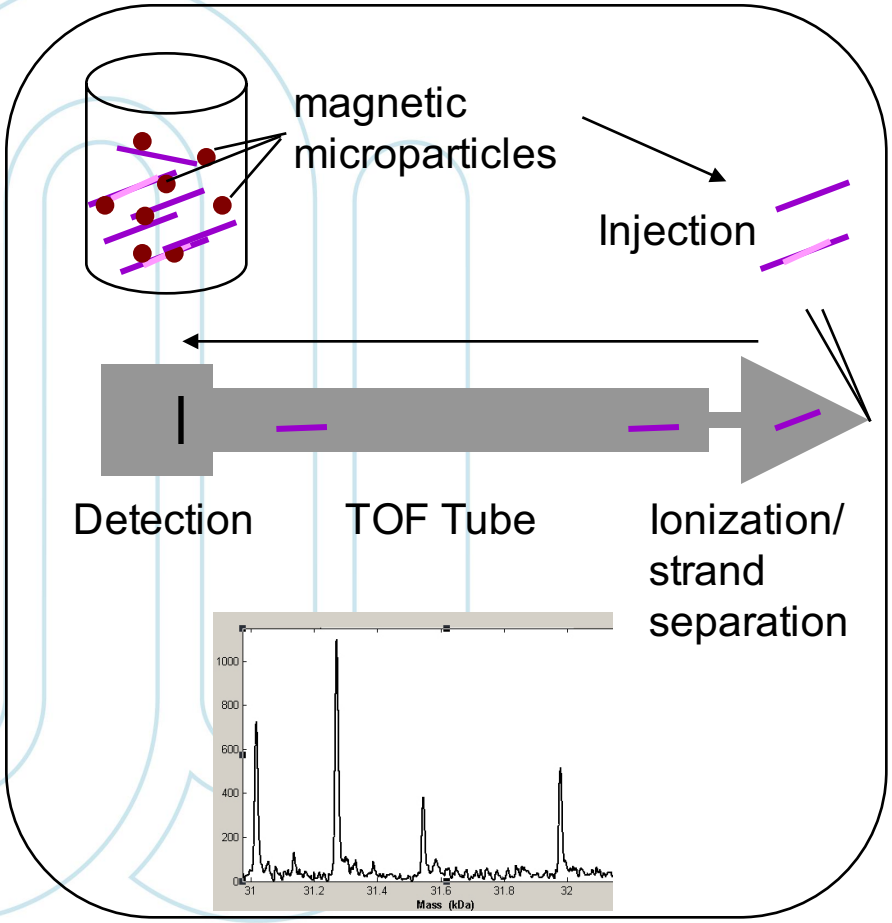
Genus Cryptococcus

LSU rRNA (broad)	A	3030	5181	*mtDNA SSU (Ascomycetes)*	**Class** Ascomycetes
LSU rRNA (broad)	B	5185	4837	*B-tubulin (Fusarium)*	**Genus** Fusarium
LSU rRNA (broad)	C	3766	5178	*SSU rRNA (broad)*	**Kingdom** Fungi
LSU rRNA (broad)	D	5186	5172	*mtDBNA cytB (Mucorales)*	**Order** Mucorales
mtDNA SSU (Candida)	E	3865	5174	*SSU rRNA (Mucorales)*	
mtDNA SSU (Candida)	F	3867	4836	*SSU rRNA (misc)*	**Kingdom Fungi**
mtDNA SSU (Aspergillus)	G	3862	5187	*LSU rRNA (broad)*	
mtDNA SSU (Cryptococcus)	H	4145	4437	*extraction control*	

Abbott

IRIDICA (Abbott) – Amplicon - ID mittels ESI-TOF MS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN



Abbott

Eigene Ergebnisse mit dem BACBSI Kit

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

10 Proben positiv mit Candida spp.

Iridica	Septifast	bloodculture
C. albicans	C.albicans	C. albicans
C.tropicalis	C.tropicalis	C.tropicalis
C.albicans	C.albicans	negative
C. albicans	C.albicans	negative
C. albicans	negative	C.albicans
negative	C.albicans	negative
Multiple Matches:E. dispar; E.durans; C. perfringens, C.albicans	C.albicans	C.albicans
Fungus detected- no ID can be provided	negative	negative
Fungus det. No ID can be provided	negative	negative
Fungus detected-no ID can be provided	C.krusei	3 x C.krusei + 1x S. haemolyticus

Unpublished data

Eigene Ergebnisse mit dem BACBSI Kit

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Specimen	Iridica	Culture
Spiked sample: Mucor indicus	Mucor sp.	
Spiked sample: C. albicans	C.albicans (normal respiratory flora)	
Spiked sample: A. fumigatus	A. fumigatus	
Spiked sample: C. glabrata	C.glabrata(normal respiratory flora)	
Spiked sample: C. neoformans	Cryptococcus neoformans	

Unpublished data

Eigene Ergebnisse mit dem BACBSI Kit

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Specimen	Iridica	Culture
Spiked sample: Mucor indicus	Mucor sp.	
Spiked sample: C. albicans	C.albicans (normal respiratory flora)	
Spiked sample: A. fumigatus	A. fumigatus	
Spiked sample: C. glabrata	C.glabrata(normal respiratory flora)	
Spiked sample: C. neoformans	Cryptococcus neoformans	
BAL	C. albicans (normal respiratory flora)	C. albicans, K.pneumoniae, E.coli, flora
Sputum in Sputasol	A. fumigatus	A.fumigatus, C.albicans
CF-Sputum in Sputasol	S. cerevisiae, Exophiala sp.	E. dermatitidis
Sputum in Sputasol	invalid:failed well count exceeds maximum limit	C.dubliniesis
Sputum in Sputasol	S. cerevisiae, C. albicans	C.albicans
BAL	invalid:failed well count exceeds maximum limit	C. albicans, A. fumigatus complex

Unpublished data

Eine weitere Studie mit PCR/ESI-MS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- ID von *Mucorales*
  - 19 nicht fixierte Gewebeproben von 13 Patienten mit gesicherter oder wahrscheinlicher Mucormykose
- Vergleich mit
  - Kultur
  - quantitativer real-time PCR, ITS PCR und 18S PCR Sequenzierung.
- Übereinstimmung von Kultur mit PCR/ESI-MS war höher als mit den anderen Methoden
- Conclusio: PCR/ESI-MS scheint sich für die *Mucorales* ID zu eignen (Dauer: 6h)

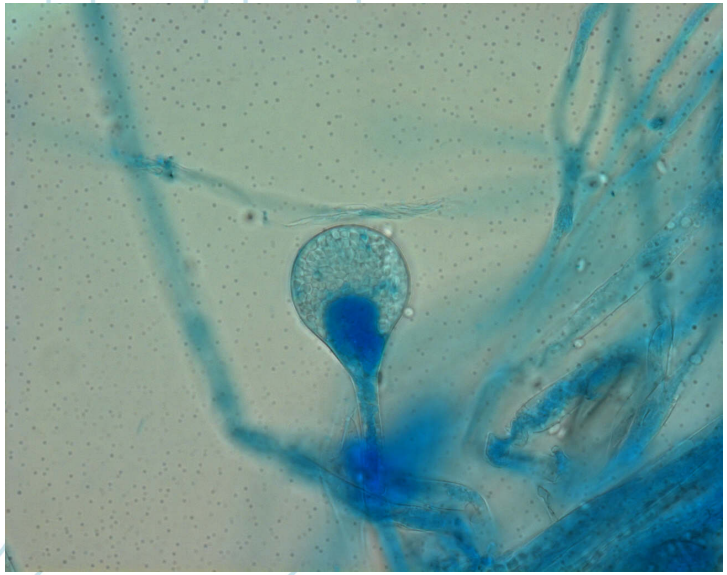
Alanio et al CMI 2015 (21): epub ahead print

Conclusio

- Frühe und verlässliche Diagnose wichtig für den und nach wie vor eine Herausforderung
- Plattformen, die ein Spektrum potentieller Erreger rasch und verlässlich detektieren erforderlich
- Neue Entwicklungen noch nicht ausreichend evaluiert, um dies abschließend beurteilen zu können

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Was wünschen wir uns von unseren Testsystemen?

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

- **Screening Test**
  - Ausschluss einer Diagnose
  - ID einer Besiedelung
  - Regelmäßige Testung erforderlich
  - Invasive Proben können nur begrenzt verwendet werden
  - Wichtig: NPV, hohe Sensitivität

- **Test zur Diagnosestellung**
  - Diagnosestellung
  - Symptomatische Patienten
  - Invasiv gewonnene Proben
  - Wichtig: PPV, hohe Spezifität

PCR: Alt und Neu

- Konventionell
  - Keine Quantifizierung

ALT

- Nested-PCR
  - Benötigt zusätzlich Zeit
  - Kontaminationsgefahr durch weiteren Ampflifikationsschritt

- Real-Time PCR
  - Ermöglicht Quantifizierung
  - Unterscheidung zw. Infektion und Kontamination

NEU

Arvanatis et al. CMR 2014; 27: 490-526

Untersuchungsmaterialien

- Vollblut zeigt bessere Sensitivität als Plasma
  - Antikoagulantien können Sensitivität beeinträchtigen (z.B. Heparin, Na-Citrat)
- Serum
  - Weniger falsch positive Reaktionen, könnte aber Sensitivität beeinflussen
- BAL
  - Hohe Sensitivität und Spezifität
- Liquor
  - Nur wenige Studien, könnte aber Potential haben

Arvanatis et al. CMR 2014; 27: 490-526