

Multiplex-PCR in der Mykologie

Birgit Willinger

Abteilung für Klinische Mikrobiologie

Klinisches Institut für Labormedizin

Medizinische Universität Wien



Meine Disclosures (über die letzten 5 Jahre)

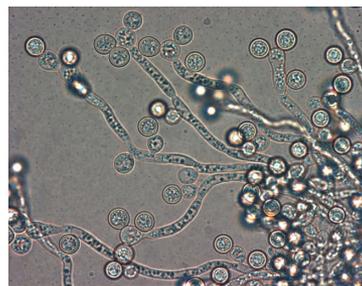
- Advisory Board: Merck Sharp&Dohme, Pfizer
- Referentenhonorare: Pfizer, Gilead Sciences, bioMerieux, Diasorin, Immy, Cape Cod, Shionogi, Euroimmun

Welche Arten von PCR gibt es in der Medizinischen Mykologie?

- **Gezielte PCR**
 - *Candida* spp.
 - *Aspergillus* spp.
 - *Mucorales*
 - In House-Protokolle
- **Breitspektrum-PCR - panfungal**
- **Multiplex-PCR**
 - simultane Amplifikation von mehreren DNA/RNA-Zielsequenzen von Erregern in einem einzigen Probenlauf

Konventionelle Diagnostik versus Multiplex-PCR

- Mikroskopie
- Kultur
- Identifizierung und Resistenztestung
- Kombination mehrerer Schritte
- Dauer: mehrere Tage bis teilw. Wochen
- Mehrere Erreger in einem Untersuchungsgang
- Syndrombasierte Panels
 - GI-Infektionen
 - Infektionen des Respirationstrakts
 - STI
 - Meningitis
 - Sepsis
- Befund liegt innerhalb weniger Stunden vor



Anforderungen an Multiplex-PCR

- Auswahl der richtigen DNA-Extraktionsmethode, Primer und viele andere technische Parameter, um ausreichende Sensitivität und Spezifität zu garantieren
- Amplifikation aller in der Probe vorhandenen bzw. gesuchten Spezies mit gleicher Effizienz
- Ausreichende Sensitivität
 - Zu geringe Sensitivität vergrößert das Risiko falsch negativer Befunde
 - ▣➔ Konsequenz: Stoppen einer laufenden Therapie oder falsche Wahl der antifungalen Therapie
 - Sensitivität von vielen Faktoren abhängig (von DNA-Extraktion bis PCR)
 - bei Multiplex-PCR aber von noch größerer Bedeutung als bei konventioneller PCR

Beispiel: Sepsis

Mikrobiologische Diagnostik bei Sepsis

- 2 Herangehensweisen
 - aus positiver Blutkultur
 - MALDI-TOF
 - Molekularbiologisch
 - LAMP: z.B. eazyplex (amplex)
 - PCR-basierte Detektionssysteme
 - Biofire- BCID2
 - Eplex Bloodculture ID Panels
 - Xpert/MRSA, Carba/R (Cepheid)
 - Verigene
 - Direkt aus Vollblut
 - Multiplex PCR (z.B. Magicplex™ Sepsis Real-Time Test, Seegene; Fungiplex Candida, Bruker Daltonik; eplex-System GenMark DX, Roche)
 - T2Dx
 - Breitspektrum-PCR
 - NGS (zukünftig)



Pro und Contra

Direct MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures		MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures using short sub-culture on solid medium		Molecular methods for identification from positive blood cultures	
ADVANTAGES	LIMITATIONS	ADVANTAGES	LIMITATIONS	ADVANTAGES	LIMITATIONS
<p>Very rapid identification</p> <p>Easy</p> <p>Low additional cost</p>	<p>Identification difficulties with some species</p> <p>Confirmation might be needed</p> <p>Mixed cultures</p>	<p>Rapid identification</p> <p>Very easy</p> <p>Easy to integrate in lab workflow</p> <p>Confirmation usually not needed</p>	<p>Slow-growing organisms</p> <p>Mixed cultures</p>	<p>Rapid identification</p> <p>Easy</p>	<p>High cost</p> <p>Confirmation needed</p> <p>Limited pathogen panels</p>

Blutkultur Panel BCID 2[®] (biofire)

Grampositive Bakterien	Gramnegative Bakterien
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> Komplex <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Gruppe <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Hefen	Antibiotika-Resistenzgene
<i>Candida albicans</i> <i>Candida auris</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Carbapenemasen IMP KPC OXA-48-like NDM VIM Colistin-Resistenz <i>mcr-1</i> ESBL CTX-M Methicillin-Resistenz <i>mecA/C</i> <i>mecA/C</i> and MREJ (MRSA) Vancomycin-Resistenz <i>vanA/B</i>

43
TARGETS
1 hr

Performance von BCID2

Organism	No. of samples with BCID2/ culture result of:				% PPA (95% CI)	% NPA (95% CI)	% OPA (95% CI)	k (95% CI)
	+/+	+/-	-/+	-/-				
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	0	0	0	152		100 (98–100)	100 (98–100)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	5	0	0	147	100 (48–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
Enterobacteriales	64	0	3	85	96 (87–99)	100 (96–100)	98 (95–100)	0.96 (0.92–1)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	13	0	0	139	100 (75–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Escherichia coli</i>	31	0	1	120	97 (84–99)	100 (97–100)	99 (97–100)	0.98 (0.94–1)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	0	0	149	100 (29–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	152		100 (98–100)	100 (98–100)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	8	0	0	144	100 (63–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Proteus</i> spp.	3	0	0	149	100 (29–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Salmonella</i>	1	0	0	151	100 (0–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	0	147	100 (48–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	0	152		100 (98–100)	100 (98–100)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	0	0	0	152		100 (98–100)	100 (98–100)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	0	0	139	100 (75–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0	0	150	100 (16–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	0	0	147	100 (48–99)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Enterococcus faecium</i>	13	0	1	138	93 (66–99)	100 (98–100)	99 (97–100)	0.96 (0.88–0.98)
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	0	151	100 (0–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
Staphylococcus spp.	32	1	0	119	100 (89–100)	99 (95–100)	99 (97–100)	0.98 (0.94–0.98)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	0	147	100 (48–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19	3	0	130	100 (82–100)	98 (94–100)	98 (94–100)	0.92 (0.82–0.98)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	1	0	151		99 (96–100)	99 (97–100)	0
Streptococcus spp.	14	1	1	136	93 (68–100)	99 (96–100)	99 (96–100)	0.93 (0.83–1)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	0	151	100 (0–100)	100 (98–100)	100 (98–100)	1
<i>Candida albicans</i>	2	0	1	149		67 (9–99)	100 (98–100)	99 (97–100)
<i>Candida auris</i>	0	0	0	152			100 (98–100)	100 (98–100)
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	152			100 (98–100)	100 (98–100)
<i>Candida krusei</i>	1	0	0	151		100 (0–100)	100 (98–100)	100 (98–100)
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	152			100 (98–100)	100 (98–100)
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	152			100 (98–100)	100 (98–100)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	0	0	152			100 (98–100)	100 (98–100)

Performance von BCID2

Table 4 Pooled performance characteristics of the BCID2 for specific targets and sub-groups of targets of interest

	SE% (95% CI)	SP% (95% CI)	LR+ (95% CI)	LR- (95% CI)	DOR (95% CI)	AUC (95% CI)	Studies included
<i>E. faecalis</i>	92.3 (83.5–96.6)	99.6 (98.9–99.8)	225.77 (83.73–608.76)	0.08 (0.04–0.15)	2938.91 (881.60–9797.14)	0.982 (0.967–0.990)	9
<i>E. faecium</i>	92.3 (81.9–97.0)	99.6 (98.7–99.9)	216.44 (70.69–662.76)	0.08 (0.04–0.17)	2816.75 (722.86–10,975.99)	0.982 (0.964–0.991)	7
<i>L. monocytogenes</i>	86.1 (55.7–96.8)	99.9 (98.9–1.00)	577.99 (73.61–4538.35)	0.14 (0.04–0.44)	4157.81 (393.01–43,987.07)	0.985 (0.952–0.995)	3
<i>Staphylococcus spp.</i>	97.4 (94.1–98.8)	98.8 (97.3–99.5)	83.35 (36.93–188.14)	0.03 (0.13–0.06)	3133.31 (1044.73–9397.36)	0.982 (0.970–0.990)	9
<i>S. epidermidis</i>	92.0 (77.4–97.5)	98.1 (93.1–99.5)	48.79 (13.35–178.29)	0.08 (0.03–0.23)	600.80 (113.95–3167.703)	0.961 (0.914–0.983)	8
<i>S. lugdunensis</i>	87.7 (66.1–96.3)	99.6 (98.0–99.9)	211.065 (42.892–1038.63)	0.12 (0.05–0.34)	1708.12 (260.86–11,184.63)	0.976 (0.942–0.991)	4
<i>Candida spp.</i> ^b	92.0 (81.5–96.8)	99.5 (98.6–99.8)	199.18 (66.57–595.94)	0.08 (0.04–0.17)	2474.911 (653.62–9371.24)	0.980 (0.962–0.990)	8
<i>mcr-1</i>	77.3 (42.6–94.0)	99.6 (96.4–1.00)	183.42 (21.61–1556.53)	0.23 (0.07–0.71)	804.36 (71.33–9071.12)	0.966 (0.894 to 0.990)	3
<i>mecA/C</i>	93.8 (88.6–96.7)	98.8 (97.6–99.4)	78.94 (38.88–160.24)	0.06 (0.04–0.11)	1262.31 (510.55–3121.01)	0.973 (0.958–0.982)	8
<i>vanA/B</i>	90.9 (76.7–96.8)	99.7 (99.0–99.9)	347.03 (92.35–1304.12)	0.09 (0.04–0.21)	3820.95 (793.29–18,403.99)	0.984 (0.966–0.993)	5

Ein weiteres Panel: ePlex[®], Genmark Dx, Roche

ePlex[®] Blood Culture Identification Panels

Gram-Positive Panel

<i>Bacillus cereus</i> group	
<i>Bacillus subtilis</i> group	
<i>Enterococcus</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	
<i>Streptococcus</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	
<i>Streptococcus anginosus</i> group	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (GAS)	
<i>Cutibacterium acnes</i>	
<i>Corynebacterium</i>	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Listeria</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Micrococcus</i>	
<i>mecA</i>	<i>vanA</i>
<i>mecC</i>	<i>vanB</i>
Pan Gram-Negative	
Pan Candida	



Gram-Negative Panel

<i>Acinetobacter baumannii</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Citrobacter</i>	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	
<i>Enterobacter</i> (non-cloacae complex)	
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	
<i>Haemophilus influenza</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	
<i>Morganella morganii</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Proteus</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella</i>	
<i>Serratia</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
CTX-M	VIM
KPC	IMP
NDM	OXA
Pan Gram-Positive	
Pan Candida	



Fungal Pathogen Panel

<i>Rhodotorula</i>
<i>Fusarium</i>
<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida lusitanae</i>
<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Candida famata</i>
<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida quilliermondii</i>
<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida krusei</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Candida auris</i>



Gramfärbung erforderlich!

Ein weiteres Panel: ePlex[®], Genmark Dx, Roche

Panel, organism(s) detected	No. with indicated result/no. of specimens tested (% agreement)	
	Positive	Negative
Yeasts		
<i>Candida albicans</i>	9/9 (100)	304/304 (100)
<i>Candida parapsilosis</i>	4/4 (100)	309/309 (100)
<i>Candida glabrata</i>	2/2 (100)	311/311 (100)
<i>Candida tropicalis</i>	2/2 (100)	311/311 (100)
<i>Candida krusei</i>	1/1 (100)	312/312 (100)
<i>Candida lusitanae</i>	2/2 (100)	311/311 (100)

Sehr gut:

- Turnaround time: 90 min
- Sehr gute Sensitivität und Spezifität

Aber:

- Hohe Kosten
- Keine Resistenzbestimmung

Molekularbiologischer Erregernachweis bei Sepsis direkt aus Blut

Nucleic acid amplification-based technologies for the diagnosis of bloodstream infections from whole blood

Technology	Assay (manufacturer)	TAT (h)	Organisms detected	Resistance genes detected	Complexity–Personnel experience level	Sensitivity/specificity	FDA clearance/CE marked	Commercially available	Ref.
Multiplex real-time PCR	Magicplex™ Sepsis Real-Time test (Seegene)	3–5	73 Gram positives, 12 Gram negatives, 6 fungi	<i>mecA</i> , <i>van A/B</i>	Multi-step automated Specially trained personnel	29%–65%/66%–95%	CE marked	Yes	[7,8]
Multiplex real-time PCR	Fungiplex® Candida (Bruker Daltonik)	3	<i>Candida</i> spp. (<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. tropicalis</i>), <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i>	—	Partially automated Specially trained personnel	100%/94.1%	CE marked	Yes	[9,10]
PCR + miniaturized magnetic resonance	T2Candida® panel (T2Biosystems)	3–5	5 <i>Candida</i> species <i>C. albicans</i> / <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> / <i>C. krusei</i> and <i>C. parapsilosis</i>	—	Fully automated Trained personnel	91%/99%	FDA approved CE marked	Yes	[13,14,59]
	T2Bacteria® panel (T2Biosystems)	4–7	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> ^a , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	—	Fully automated Trained personnel	90%/96%–98%	FDA approved CE marked	Yes	[26–28]
	T2Resistance® panel (T2Biosystems)	3–5	—	<i>CTX-M 14</i> , <i>CTX-M 15</i> , <i>CMY</i> , <i>DHA</i> , <i>KPC</i> , <i>OXA-48</i> , <i>NDM</i> , <i>VIM</i> , <i>IMP</i> , <i>vanA B</i> , <i>mecA C</i>	Fully automated Trained personnel	NA	CE marked FDA 'Breakthrough Device' designation	No	[33]
	T2Cauris™ (T2Biosystems)	5	<i>Candida auris</i> , <i>Candida duobushaemulonii</i> , <i>Candida haemulonii</i>	—	Fully automated Trained personnel	89%/98%	None yet	No	[33,34]

Abbreviations: CE, European Conformity; FDA, US Food and Drug Administration; TAT, turnaround time; NA, Not available.

^a *Acinetobacter baumannii* is CE marked only and not FDA approved, so is not in the panel in the USA.

Syndrombasierter Ansatz bei Meningitis

- Meningitis –Panel (biofire):
 - C. neoformans/C. gattii – Sensitivität 96%; allerdings schlechtestes Ergebnis bzgl. falsch negativer Ergebnisse nach HSV
 - Falsch negative Befunde in erster Linie
 - Unter Therapie
 - nach Clearing von Cryptococcus
 - bei positivem Antigennachweis

Wie gut sind die Plattformen technisch?

- Panels technisch ausgereift (umfassende Vergleichsstudien)
- Die häufigsten Erreger sind abgedeckt, seltene Erreger werden nicht erfasst
- ABER:
 - teilweise nur wenige Erreger untersucht
 - analytische Sensitivität geringer als bei Einzel-PCRs
 - in der Regel keine Ct-Werte verfügbar

Wichtige klinische Fragen

- Änderung des therapeutischen Managements durch früheres Ergebnis?
 - Änderung der antimikrobiellen Therapie
 - Deeskalation oder Eskalation
 - Katheterwechsel, Hygienemaßnahmen etc.
- Änderung der antimikrobiellen Therapie auf Grund des Ergebnisses?
- Gäbe es durch das alleinige molekularbiologische Ergebnis falsche Entscheidungen?
- Würde das Fehlen dieser Ergebnisse einen Nachteil für die Patienten bedeuten?

**Direkte Kommunikation mit den Kliniker*innen
und ABS von großer Bedeutung!**

Aspergillus



Molekularbiologischer Nachweis von Aspergillus

Table 1. Main mycological results concerning *Aspergillus* spp. of four different multiplex assays.

Multiplex method	No. of species	List of the species included in the assay				Main results for detecting <i>Aspergillus</i> spp. in clinical samples	Reference
		<i>Aspergillus</i> species	<i>Candida</i> species	Mucorales species	Other fungal species		
DNA microarray	14	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus terreus</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Candida tropicalis</i>	<i>Mucor racemosus</i> <i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Scedosporium prolificans</i> <i>Trichosporon asahii</i>	Two out of six patients with proven or probable IA were negative	27
Multiplexed PCR and liquid-phase array	11	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i>	/	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Mucor indicus</i> <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	<i>Scedosporium prolificans</i> <i>Scedosporium apiospermum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> / <i>Fusarium solani</i>	The sensitivity of the assay was 58% (11/19) for <i>A. fumigatus</i> , and 67% (2/3) for <i>A. flavus</i>	28
Electrospray-ionization mass spectrometry (PCR/ESI-MS)	>136*	<i>Aspergillus</i> spp. +25 <i>Aspergillus</i> species*	<i>Candida</i> spp. +19 ascomycetous yeasts species*	17 Mucorales species*	10 <i>Paecilomyces</i> / <i>Penicillium</i> species 5 <i>Fusarium</i> species 4 <i>Cryptococcus</i> species 3 dermatophyte species 2 <i>Scedosporium</i> species 2 <i>Malassezia</i> species <i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Trichosporon inkin</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>Cladophialophora bantiana</i> <i>Sporotrix shenckii</i> 41 other fungal species	Detection out of 691 BAL fluids of 4 <i>A. fumigatus</i> , 2 <i>Aspergillus versicolor</i> , and 1 <i>A. flavus</i>	26
Multiplex real-time PCR assay	7	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus lentulus</i> <i>Aspergillus udagawae</i> <i>Aspergillus viridimitans</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i>	/	/	/	Out of 19 BAL fluids of patients with invasive aspergillosis, 16 (84%) had a positive PCR (2 <i>Aspergillus</i> sp. and 14 <i>A. fumigatus</i> samples).	29

Multiplex-PCR zum Nachweis der invasiven Aspergillose

- Evaluation von AsperGenius (Pathonostics) zum Nachweis von *A. fumigatus* und Azolresistenz
- Prospektiver Vergleich von Kultur, Galactomannan und PCR aus BAL bei Patienten mit allogener HSCT
 - 23 Pat. mit gesicherter/wahrscheinlicher IA
 - PCR 65% Sensitivität bei wahrscheinlicher IA
 - Kombi PCR + GM: 96% Sensitivität, 100 % Spezifität
- Nachweis einer Azolresistenz in 4 Fällen mit kultureller Bestätigung
 - 3 Patienten mit Mutation im *cyp51A* Gen (3/23; 13%)
 - 1 Patient mit Y121F/T289A Mutation
 - 2 Patienten L98H
- Azolresistenz wurde kulturell gleich gut wie mit PCR detektiert

Multiplex-PCR zum Nachweis von invasiver Aspergillus

- AsperGenius® 2.0 Species, AsperGenius® 2.0 Resistance TR Multiplex real-time PCR Kit (Pathonostics)
- Nachweis von *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Aspergillus* species und Azol Resistenz
- Evaluierung durch klinische Studien noch ausständig bzw. noch gering
- Studie mit baldigem Beginn in Planung
 - bei Interesse bitte melden

Species multiplex PCR detects and differentiates:

- *Aspergillus fumigatus* complex
- *Aspergillus terreus*
- *Aspergillus* species



Resistance multiplex PCR detects:

- TR34, L98H
- Y121F, T289A

AsperGenius

Aspergillus-PCR mit BAL bei Patienten mit hämatologischer Erkrankung

- Prospektive Studie mit 12 Zentren in Belgien und Holland
- Hämatologische Patienten mit einem neuen pulmonalen Infiltrat und Bronchoskopie/BAL
 - 70% akute Leukämie, MDS
 - 32% allogene Stammzelltransplantation
- Primärer Endpunkt
 - Antifungal treatment failure bei Patienten mit azolresistenter IA oder Wechsel zu anderer Substanzklasse
- Sekundärer Endpunkt
 - Prävalenz von Azolresistenz
 - Outcome der Patienten mit positiver Aspergillus-PCR

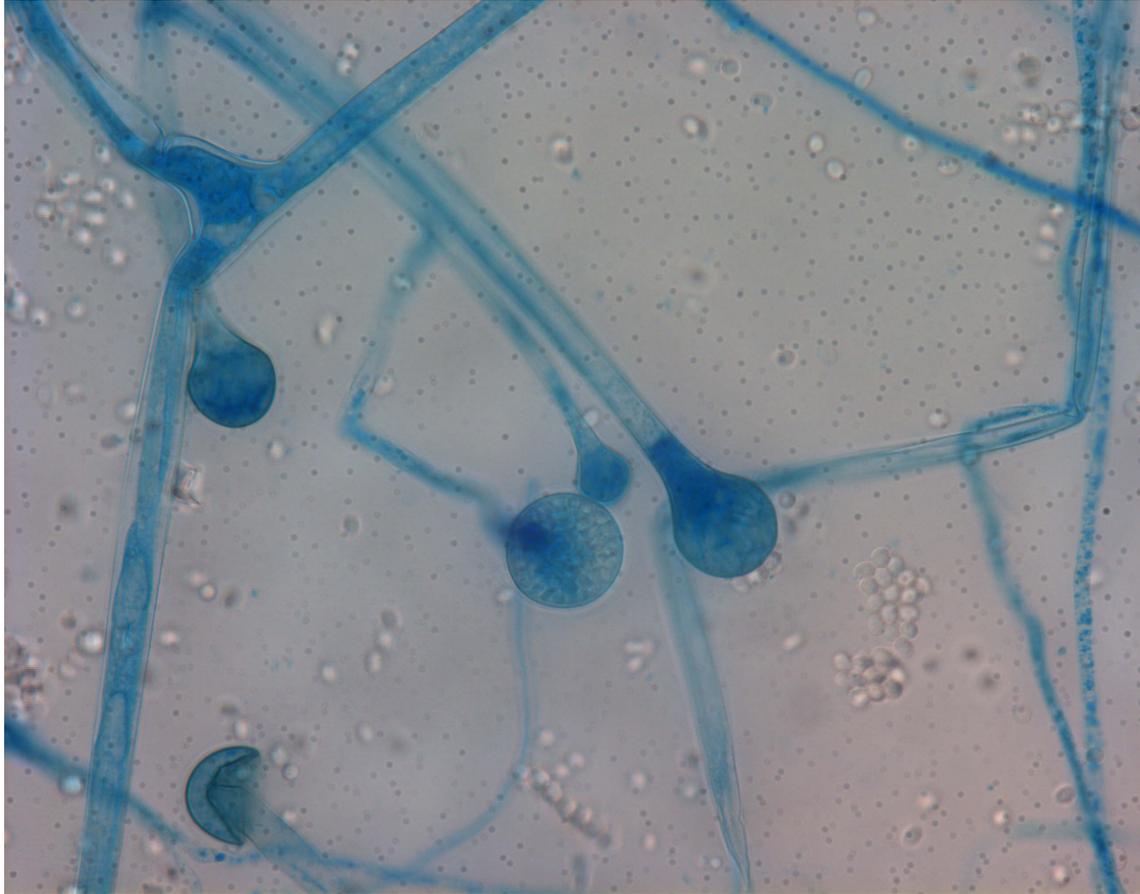
Ergebnisse Aspergillus-PCR mit BAL bei Patienten mit hämatologischer Erkrankung

- 323 Patienten → 299 Pat. mit ausreichendem BAL-Volumen
 - 95 (34%) wahrscheinliche IA
 - 24 (8%) positive Kultur mit Aspergillus
 - 116/239 (40%) Aspergillus PCR positiv
 - 89/293 (30%) *A. fumigatus* PCR +
 - 58/89 (58%) PCR mit eindeutigem Ergebnis
 - 8/58 (14%) zeigten Resistenz
 - 2 gemischt empfindlich/resistent – Ausschluß
 - 6 Patienten ohne Ansprechen
- ABER: Letalität der Patienten mit einer einzigen positiven PCR entsprach der mit einer negativen PCR.

Häufiger Nachweis von Aspergillus-DNA mit BAL bei Patienten mit hämatologischer Erkrankung

- Positive PCR wurde in 1/5 Patienten mit negativer Kultur und GM beobachtet
 - Bei 80% dieser Patienten wurde eine Therapie begonnen
 - Letalität nach 6 Wochen wurde dadurch nicht beeinflusst
- 71/231 (31%) Patienten mit positiver PCR hatten GM < 1
- Resistenzergebnisse passten besser, wenn BAL-GM > 1 (89%) vs GM < 1 (48%)
- Resistenz wäre nur bei 2 Patienten mit Kultur nicht detektiert worden
- Klinischer Impact bei hämatologischer Erkrankung und pulmonalen Infiltrat nicht endgültig beurteilbar

Mucorales



Multiplex-PCR zum Nachweis von Mucorales

- **Mucorgenius (Pathonostics)**
 - Target: 28S rRNA Gen, erfasst *Rhizopus* spp, *Rhizomucor* spp, *Mucor* sp., *Lichtheimia* spp., *Cunninghamella* spp.
 - 319 pulmonale Proben von 319 Patienten (BAL, Biopsien, Sputum, TS)
 - Probenmaterial: BAL, Gewebe
 - Vergleich zur in house-PCR

Table 2

Concordance between the in-house and MucorGenius® PCR assays (N = 319).

		In-house PCRs n (%)		Total
		Positive	Negative	
MucorGenius® n (%)	Positive	27	0	27
	Negative	6 ^a	286	292
	Total	33	286	319

^a *Mucor-Rhizopus* (n = 4), *Rhizomucor* (n = 2)

6 „falsch negative“ Ergebnisse: low fungal burden; nur in house PCR bis auf eine Probe mit kulturell nachgew. Mucor

Multiplex-PCR zum Nachweis von Mucorales

- Mucorgenius (Pathonostics)
 - Vergleich zur in house-PCR
 - Mucorgenius: 9/10 Fällen richtig positiv

Diagnostic performance of the in-house mucorales and MucorGenius® PCR assays compared to conventional mycology (N=319).

	Rate of positive tests according to IMD group n (%), N=319			
	Proven/probable mucormycosis N = 10 ^a	Proven/probable IA N = 63	Possible IMD N = 152	Excluded IMD N = 94
Detection of mucorales by microscopic examination and/or culture N=10	10 (100%)	0	0	0 ^b (0.0%)
Direct Examination ^c	7 (70.0%)	0	0	0
Positive culture	7 ^d (70.0%)	0	0	0
In-house PCR N= 33	10 (100%)	6 ^e (9.5)	13 ^e (8.6)	0
<i>Mucor-Rhizopus</i> , n = 20	4/10	4 ^f /6	9/13	0
<i>Rhizomucor</i> , n = 8	1/10	3 ^f /6	3/13	0
<i>Lichtheimia</i> , n = 6	5/10	0	1/13	0
<i>Cunninghamella</i> , n = 1	0	1/6	0	0
MucorGenius® PCR N=27	9 (90.0%)	6 (9.5)	10 (6.6%)	0

1 proven/probable MM: low fungal burden

MucorGenius zum Nachweis von Mucorales

- Mucorales PCR ist ein wichtiges zusätzliches Werkzeug zur konventionellen Mykologie bei Proben aus der Lunge
- MucorGenius[®] und in-house PCRs zeigten eine exzellente Sensitivität (90-100%) and Spezifität (>95%)
- MucorGenius[®] geeignet für das Screening von pulmonalen Infektionen, kann aber falsch negative Ergebnisse bei geringen DNA-Konzentrationen liefern
- Pulmonale Aspergillus/Mucorales Koinfektionen kommen bei Immunsupprimierten vor und können übersehen werden, wenn man nicht danach sucht
- Keine Unterscheidung der einzelnen Gattungen und Arten

Multiplex-PCR zum Nachweis von Dermatophyten

Microarray (Euroimmun)

EUROArray Dermatomycosis - Erregerspektrum

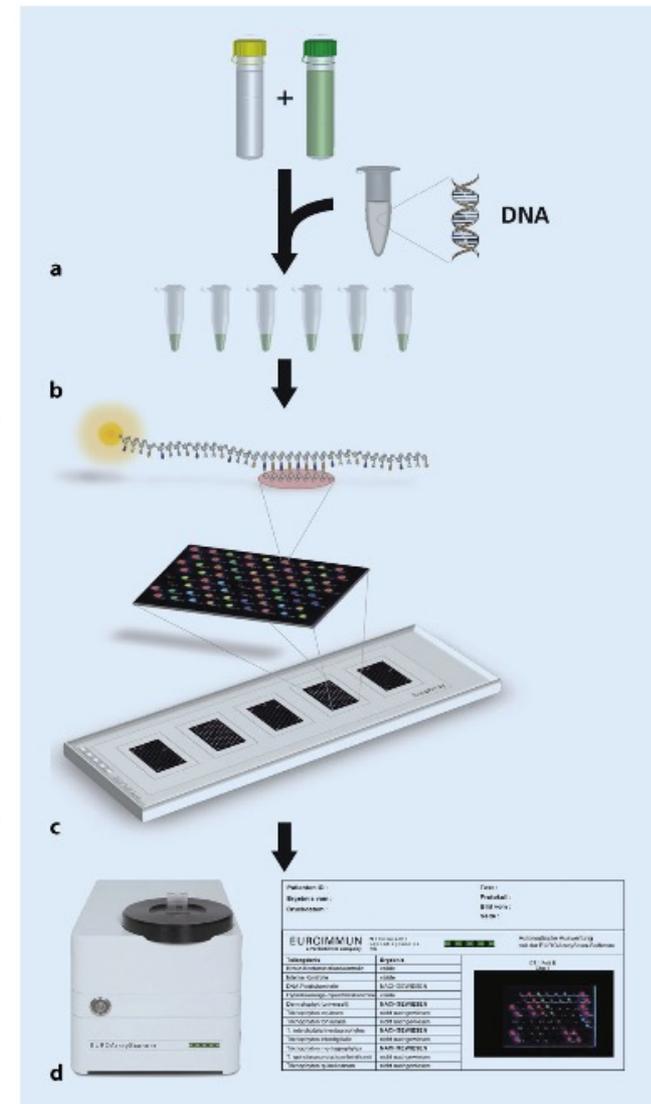
23 Dermatophyten-Spezies

Anthropophil	<i>T. tonsurans</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. concentricum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. ferrugineum</i> , <i>M. audouinii</i>
Zoophil	<i>T. eriotrephon</i> , <i>T. equinum</i> , <i>T. mentagrophytes*</i> (<i>T. interdigitale</i>), <i>T. simii</i> , <i>T. quinckeanum*</i> (<i>T. mentagrophytes</i>), <i>T. erinacei</i> , <i>T. bullosum</i> , <i>T. benhamiae*</i> (<i>A. benhamiae</i>), <i>T. verrucosum</i> , <i>M. canis</i> , <i>N. persicolor*</i> (<i>M. persicolor</i>)
Geophil	<i>Geophil</i> , <i>N. fulva*</i> (<i>M. fulvum</i>), <i>N. gypsea*</i> (<i>M. gypseum</i>), <i>N. incurvata*</i> (<i>M. incurvatum</i>)

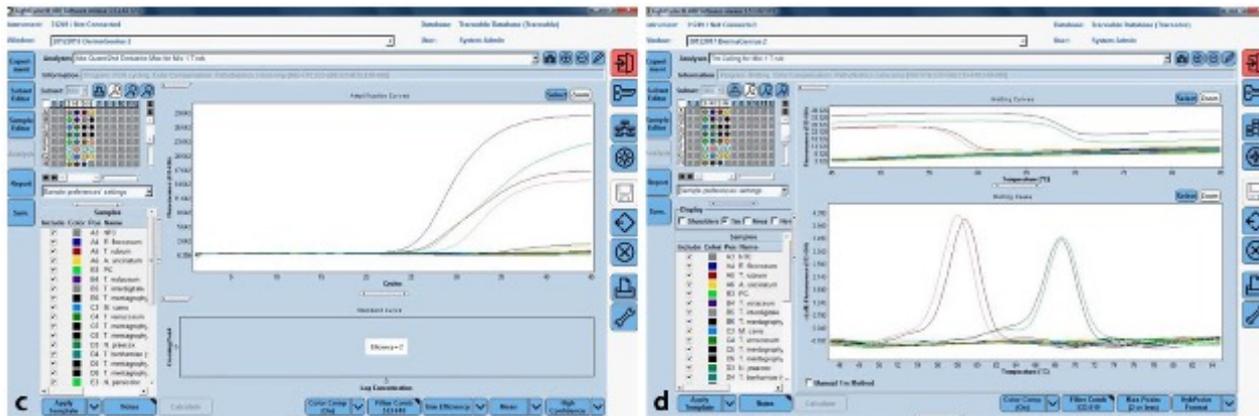
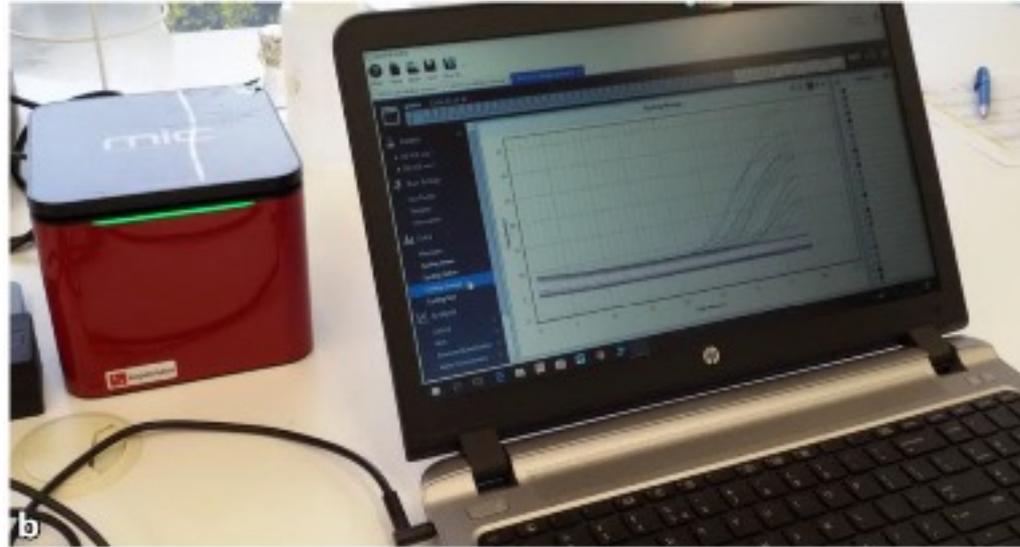
*neue Nomenklatur (Hoog et al, Mycopathologia: 2017 Feb; 182(1-2):5-31)

3 Hefen und 3 Schimmelpilze

C. parapsilosis, *C. guilliermondii*, *F. oxysporum*, *C. albicans*, *F. solani*, *Sc. brevicaulis*



Dermagenius (Pathonostics)- Multiplex-PCR



Vergleich EuroArray und DermaGenius: eigene Daten

	EUROArray (strain collection)	DermaGenius (strain collection)	EUROArray (patient isolates)	DermaGenius (patient isolates)
T. mentagrophytes	5/5	3/5	3/3	2/3
T. interdigitale	11/11	11/11	0/0	0/0
T. benhamiae	4/4	4/4	2/2	2/2
T. tonsurans	5/5	3/5*	2/2	1/2*
T. rubrum/soudanense	13/13	13/13	17/17	17/17
T. violaceum	1/1	1/1	2/2	2/2
T. erinacei	3/3	0/3**	0/0	0/0
T. verrucosum	1/1***	1/1	2/2***	2/2
T. quinckeanum	0/1****	0/1****	0/0	0/0
M. canis	5/5	5/5	4/4	4/4
M. audouinii	2/2	2/2	0/0	0/0
M. ferrugineum	0/1*****	0/1*****	0/0	0/0
N. fulva	2/2	neg.	0/0	0/0
N. gypsea	6/6	neg.	0/0	0/0
N. persicolor	2/2	neg.	0/0	0/0
E. floccosum	4/4	4/4	0/0	0/0
S. brevicaulis	2/2	neg.	0/0	0/0
F. solani	1/1	neg.	0/0	0/0
F. oxysporum	3/3	neg.	0/0	0/0
C. guilliermondii	1/1	neg.	0/0	0/0
C. albicans	1/1	neg.	0/0	0/0
C.parapsilosis	1/1	neg.	0/0	0/0

TABLE 3. Results of EUROArray, DermaGenius and DermaGenius 2.0. The first number in brackets denotes the number of positive

Vor- und Nachteile

Tab. 2 Vergleich der beiden molekularen Methoden Realtime-PCR (Polymerasekettenreaktion) und Microarray zum Pilznachweis in der Dermatomykologie

Realtime-PCR DermaGenius® 2.0	Microarray EUROArray Dermatomycosis
<i>Vorteile</i>	
Schnelle DNA-Isolierung	Hohe Spezifität
PCR-Produkte bleiben verschlossen	Breites Spektrum von Dermatophyten wird erfasst
Die häufigsten Dermatophyten werden erkannt	Universeller Dermatophytennachweis ohne Speziesidentifizierung für seltene Erreger, keine falsch negativen Ergebnisse
	Fertige PCR-Mixe
	Automatisierte schnelle, einfache Auswertung, Spezialkenntnisse zur Interpretation sind nicht notwendig
	Ausdruckbarer Befund
	Automatische Archivierung der Ergebnisse, Anbindung an LIMS-Systeme möglich
<i>Nachteile</i>	
Seltene Dermatophyten werden falsch oder nicht identifiziert	Nach der PCR muss zusätzlich noch eine Hybridisierung erfolgen
Schwierige Auswertung (Schmelzkurvenanalyse), Spezialkenntnisse erforderlich	PCR-Produkte müssen geöffnet werden
<i>DNA</i> Desoxyribonukleinsäure, <i>LIMS</i> Labor-Informations- und Management-System	

Vergleich mit Kultur

Tab. 3 Vergleich molekularer Methoden mit dem kulturellen Pilznachweis

Vorteile PCR zur Kultur

Kultur: 4 bis 6 Wochen – PCR nur Stunden

Kultur: Speziesidentifizierung sehr schwierig und nicht immer eindeutig – PCR eindeutiger

Nachteil PCR zur Kultur

PCR kann nur das erkennen, was im Test enthalten ist, Gefahr von falsch negativen Ergebnissen

Nur bei wenigen Testverfahren Erkennung neuer oder sehr seltener Dermatophyten über einen allgemeinen Nachweis möglich

Fazit

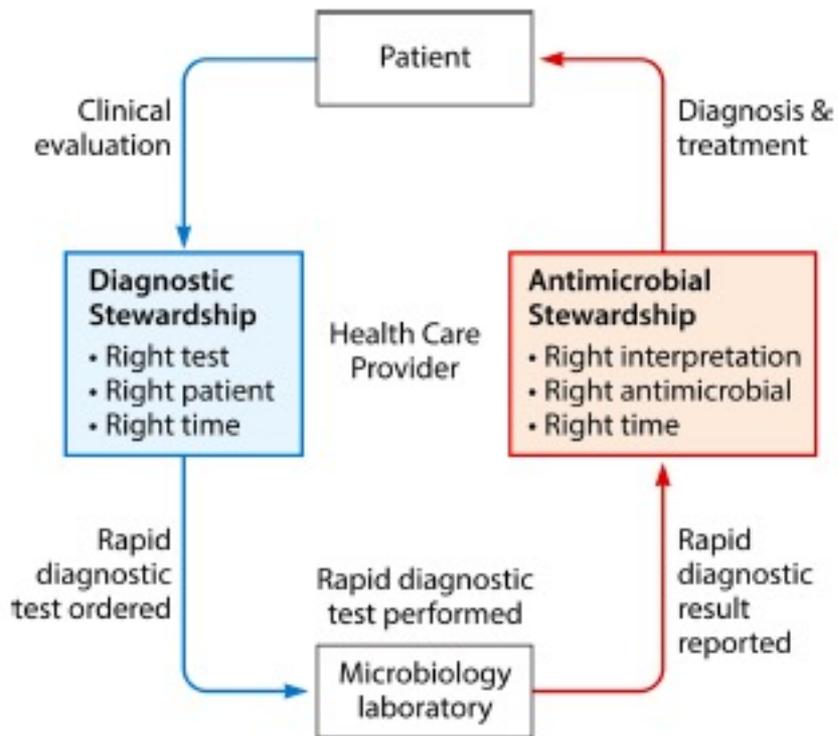
Die PCR kann die Kultur noch nicht ersetzen, um neue oder seltene Erreger speziesspezifisch zu identifizieren

Zur Identifizierung → Kultur und PCR

PCR Polymerasekettenreaktion

Rasche Diagnostik mittels Multiplex-PCR

Bedeutung des Diagnostic Stewardships



1. Multiplex-Panels sind technisch gut ausgereift
2. Panels teilw. mit Pilzen
3. Reine Multiplex-PCRs für Pilzinfektionen
4. Diagnostic Stewardship wichtig zur Abklärung wer, wann und womit getestet werden soll