

ΠΜΣ «ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

Διαγνωστική στην μυκητολογία

Ιωσήφ Μελετιάδης, Ph. D.
Επικ. Καθ. Μικροβιολογίας

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, ΠΓΝ «Αττικόν»
Τηλ. 210-583-1909, Email. jmeletiadis@med.uoa.gr

1

Μυκητιάσεις

Επιπολής λοιμώξεις
Συχνές, αφορούν την κεράτινη στιβάδα του δέρματος, των τριχών και των ονύχων, ασυμπτωματικές, χωρίς φλεγμονή

Υποδόριες λοιμώξεις
Χρόνιες, τοπικές, μετά από τραυματική βλάβη, ενδημικές

Συστηματικές λοιμώξεις
Λοιμώξεις εσωτερικών οργάνων, Παθογόνοι και ευκαιριακοί μύκητες, προδιαθεσικοί παράγοντες

✓ Πρωτοπαθείς-ενδημικές
Αμερική, Αφρική, Ασία, Ανοσοκατασταλμένοι και ανοσοανοί ασθενείς (Ιστοπλάσμωση, Βλαστομυκητίαση, Πενικιλλίωση)

✓ Ευκαιριακές
Κοσμοπολίτικες, Προδιαθεσικοί παράγοντες (AIDS, καρκίνος, μεταμόσχευση), (Καντιντίαση, Ασπεργίλλωση, Ζυγομυκητίαση, κ.α.)

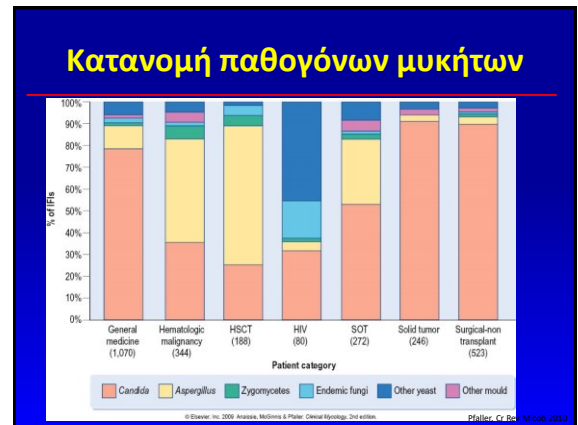
2

Ευκαιριακές μυκητιάσεις

Μύκητας	N εκ./χρόνο	Θνητότητα (%)
Βλαστομύκητες		
<i>Candida</i> spp. <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i>	72.8	10-30%
<i>Cryptococcus</i> spp	65.5	27%
Άλλοι βλαστομύκητες <i>Trichosporon</i> spp, <i>Rhodotorula</i> spp		65-70%
Υαλοειδείς μύκητες		
<i>Aspergillus</i> <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i>	12.4	40-60%
<i>Zygomycetes</i> <i>Rhizopus</i> spp, <i>Mucor</i> spp	1.7	40-80%
Άλλοι υαλοειδείς μύκητες <i>Scedosporium</i> spp, <i>Fusarium</i> spp	1.2	60-90%
Φαιόχρωμοι μύκητες <i>Exophiala</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Bipolaris</i>	1.0	73-84%

Pfaller, C. Rev Microb 2010

3



4

Εργαστηριακή διάγνωση

-Η κλινική εικόνα των μυκητιάσεων ομοιάζει με την εικόνα άλλων παθήσεων σε πολλές περιπτώσεις

-Στόχος του εργαστηρίου είναι ταχεία και επιτυχή ανίχνευση του μύκητα στο κλινικό δείγμα και η πλήρης ταυτοποίηση

1. Συλλογή κλινικού δείγματος
2. Μικροσκοπική αναζήτηση μυκήτων στο κλινικό δείγμα
3. Καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά
4. Ταυτοποίηση μύκητα σε επίπεδο γένους και είδους
5. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμυκητικά φάρμακα

5

Κλινικά δείγματα

Επιπολής/επιφανειακές λοιμώξεις
Δέρμα, τρίχες, νύχια, βλεννογόνοι, κολπικό υγρό

Υποδόριες λοιμώξεις
Υποδόριος ιστός

Συστηματικές λοιμώξεις

Μυκηταίμιες	→ Αίμα
Λοιμώξεις αναπνευστικού	→ ΒΑΛ, Πτύελα
Λοιμώξεις ουροποιητικού	→ Ούρα
Λοιμώξεις ΚΝΣ	→ ΕΝΥ
Εν τω βάθει	→ Ιστός

6

Άμεση μικροσκοπική εξέταση

- Χωρίς χρώση
- Με χρώση
 - Lactophenol blue
 - India ink
 - Gram stain
 - May-Grunwald Giemsa
- Μετά διαλύγαση με ΚΟΗ
 - Κύρια πρακτική για νύχια, τρίχες, δέρμα (διάλυση κερατίνης)
 - Μερικά δείγματα πύου ή εκκρίσεων

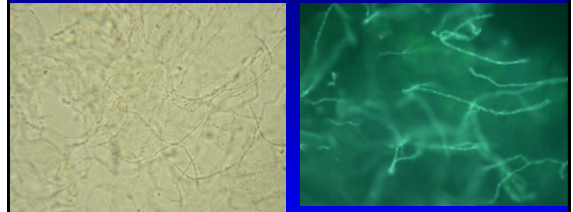


7

Άμεση μικροσκόπηση με ΚΟΗ

Οπτικό μικροσκόπιο

Μικροσκόπιο φθορισμού



8

II. Καλλιέργεια

- Ειδικά υλικά απομόνωσης μυκήτων (Sabouraud)
 - Χλωραμφαινικόλη: μη ανάπτυξη βακτηρίων
 - Ακτιδιόνη: αναστολή ανάπτυξης σαπροφυτικών μυκήτων, επιτρέπει ανάπτυξη παθογόνων (εκτός *C. neoformans*, *Mucor*)
 - Παράγοντες ανάπτυξης (βιταμινούχο υλικό για *T. ochraceum*)
 - Υλικά με αίμα για διμορφους μύκητες (φάση ζυμομύκητα)
- Δύσκολη – αδύνατη για μερικούς μύκητες
 - Histoplasma - Rhinosporidium
- Επώαση
 - Μύκητες επιφαιναικών μυκητιάσεων 26° C
 - Μύκητες εν τω βάθει μυκητιάσεων 37° C
- Διάρκεια
 - Ζυμομύκητες: 24-48 h
 - Υφομύκητες (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*): 2-4 d
 - Υπόλοιποι παθογόνοι μύκητες, δερματοφύτα: 6-15 d

9

II. Καλλιέργεια

✗ Προσοχή στην αξιολόγηση θετικών καλλιιεργειών

- Δείγματα αναπνευστικού
 - Πτύελα – βρογχικές εκκρίσεις
 - Επιμόλυνση από χλωρίδα στόματος
 - Επιμόλυνση από περιβάλλον
 - Απομόνωση *Aspergillus* όχι απόδειξη λοίμωξης (ύπαρξη προδιαθεσικών παραγόντων)
- Καντιντουρία
 - Επιμόλυνση από χλωρίδα γεννητικού συστήματος
 - Ποσοτική καλλιέργεια
 - > 100.000 CFU / ml → λοίμωξη
 - 10.000 – 100.000 CFU / ml → λοίμωξη πιθανή
 - < 10.000 CFU / ml → επιμόλυνση
 - Λοίμωξη νεφρού: (+) υπερβική κ/α, (+) κ/α αίματος, (+) ορολογικές εξετάσεις σε ασθενή με προδιαθ. παράγοντες

10

II. Καλλιέργεια

✗ Προσοχή στην αξιολόγηση θετικών καλλιιεργειών

- Θετική κ/α αίματος
- Θετική κ/α από 3 διαφορετικές περιοχές
- Θετική κ/α άσηπτου υλικού (εκτός ουροδόχου κύστης)

↓
Συστηματική μυκητίαση

11

Θρεπτικά υλικά

Agar Sabouraud
με αντιβιοτικά → αναστολή βακτηρίων

SAB με κυκλοεξιμίδα
αναστολή σαπροφυτικών μυκήτων



SAB με ερυθρό της φαινόλης
ανίχνευση δερματοφύτων



12

Άλλα θρεπτικά υλικά

Άγαρ πατάτας γλυκόζης

-ενισχύει την σπορογονία των μυκήτων

Άγαρ με άλευρο αραβοσίτου και Tween 80

-ενισχύει τον σχηματισμό ψευδοϋφών και χλαμυδοκονιδίων

Άγαρ Δίκον

-υπόστρωμα πλούσιο σε λιποειδή για την απομόνωση λυτοεξαρτώμενων ειδών
Malassezia



13

Προβληματική η συμβατική διάγνωση μυκητιάσεων

- **Μη ειδικά κλινικά συμπτώματα**
- πυρετός (75%), βήχας, δύσπνοια (27%), θωρακικό άλγος (20%)
- **Αδυναμία εφαρμογής επεμβατικών τεχνικών διάγνωσης**
- Βιοψία, βρογχοκυψελδικό υγρό
- **Μη ειδικά απεικονιστικά/ιστοπαθολογικά ευρήματα**
- Η τυπική ύαλος δεν εμφανίζεται πάντα σε μη ουδετεροπενικούς
- Χαμηλή ειδικότητα ιστοπαθολογικής ανάλυσης (υφές?)
- **Χαμηλή ευαισθησία (<30%) καλλιέργειών δειγμάτων αναπνευστικού συστήματος (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις)**
- ψευδώς αρνητικές, αποικισμός ή λοίμωξη, + αργά στη λοίμωξη
- **Οι ανοσοκαλλιεργείς δεν είναι ευαίσθητες και δίνουν αποτελέσματα αργά**
- Σπάνια θετικές (<10% Aspergillus, <60% Candida)
- Aspergillus: 1 ημέρα πριν (1/7) ή κατά την αυτοψία (6/7)

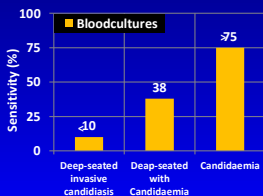
Malasida et al. BMJ 2009; Kontoyannis, BMJ 2004

14

Diagnostic challenges-Cultures

Invasive candidiasis

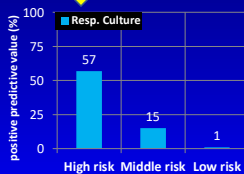
Blood cultures
Overall sensitivity 50%



Clinical ID, Nippon Med J 2013

Invasive mould infections

Scedosporiosis → 75%
Fusariosis → 41%
Aspergillosis → <10%



Perleff et al. CID 2002

15

Δύσκολη η διάγνωση διηθητικών ασπεργιλώσεων

1970

Clinical diagnosis of IA not made in 68% with evidence at autopsy

Young, Medicine 1970; 49: 147-173

1996

68% patients with autopsy proven IA received no treatment

Groll, J. Infect 1996; 33: 23-32

16

Πρώιμη αντιμυκητησιακή θεραπεία



- 17 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και βεβαιωμένη ασπεργιλώση
Έναρξη θεραπείας μέσα σε 3 μέρες → 6/6 πλήρης ή μερική θεραπεία
Έναρξη θεραπείας μετά από 14 μέρες → 11/11 πέθανανε
Aisner et al Ann Intern Med 1977; 86
- 33 ασθενείς με πνευμονική ασπεργιλώση
Έναρξη θεραπείας >10 μέρες → 90% θνησιμότητα
Έναρξη θεραπείας <10 μέρες → 40% θνησιμότητα
von Eiff, Respiration 1995; 62

Χρόνος 0 → Χαρακτηριστική απεικονιστική εικόνα

17

Διαγνωστικό οπλοστάσιο

Συμβατικές μέθοδοι

- Άμεση μικροσκόπηση (KOH/Calcofluor white)
- Ιστοπαθολογική ανάλυση
- Καλλιέργεια

Ορολογικές εξετάσεις

- Τεστ Γαλακτομαννάνης
- Τεστ ανοσοχρωματογραφίας
- Τεστ (1→3) β-D-γλυκάνης
- Ανίχνευση αντισωμάτων σε μη-ανοσοκατεσταλμένους

Μοριακές μέθοδοι

- PCR assays

18

Σημαντική η εκτίμηση κινδύνου για διηθητική ασπεργίλλωση

Ευαισθησία καλλιέργειών δειγμάτων αναπνευστικού

Κατηγορία κινδύνου	Yu et al. AJM 1986	Horvath et al AJM 1996	Perfect et al CID 2001
Υψηλού (αλλογενής ΜΑΚ, ουδετεροπενία, αιματολογικές κακοήθειες)	100% (17/17)	72% (34/47)	57% (117/206)
Μεσαίου (αυτόλογη ΜΑΚ, συμπαγή όργανα, κορτικοστεροειδή, AIDS, διαβήτης)	37% (20/54)	58% (14/24)	15% (228/1510)
Χαμηλού (κυστική ίνωση, ασθένειες συνδετικού ιστού)	0% (0/9)	14% (1/7)	<1% (1/155)

19

EORTC-MSG κριτήρια διηθητικής ασπεργίλλωσης

- Τεκμηριωμένη διηθητική ασπεργίλλωση**
 - Ιστοπαθολογικά ευρήματα βιοψίας + καλλιέργεια
- Πιθανή διηθητική ασπεργίλλωση**
 - 1 ασθενή + 1 μικροβιολογικό +1 μείζον (2 ελάσσονα) κλινικό εύρημα
 - Χαρακτηριστικά ασθενούς:**
 - ουδετεροπενία, πυρετός, ανοσοκαταστολή, στεροειδή, GVHD
 - Κλινική παράμετρος:**
 - Μείζονα=CT: halo, air-crescent, cavity within area of consolidation
 - Ελάσσονα= Συμπτώματα λοίμωξης κατώτερου και ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (θωρακικό άλγος, αιμόπτυση, δύσπνοια, καταρροή)
 - Μικροβιολογική παράμετρος**
- Δυνατή διηθητική ασπεργίλλωση**
 - 1 ασθενή + 1 μικροβιολογικό Η 1 μείζον (2 ελάσσονα) κλινικό εύρημα

¹ Ascioglu S. Clin Infect Dis 2002

20

Αναθεώρηση EORTC-MSG κριτηρίων πιθανής ασπεργίλλωσης

Μικροβιολογική παράμετρος

2008 EORTC/MSG	2020 EORTC/MSGERC
Positive cytology, direct microscopy, or culture in sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate samples OR GM antigen ≥ 0.5 (plasma, serum, bronchoalveolar lavage fluid, or CSF) β -D-glucan (serum)*	Positive direct microscopy or culture in sputum, BAL, bronchial brush or aspirate samples OR GM antigen (at least 1): 1. Single serum or plasma: $GM \geq 1.0$ 2. Single BAL fluid: $GM \geq 1.0$ 3. Single serum or plasma: $GM \geq 0.7$ and BAL fluid ≥ 0.8 4. Single CSF: $GM \geq 1.0$ OR Aspergillus PCR (at least 1): 1. ≥ 2 consecutive plasma, serum, or whole blood PCR + 2. ≥ 2 duplicate BAL fluid PCR(+) 3. ≥ 1 PCR(+) in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR (+) in BAL fluid

Singh et al. J Clin Infect Dis 2021; 71(1):27

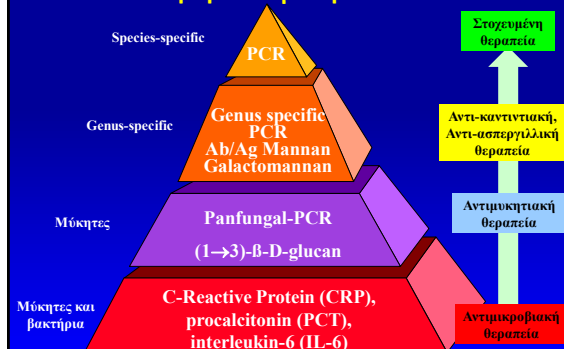
21

Μοριακή διάγνωση μυκητιάσεων

	Candida	Aspergillus	Τεχνική
Αντιγόνα κυτταρικού τοιχώματος	Mannans 1,3- β -D-glucans chitin	Galactomannan 1,3- β -D-glucans chitin	LA ELISA RIA Amebocyte lysate assay Spectrophotometry
Αντιγόνα κυτταροπλάσματος	Enolase HSP-90		ELISA Immunoblot
Μεταβολίτες	arabinitol	D-mannitol Gliotoxin	GLC Mass spectroscopy
DNA	C-14 lanosterol demethylase Chitin synthase Actin Aspartate proteinase Ribosomal RNA genes	C-14-lanosterol demethylase Alkaline protease Mitochondrial DNA HSP-90 Ribosomal RNA genes	PCR

22

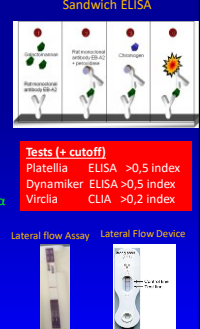
Μη συμβατικές διαγνωστικές τεχνικές διηθητικών μυκητιάσεων



23

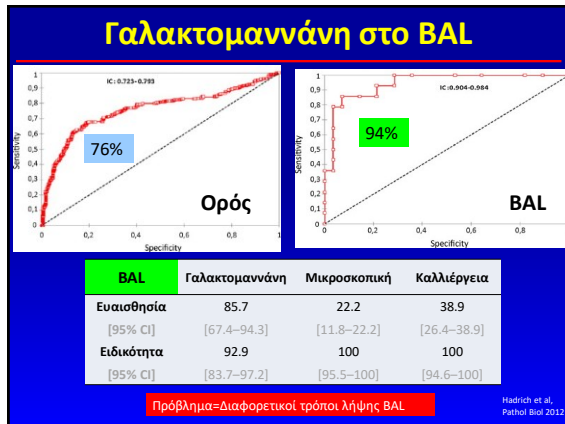
Ανίχνευση Γαλακτομαννάνης

- A screening test που συνοδεύει τις συμβατικές μεθόδους σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για διηθητική ασπεργίλλωση 2 δείγματα/εβδομάδα, BAL, ENV, Θεικό > 0.5 index
- Ευαισθησία
 - Ορός: >70% σε ουδετεροπενικούς, non-A.fum>A.fum
 - <50% σε μη ουδετεροπενικούς και σε ασθενείς υπό αντι-ασπεργίλλωξη προφύλαξη
- BAL: 86%
- Ειδικότητα
 - Ορός: 90%
 - BAL: 93%
- Ψευδώς (+)=15%, Ψευδώς (-)=5%
- Πρώτη διάγνωση διηθητικής ασπεργίλλωσης/πρωτοπαθή αιτία
 - 75%, 12.5 (1-23)d πριν την έναρξη θεραπείας
 - Τιμές ορού > 1 → αποτυχία θεραπείας
 - Θετικό GM+ κατά την θεραπεία → κακή πρόγνωση
- Τεστ ανοσοαποκρίσεων με/χωρίς προεργασία
 - BAL χωρίς προεργασία, ορός με προεργασία
 - Εύκολα και γρήγορα (15-45min)
 - Ευαισθησία και ειδικότητα όπως η ELISA
 - Αυτοματοποίηση στην ανάλυση με αναλυτές



Phaffius C10 2006, 42, Hoofkens Pathol Biol 2012, Smith J Infect Dis 2016, J Clin Micro 2021

24



25

Ανίχνευση Γαλακτομαννάνης με χημειοφωταύγεια VirClia®

- Πλήρως αυτοματοποιημένη δοκιμή
- Έτοιμα προς χρήση αντιδραστήρια
- Ευελιξία για εκτέλεση μόνο 1 ή πολλαπλών δειγμάτων κάθε φορά
- Δείγματα ελέγχου/βαθμονόμησης ενσωματωμένα στο αντιδραστήριο
- Αποτελέσματα σε 1 ώρα
- Τύπος δείγματος: ορός και BAL
- Διάρκεια ζωής αντιδραστηρίων 15 μήνες

➤ Ευαισθησία=81% Ειδικότητα=100%

➤ Ανίχνευση **περισσότερων** αληθώς θετικών δειγμάτων

➤ Ανίχνευση **λιγότερων** ψευδώς θετικών δειγμάτων

Galiero et al Microbiol Spectr. 2022

26



27

Ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (15%)

- Παιδιατρικοί ασθενείς (>83%) → γαλακτομαννάνη στο γάλα, ρυά κ.α.
- Γαλακτομαννάνη στη διατροφή → μεταφορά στο αίμα μέσω κατεστραμμένου εντερικού επιθηλίου
- Αντιβακτηριακή θεραπεία (piperacillin-tazobactam, amoxicillin-clavulanate)
- Κυκλοφωσφαιδόλη → επαγωγέας γαλακτομαννάνης
- Αλληλεπίδραση με εξωναντίονα από *Penicillium* genus (*P. chrysogenum*, *P. digitatum*), *Paeclomyces variotti*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum*, *Histoplasma*
- Νόσος ξενιστή έναντι μοσχέυματος

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (5%)

- Υψηλοί τίτλοι anti-*Aspergillus* αντισωμάτων
- Χαμηλή παραγωγή γαλακτομαννάνης από αναπτυσσόμενους μύκητες
- Περιορισμένη αγγειο-διήθηση
- Προφυλακτική και εμπειρική αντιμυκητιασική θεραπεία
- Εντοπισμός διηθητικής ασπεργίλλωσης π.χ. ψμροτίδα
- Διηθητική ασπεργίλλωση από άλλα είδη όχι *A. fumigatus*, e.g. *A. terreus*
- Χρόνια κοκκιοματώδης νόσος → αρνητικοί τίτλοι αντιγόνου

Kędzińska et al, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26

28

Αξιολόγηση τεστ και διάγνωση λοίμωξης

	Λοίμωξη (+)	Λοίμωξη (-)	
Τεστ (+)	Αληθώς θετικά	Ψευδώς θετικά	Θετική προγνωστική αξία = Αληθώς θετικά/ Τεστ (+)
Τεστ (-)	Ψευδώς αρνητικά	Αληθώς αρνητικά	Αρνητική προγνωστική αξία = Αληθώς αρνητικά/ Τεστ (-)
	Ευαισθησία = Αληθώς θετικά/ Λοίμωξη (+)	Ειδικότητα = Αληθώς αρνητικά/ Λοίμωξη (-)	

Αξιολόγηση τεστ

- Ευαισθησία (υψηλή → λίγα ψευδώς αρνητικά, τεστ διαλογής)
- Ειδικότητα (υψηλή → λίγα ψευδώς θετικά, τεστ επιβεβαίωσης)

Διάγνωση λοίμωξης

- Θετική προγνωστική αξία (υψηλή σε λοιμώξεις με υψηλό επιπολασμό και για τεστ με υψηλή ειδικότητα)
- Αρνητική προγνωστική αξία (υψηλή σε λοιμώξεις με χαμηλό επιπολασμό και για τεστ με υψηλή ευαισθησία)

29

Επιπολασμός και απόδοση διαγνωστικών τεστ

Table 6. Predictive values of the galactomannan assay for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with proven invasive aspergillosis

Prevalence	Cases of proven IA	
	Positive predictive value (95% CI)	Negative predictive value (95% CI)
0.05	0.25 (0.23–0.28)	0.98 (0.97–0.99)
0.10	0.42 (0.39–0.45)	0.96 (0.95–0.97)
0.15	0.53 (0.50–0.56)	0.95 (0.94–0.96)
0.20	0.62 (0.59–0.65)	0.92 (0.91–0.94)

➤ Καλή για αποκλεισμό διηθητικής ασπεργίλλωσης

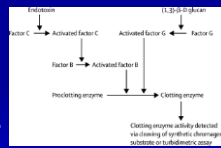
➤ Λιγότερο καλή για επιβεβαίωση διηθητικής ασπεργίλλωσης

Pfeiffer et al, CID 2006; 42

30

Ανίχνευση (1→3) β-D-γλυκάνη

- Πανομυκητιακός δείκτης σε βαρέως πάσχοντες
- Όλοι μύκητες *+P. Jirovecii*
- Όχι για *Mucormycetes* και *Cryptococcus*
- Διάγνωση διηθητικών μυκητιάσεων
- 2 οροί/εβδομάδα (ελάχιστο)
- ELISA και τεστ ταχείας διάγνωσης (<1h)
- Candidiasis:** Sensitivity=81%, Specificity=81%
- Aspergillosis:** Sensitivity=77%, Specificity=83%
- Δεν επηρεάζεται από αντιμυκητιασική θεραπεία
- Υψηλή αρνητική προγνωστική αξία σε διαδοχικά αρνητικά δείγματα
- Πρώιμη διάγνωση, 71% pts 14(4-25)d πριν την έναρξη θεραπείας
- 37 % ψευδώς θετικά, <5% ψευδώς αρνητικά
- Μειώνεται αργά κατά την διάρκεια αποτελεσματικής θεραπείας
- Παραμένει θετικό μετά την υποχώρηση κλινικών συμπτωμάτων



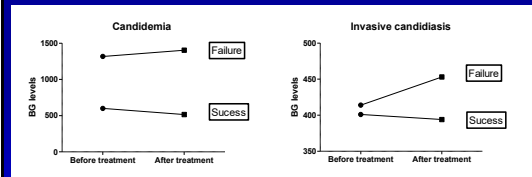
Various tests (+ cutoff)

Fungitell	>80 pg/ml
Fungitell STAT	>12 pg/ml
GlucateLL	> 80 pg/ml
Wako	>11 pg/ml
Fungitec G	>20 pg/ml
Dynamiker	>95 pg/ml

Onishi et al. JCM 2012; Kojouharova et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; Jorgensen S. CID 2012

31

BG and response to treatment



- BG levels **may not** be suitable for monitoring responses to treatment
- A serological cure is usually occurs **several weeks after** the end of treatment
- Decreasing** levels of BG over time (negative slope) → **success** PPV=90%
- Increasing** levels of BG over time (positive slope) → **failure** NPV=90%
- initial BG <416 pg/mL** → success PPV=89%

Jorgensen S. CID 2012

32

1,3-β-D-Glucan assays

*Ανιχνεύει όλους τους μύκητες πλην *Cryptococcus* και *Zygomycetes*

Candida and Aspergillus	No. of studies	% sensitivity (95% CI)	2 (+) consecutive values Spec=99% Sens=48%
Effect of assay type			
Fungitell	15	75 (71–79)	77 (75–79)
Fungitec G test	7	89 (83–93)	90 (88–92)
Wako	5	84 (77–90)	90 (87–92)
Effect of kind of mycosis			
Candidiasis	19	81 (77–85)	81 (80–83)
Aspergillosis*	17	77 (71–82)	83 (82–85)
Effect of antifungal therapy	12	81 (77–85)	84 (82–85)

*Πρώιμη διάγνωση = 71% 14 (4–25) ημέρες

Pneumocystis	No. of studies	% sensitivity (95% CI)	% specificity (95% CI) %
pJP			
All data	12	96 (92–98)	84 (83–86)
Healthy control excluded	12	96 (92–98)	84 (82–86)

Onishi et al. JCM 2012

33

Ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα με Fungitell®

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα (30%)

- Παρουσία ενδοτοξινών στα δείγματα, αιμόλυση
- Ογκολογικά σκευάσματα (lentinan, schizophyllan) περιέχουν (1→3)-β-D-γλυκάνη
- Θεραπεία με ανοσοολογικά σκευάσματα (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες)
- Χρήση μεμβρανών και φίλτρων από κυτταρίνη για αιμοκάθαρση → (1→3)-β-D-γλυκάνη της κυτταρίνης μπορεί να μεταφερθεί στο αίμα
- Χρήση βαμβακερών γαζών, στυλεών κ.α. κατά την εγχείριση
- Αποικισμός
- Βακτηριαμίες, αντιβακτηριακή θεραπεία (cefepime, piper/tazo, meropenem)

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (<5%)

- Παρουσία γλυκανασίων σε κλινικά δείγματα → απουσία (1→3)-β-D-γλυκάνης σε θετικά δείγματα
- Ανοσοσυμπλέγματα
- Λοιμώξεις από *C. parapsilosis*

Kojouharova et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007

34

PCR τεχνικές για την διάγνωση μυκητιάσεων

- Κλινικό δείγμα**
ορός, αίμα, κύτταρα αίματος
- Εκχύλιση DNA**
μηχανική, χημική, ενζυμική
- Περιοχή DNA**
ριβοσωμικό RNA, μιτοχονδριακό,
- Μεθοδολογία**
primers, nested-PCR, post-amplification detection

35

Molecular methods (polymerase chain reaction; PCR)

- DNA detection mainly of *Aspergillus* species (blood, BAL, CSF, tissue), less experience for other species
- High costs, technical difficulties of efficient fungal DNA extraction from complex clinical samples
- In house and commercial tests

Aspergillosis

1 PCR+ serum/ 2 PCR+ serum	Sensitivity=88%/75%, Specificity=75%/87%
2 consecutive PCR+ serum	Sensitivity=58%, Specificity=96%
BAL	Sensitivity=91%, Specificity=92%
Cerebrospinal Fluid	Sensitivity=100%, Specificity=93%

Early diagnosis (4-15d from clinical signs)

Candida infections

Candidemia	Sensitivity=96%, Specificity=92%
Candidiasis	Sensitivity=93%, Specificity=96%

Early diagnosis (1-28d before +bloodcultures)
Difficult to distinguish colonization vs disease

Mucormycosis

Sensitivity	FFPE=93%, Serum=90%
-------------	---------------------

Early diagnosis (3-60 days)

Morgan et al. J Clin Microbiol 2008; Onishi et al. JCM 2012; Kojouharova et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; Jorgensen S. CID 2012

36

Εμπορικά PCR kit

Assay	Sample type	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Microgen MycAssay Aspergillus	BAL ^a	80-100	88-99
	Serum/Plasma ^b	25-60	83-100
Pathonostics Aspergenius	BAL ^c	42-84	80-91
	Serum/Plasma ^d	79-80	78-91
Ademtech Mycogenie	BAL ^e	54-93	90
	Serum/Plasma ^f	100	85
Bruker Fungiplex Aspergillus	Serum/Plasma ^g	95	90
OLM AspID	BAL ^h	94	77

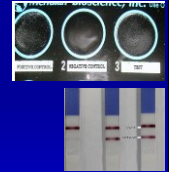
37

Διάγνωση κρυπτοκόκκωσης

➤ Ανίχνευση αντιγόνου σε ορό, ENY και BAL

➤ Ευαισθησία 93-100% (ENY), 83-97% (ορό), ειδικότητα 93-100%

	Ασθενείς χωρίς AIDS	Ασθενείς με AIDS
Αντιγόνο	86-95%	100%
Συνική μελάνη	50%	82%
Καλλιέργεια	90%	100%



➤ Latex agglutination, Enzyme Immunoassay

➤ Τίτλοι 1/4 → ισχυρή υποψία, >1/8 → ενεργή λοίμωξη, <1/2048 → καλή πρόγνωση
όχι στην παρακολούθηση θεραπείας, + μετά από 6 μήνες

➤ Ψευδώς αρνητικά

Φαινόμενο προζώνης, ανοσοσυμπλέγματα, μικρή παραγωγή αντιγόνου

➤ Ψευδώς θετικά

Ρευματοειδής παράγων, επιμόλυνση από περιβάλλον, *Trichosporon beigelii*, *Cryptocoryphaga canimorsus*, *Cr. albidus*

38

Detection of *Candida* mannan and anti-mannan

➤ Detection of antigen/antibody (serum, CSF, BAL)

➤ Positive Ab >10 AU/ml, Ag >0.5 ng/ml

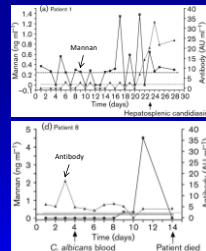
➤ Combined testing: Sensitivity 83%, Specificity 86%

➤ Early detection of candidemia (1-10d before bloodcultures)

➤ ICU and hematological patients

➤ Limitations

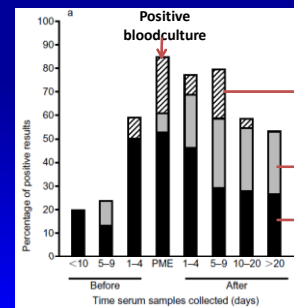
- Absence of Ab production due to immunosuppression
- Colonization vs. infection
- Presence of neutralizing Ab
- Fast clearance of mannan from blood
- Low sensitivity of *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*



Sensid, J Med Microbiol 2002; 51

39

Combined detection of mannan and anti-mannan in 203 candidemic patients



Ab(+) and Ag (+)

Ab (+)

Ag (+)

Sensid, J Med Microbiol 2002; 51

40

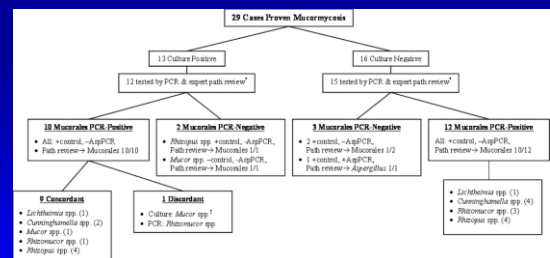
Ειδο-εξαρτώμενη ευαισθησία ανίχνευσης μαννάνης και αντιμαννάνης για διάγνωση καντινιτιάσεων

Species	Study	Number of isolates	Sensitivity		
			Mn	A-Mn	Mn/A-Mn
<i>C. albicans</i>	Fujita et al., 2006 [28]	49	79%		
	Sensid et al., 2002 [17]	21	62%	67%	100%
<i>C. tropicalis</i>	Sensid et al., 2002 [17]	10	70%	60%	80%
	Fujita et al., 2006 [28]	9	67%		
<i>C. glabrata</i>	Sensid et al., 2002 [17]	7	100%	71%	100%
	Sensid et al., 2002 [17]	12	58%	83%	83%
<i>C. guilliermondii</i>	Fujita et al., 2006 [28]	11	36%		
<i>C. parapsilosis</i>	Fujita et al., 2006 [28]	11	27%		
	Fujita et al., 2006 [28]	20	15%		
	Sensid et al., 2002 [17]	10	30%	10%	40%
<i>C. lusitana</i>	Sensid et al., 2002 [17]	8	25%	38%	50%
	Fujita et al., 2006 [28]	2	0		

Mouton et al. Critical Care 2010

41

Διάγνωση ζυγομυκητιάσεων από ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα



Hammond et al JCM 2011

42

Serum biomarkers for rare invasive fungal infections

	Diagnostic approaches		
	Blood cultures	Antigen detection/ cross reaction ^a	PCR Assay
Yeasts			
<i>Geotrichum</i>	+	± ^{1,2}	
<i>Malassezia</i>	+		+
<i>Rhodotorula</i>	+	± ²	+
<i>Saccharomyces</i>	+	± ³	+
<i>Trichosporon</i>	+	± ^{1,2,3}	+
<i>Pseudozyma</i>	+		
<i>Sporobolomyces</i>	+		
Hyaline filamentous fungi			
<i>Fusarium</i>	+	± ^{1,2}	+
<i>Scedosporium</i>	+	± ²	+
<i>Paeclomyces</i>		± ^{1,2}	
<i>Acromonium</i>		± ²	
<i>Scopulariopsis</i>			+
<i>Trichoderma</i>			
<i>Dematiaceae</i>		± ^{1,2}	
<i>Zygomycetes</i>			+

^a *Aspergillus* galactomannan (1), 1,3-b-D-glucan (2), *Cryptococcus* antigen (3) to

Meletiadis Cur Fung Inf Rep 2013

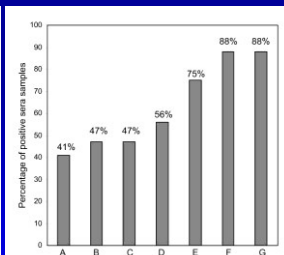
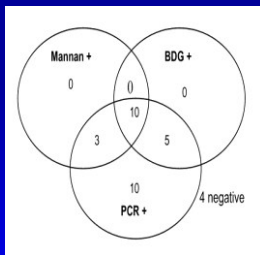
Συνδυασμός διαφορετικών τεστ

Analysis method		No. of reports	Pooled SEN (95% CI)	Pooled SPE (95% CI)	
The GM + BG assay					
Proven, probable IA vs possible or no IA		7	0.55 (0.44-0.61)	0.98 (0.95-0.99)	
Lu et al, Internal Medicine 2011					
Assay combination					
		GM	PCR	PCR or GM	PCR and GM
Sensitivity	Single	77.27 (56.6–89.9)	95.45 (78.2–99.2)	95.5 (78.2–99.2)	77.3 (56.6–89.9)
	Multiple	68.18 (47.3–83.6)	68.18 (47.3–83.6)	90.9 (72.2–97.5)	45.5 (26–65.3)
Specificity	Single	81.36 (69.6–89.3)	72.88 (60.4–82.6)	54.2 (41.7–66.3)	100 (93.9–100)
	Multiple	91.53 (81.7–96.3)	96.61 (88.5–99.1)	88.1 (77.5–94.1)	100 (93.9–100)
Meta-analysis (13 studies, 1670 pts)					White JCM 2013
GM&PCR weekly screening	Απουσία οποιαδήποτε θετικού τεστ			→	NPV=100%
	Τουλάχιστον 2 θετικά τεστ			→	PPV=88%
Arvanitis CID 2015					

43

44

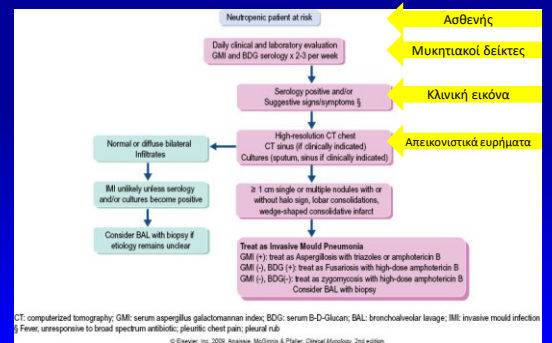
Συγκριτική μελέτη PCR, BG, MN, anti-MN σε 32 ασθενείς με καντινέμια



Alan MBC 2006

45

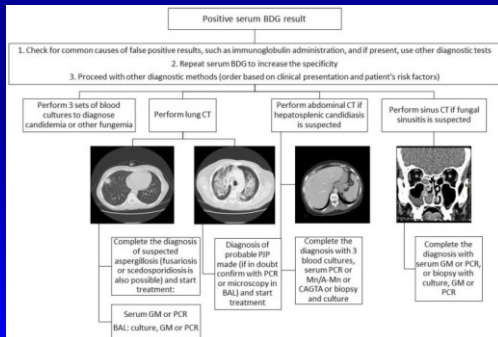
.....Διαγνωστικοί αλγόριθμοι



CT: computerized tomography; GM: serum aspergillus galactomannan index; BDG: serum B-D-Glucan; BAL: bronchoalveolar lavage; MI: invasive mould infection; Fever, unresponsive to broad spectrum antibiotic; pleuritic chest pain; pleural rub

46

Screening patients with BG test



47

Νέα διαγνωστικά τεστ

T2 nuclear magnetic resonance
C. albicans and/or C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, and/or C. glabrata
LOD 1-3 CFU/ml, 3–5h, avoid detection of DNAemia, Sens=100%, Spec=97.8%

bis(methylthio)leptotxin (bmGT)
↑ Sensitivity/PPV and similar Specificity/NPV with GM
Combination GM+bmGT → PPV=100%, NPV=97.5 % Vidal-Garcia App Microb Bios 2016

eNose
Detection of volatile organic compounds
Sensitivity=100%; Specificity=83.3% de Heer et al JCM 2013

SeptiFast (Roche) → multiplex PCR
C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis
Sensitivity=65%, Specificity=88%

Idiica (Abbott) → PCR+electrospray ionization mass spectrometry
200+ species, Sensitivity =81%, Specificity =84%

Filmarray (BioMérieux) → multiplex PCR
C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis

Stevenson Health chool Assess. 2016, Sylve et al Med Mycol 2001

48

