



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΗΣ 1932



Μη καλλιεργητικές τεχνικές διάγνωσης ΔΜ

Γεωργία Βρυώνη



Υπό την Αιγίδα
της Ελληνικής
Εταιρείας Ιατρικής
Μικρολογίας



Υπό την Αιγίδα
της Ιατρικής Σχολής
του Πανεπιστημίου
Αθηνών

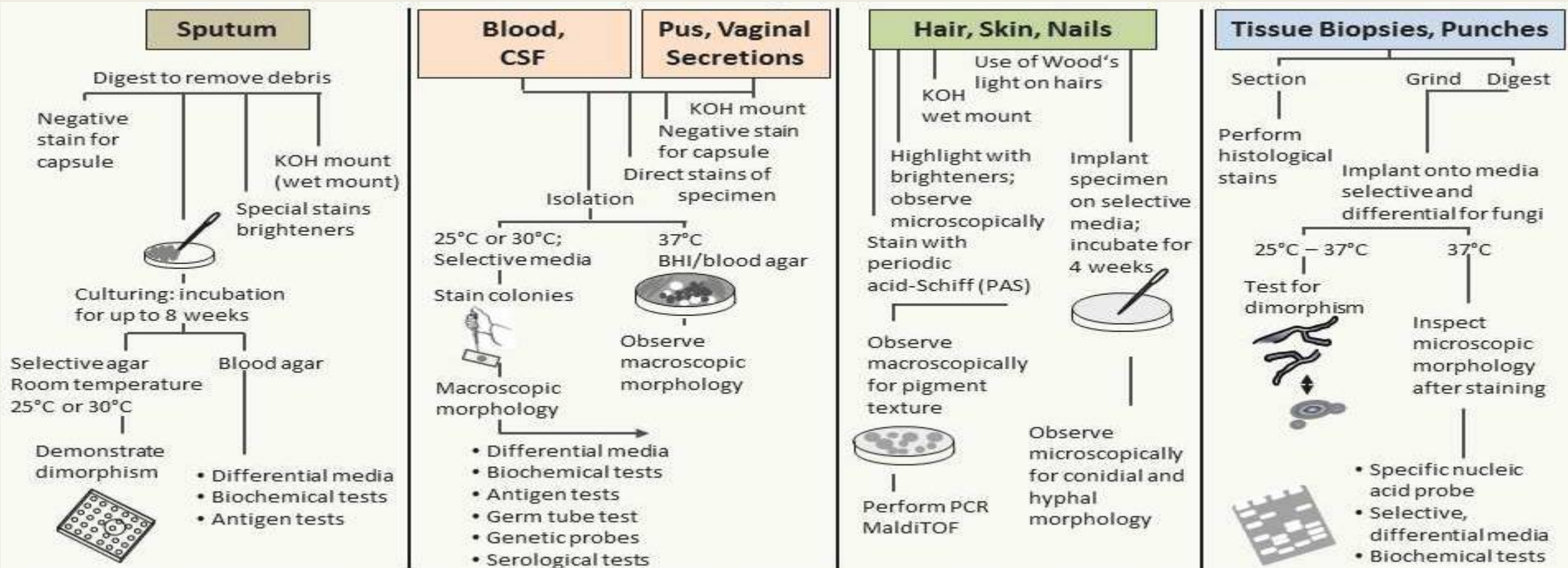
28-29 Μαΐου 2022

Εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ιατρικώς σημαντικοί μύκητες με βάση την μορφολογία



Εργαστηριακή διάγνωση μυκητιάσεων



Προσαρμογή από: www.mhhe.com/biosci/cellmicro/talaro/index.mhtml

Άμεση μικροσκοπική εξέταση

ΚΟΗ 10-20%

- Είναι ταχεία διαγνωστική μέθοδος για την αναζήτηση των μορφολογικών στοιχείων του μύκητα.
- Αναγνωρίζονται:
 - **οι υφές** με εγκάρσια διαφράγματα,
 - η διάταξη και το μέγεθος των **σπορίων** (π.χ. των δερματοφύτων όταν προσβάλλουν την τρίχα)
- **Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από :**
 - το είδος του δείγματος
 - τον αριθμό των μυκήτων στο παρασκεύασμα
 - την εμπειρία του μικροσκοπιστή
- **Οπτικά σφάλματα**



Diagnosis by Microscopy

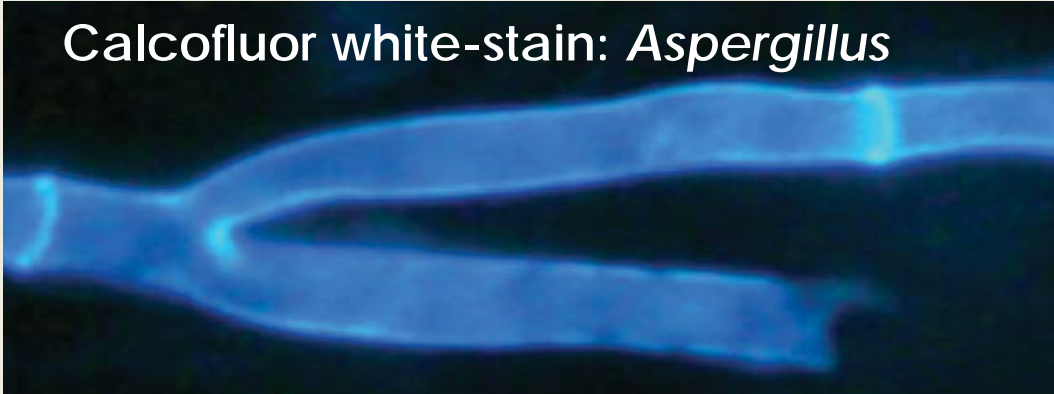
- Microscopy still has a role in the diagnosis of molds
- Online resources are available with microscopy training, and images of fungi in tissue

The screenshot displays the microfungi.net website. At the top, there are logos for Fungal Infection Trust, LIFE (Leading International Fungal Education), and Manchester 1824. The navigation bar includes links for Modules, Staining techniques, Glossary, Resources, Contributors, and Languages. A dropdown menu for 'Modules' is open, listing Module 1 through Module 4. A second dropdown menu for 'Languages' is also open, listing English, Español, Français, and Português. The main content area features a microscopy image of tissue with black arrows pointing to structures labeled A and C. To the right of the image, there is a section titled 'Objectives:' with a list of learning goals. At the bottom of the page, the text 'Module 1 An Introduction To Basic Microscopy' is visible.

Πάντα άμεση μικροσκοπική εξέταση

Schelenz S. et al. Lancet Infect Dis 2015; 15: 461–74

Calcofluor white-stain: *Aspergillus*



Fluorescence microscopy (x100) showing Calcofluor white staining of centrifuged BAL from a patient with AML presenting with febrile neutropenia and cough.

Bright fluorescent dichotomous branching septate hyphae can be seen, which were later confirmed by culture to be *Aspergillus fumigatus*.

Gram-stain: *Mucor*



Panel 1: Microbiology best practice recommendations

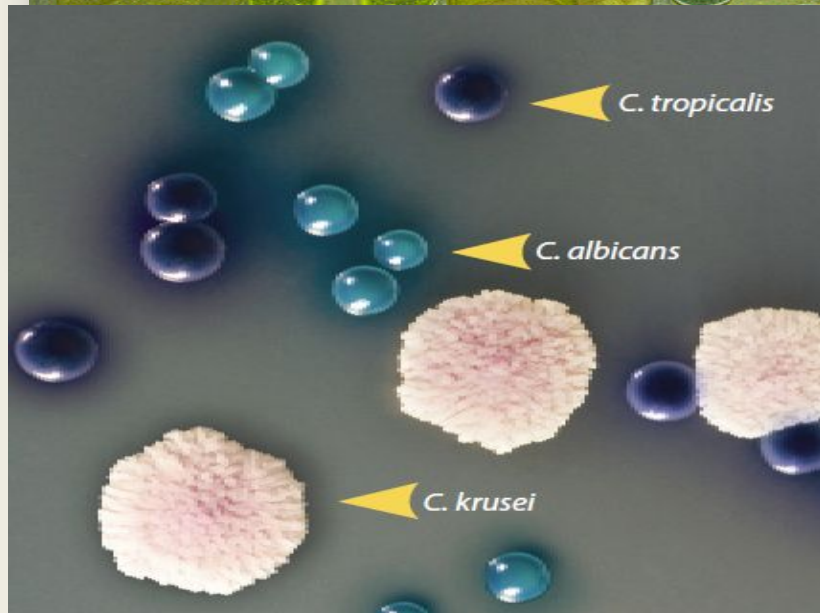
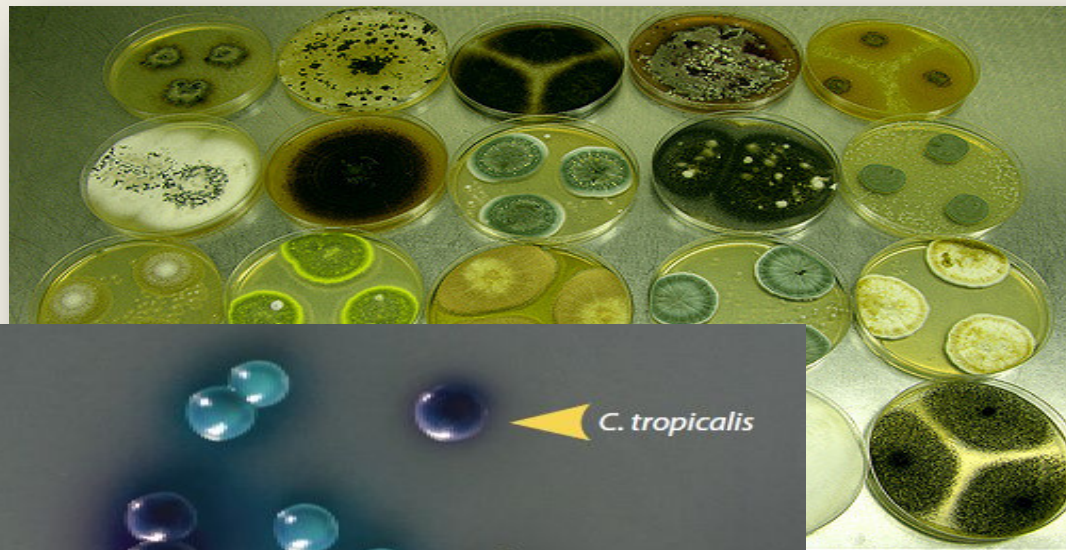
Microscopy and stains

- Fluids from usually sterile sites and bronchoalveolar lavage (BAL) from patients with suspected infection should be examined by direct microscopy with suitable methods for fungal detection*
- Adequate tissue for histology and culture should be ensured before direct microscopy is done on the rest of the sample
- Optical brighteners are recommended for microscopy on all samples from immunocompromised patients
- Direct fluorescent-antibody staining, PCR, or both is recommended for patients with suspected pneumocystis infection
- India ink staining of cerebrospinal fluid samples from immunocompromised patients is recommended in addition to Gram staining if cryptococcus capsule antigen (CRAG) testing is not available on site



Πάντα καλλιέργεια

- Ταυτοποίηση
- Έλεγχο ευαισθησίας

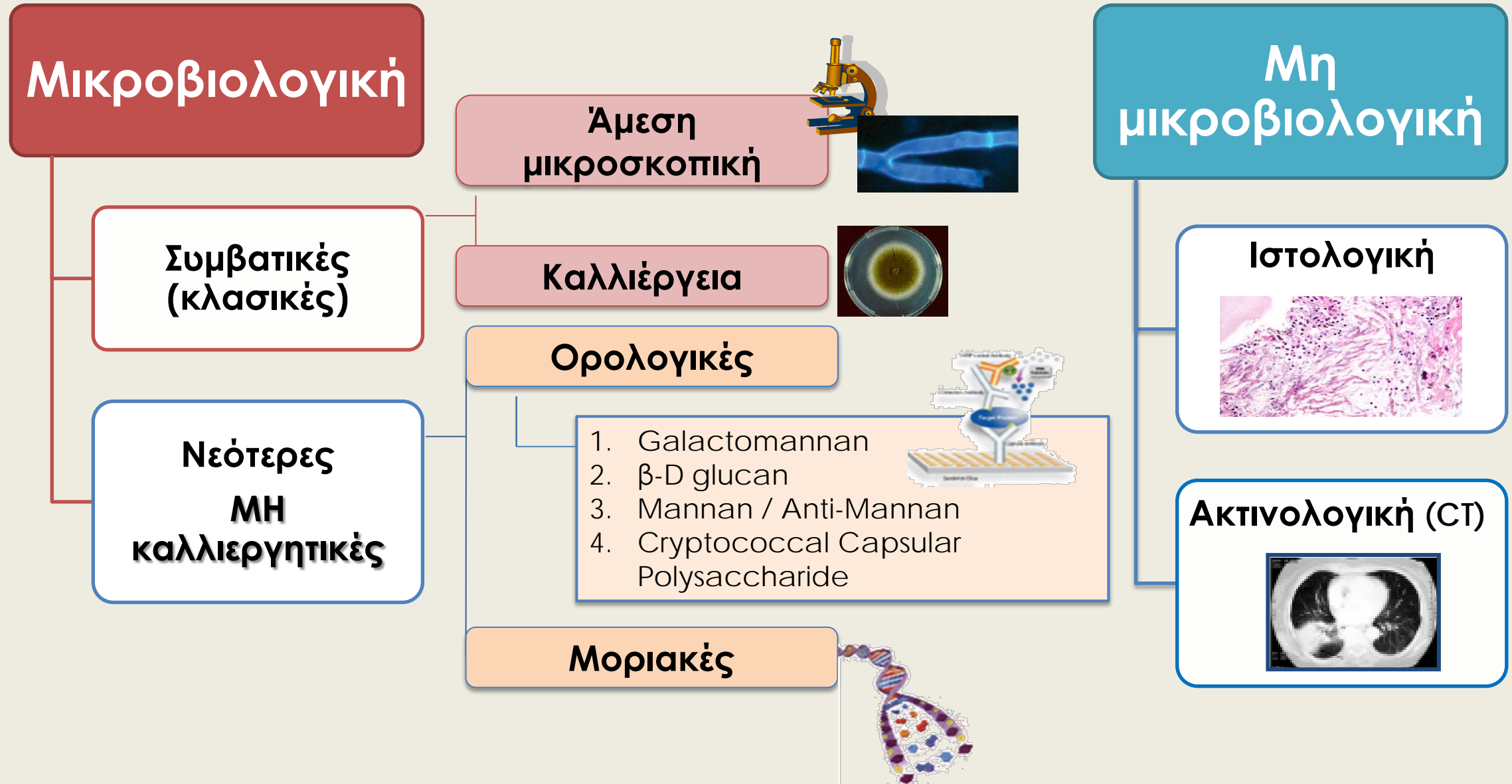


Schelenz S. et al. Lancet Infect Dis 2015; 15: 461–74

Culture and identification

- Bronchoscopy fluids should be cultured in suitable media to support fungal growth*
- Yeasts cultured from urine samples should be identified to species level and reported for all critical care and immunocompromised patients*
- All clinical isolates of aspergillus from patients who will receive antifungal treatment should be identified to species complex level, by referral to a specialist laboratory if necessary*
- All fungi (yeasts and moulds) obtained from sterile sites, including blood and continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids, and intravenous line tips should be identified to species complex level by referral to a specialist laboratory if necessary. Bronchoscopy fluid and paranasal sinus material is regarded as sterile in this context for all fungi except *Candida* spp*
- All aspergillus isolates from patients who have allergic bronchopulmonary aspergillosis, aspergilloma, or acute or chronic aspergillosis should be susceptibility tested for antifungals used for treatment (eg, voriconazole or itraconazole) if therapy is initiated; isolates should be stored for 6 months in case additional susceptibility testing is needed at a later date
- Any amount of fungi cultured from vascular-device tips should be identified to species level and reported

Διεισδυτικές Μυκητιάσεις: ποιες μεθοδολογίες έχουμε στη διάθεσή μας ;



Διεισδυτικές μυκητιάσεις: κριτήρια διάγνωσης

MAJOR ARTICLE

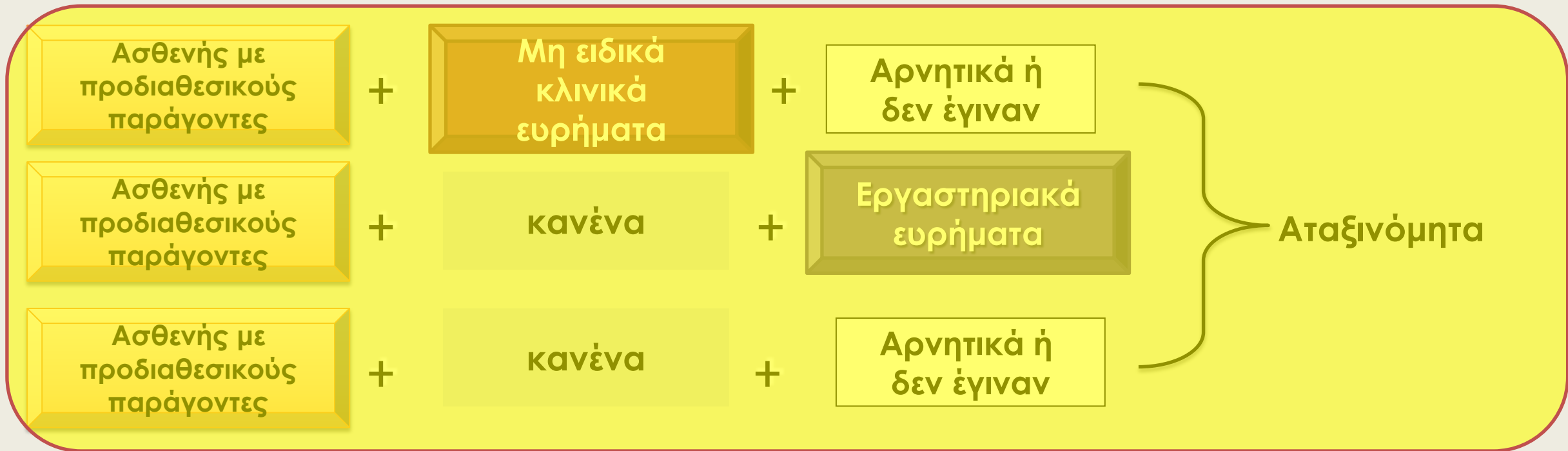
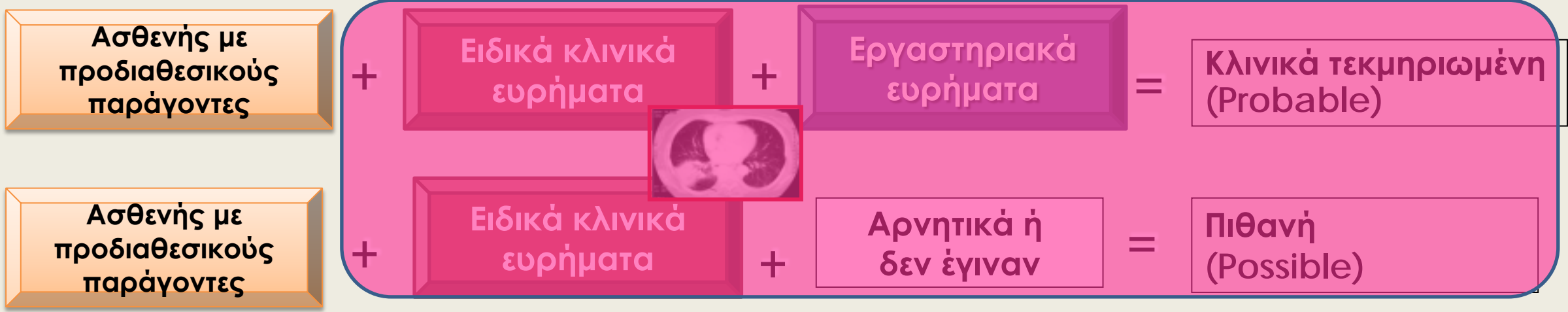
Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group

Ben De Pauw,^a Thomas J. Walsh,^a J. Peter Donnelly,^a David A. Stevens, John E. Edwards, Thierry Calandra, Peter G. Pappas, Johan Maertens, Olivier Lortholary, Carol A. Kauffman, David W. Denning, Thomas F. Patterson, Georg Maschmeyer, Jacques Bille, William E. Dismukes, Raoul Herbrecht, William W. Hope, Christopher C. Kibbler, Bart Jan Kullberg, Kieren A. Marr, Patricia Muñoz, Frank C. Odds, John R. Perfect, Angela Restrepo, Markus Ruhnke, Brahm H. Segal, Jack D. Sobel, Tania C. Sorrell, Claudio Viscoli, John R. Wingard, Theoklis Zaoutis, and John E. Bennett^b

ΔΜ (IFD)

- Εργαστηριακά τεκμηριωμένη (**Proven**)
- Κλινικά τεκμηριωμένη (**Probable**)
- Πιθανή (**Possible**)

Μικροσκοπική + **Ιστολογική** + **Καλλιέργεια** = **Εργαστηριακά τεκμηριωμένη (Proven)**



Επικαιροποιημένες οδηγίες για τις ΔΜ

- J. Peter Donnelly et al. CID, 2019

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

1. the definitions were unsuitable for patients with IFD in the ICUs or in pediatrics,
2. data were insufficient to establish appropriate thresholds for detecting ***Aspergillus GM***
3. there was uncertainty about the role of (1,3)-beta-D glucan (BDG).
4. nucleic acid amplification including PCR-based tests were excluded because of lack of standardization and validation.
5. definitions for cryptococcosis and endemic mycoses also needed clarification
6. there were no definitions for pneumocystosis.

Table 1. Criteria for Proven Invasive Fungal Disease

Fungus	Microscopic Analysis: Sterile Material	Culture: Sterile Material	Blood	Serology	Tissue Nucleic Acid Diagnosis
Molds ^a	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination ^b of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy in which hyphae or melanized yeast-like forms are seen accompanied by evidence of associated tissue damage	Recovery of a hyaline or pigmented mold by culture of a specimen obtained by a sterile procedure from a normally sterile and clinically or radiologically abnormal site consistent with an infectious disease process, excluding BAL fluid, a paranasal or mastoid sinus cavity specimen, and urine	Blood culture that yields a mold ^c (eg, <i>Fusarium</i> species) in the context of a compatible infectious disease process	Not applicable	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when molds are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue
Yeasts ^a	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination ^b of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy from a normally sterile site (other than mucous membranes) showing yeast cells, for example, <i>Cryptococcus</i> species indicating encapsulated budding yeasts or <i>Candida</i> species showing pseudohyphae or true hyphae ^d	Recovery of a yeast by culture of a sample obtained by a sterile procedure (including a freshly placed [<24 hours ago] drain) from a normally sterile site showing a clinical or radiological abnormality consistent with an infectious disease process	Blood culture that yields yeast (eg, <i>Cryptococcus</i> or <i>Candida</i> species) or yeast-like fungi (eg, <i>Trichosporon</i> species)	Cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid or blood confirms cryptococcosis	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when yeasts are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue
Pneumocystis	Detection of the organism microscopically in tissue, BAL fluid, expectorated sputum using conventional or immunofluorescence staining	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Endemic mycoses	Histopathology or direct microscopy of specimens obtained from an affected site showing the distinctive form of the fungus	Recovery by culture of the fungus from specimens from an affected site	Blood culture that yields the fungus	Not applicable	Not applicable

Table 2. Probable Invasive Pulmonary Mold Diseases

• Host factors

• Clinical features

• Mycological evidence

- Any mold, for example, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate
- Microscopical detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchi aspirate indicating a mold
- GM (Aspergillosis only)
- *Aspergillus* PCR



Ασθενή με προδιαθεσικούς παράγοντες

Antigen detected in plasma, serum, BAL, or CSF
Any 1 of the following:
Single serum or plasma: ≥ 1.0
BAL fluid: ≥ 1.0
Single serum or plasma: ≥ 0.7 and BAL fluid ≥ 0.8
CSF: ≥ 1.0

- Neutropenia ($< 0.5 \times 10^9$ neutrophils/L [< 500 neutrophils/mm³] for > 10 days)
- Hematologic malignancy
- Receipt of an allogeneic stem cell transplant
- Receipt of a solid organ transplant
- Prolonged use of corticosteroids

Table 2. Probable Invasive Pulmonary Mold Diseases

• Host factors

• Clinical features

• Mycological evidence

- Any mold, for example, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate
- Microscopical detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchi aspirate indicating a mold
- GM (Aspergillosis only)
- *Aspergillus* PCR

Ασθενή με προδιαθεσικούς παράγοντες

- Neutropenia ($<0.5 \times 10^9$ neutrophils/L [<500 neutrophils/mm³] for >10 days)
- Hematologic malignancy
- Receipt of an allogeneic stem cell transplant
- Receipt of a solid organ transplant
- Prolonged use of corticosteroids

Any 1 of the following:

Plasma, serum, or whole blood 2 or more consecutive PCR tests positive

BAL fluid 2 or more duplicate PCR tests positive

At least 1 PCR test positive in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR test positive in BAL fluid

Table 3. Other Probable Invasive Diseases

J. Peter Donnelly et al. CID, 2019

- Host factors
- Clinical features
- Mycological evidence

Candidiasis



β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (pg/mL) detected in at least 2 consecutive serum samples provided that other etiologies have been excluded
Positive T2Candida^a

Cryptococcosis



Recovery of *Cryptococcus* from a specimen obtained from any nonsterile site

Pneumocystosis

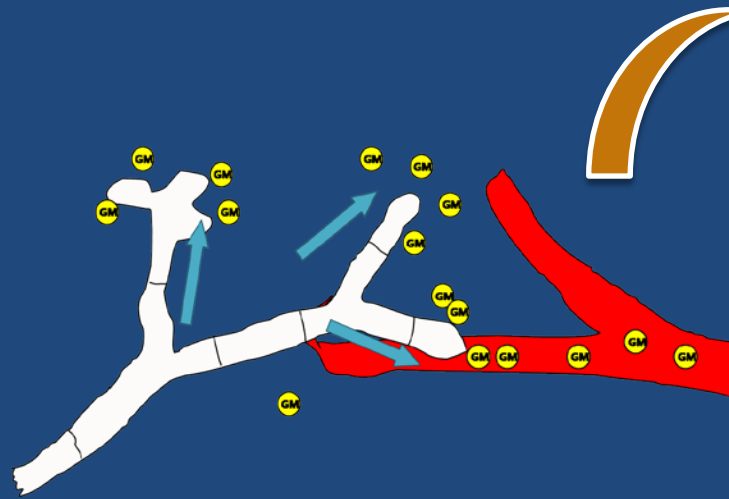


β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (pg/mL) detection in ≥ 2 consecutive serum samples provided other etiologies have been excluded
Detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA by quantitative real-time polymerase chain reaction in a respiratory tract specimen

Endemic mycosis



Histoplasma or *Blastomyces* antigen in urine, serum, or body fluid
Antibody to *Coccidioides* in cerebrospinal fluid or 2-fold rise in 2 consecutive serum samples




Γαλακτομαννάνη – galactomannan GM

Μυκητολογικό κριτήριο διεισδυτικής ασπεργίλλωσης

Γαλακτομαννάνη GM



Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Galactomannan (GM) 	Πρώιμη ανίχνευση IA (1) 2 δείγματα ορού/εβδ (1) Ένα από τα παρακάτω: <ul style="list-style-type: none">• ορό ή πλάσμα: ≥ 1.0• BAL fluid: ≥ 1.0• ορό ή πλάσμα: ≥ 0.7 και BAL fluid ≥ 0.8 (7)• CSF: ≥ 1.0	Screening test σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους σε ασθενείς υψηλού κινδύνου IA (1) Σε ουδετεροπενικούς ενήλικες Σε ουδετεροπενικά παιδιά Τιμές >1 ένδειξη θεραπευτικής αποτυχίας σε ενήλικες & παιδιά (2) Μέτρηση στο BAL (cut-off $> 0.5 - 1.0$) και ENY (cut-off > 0.5): χρήσιμα σε ουδετεροπενικούς και μη ασθενείς (2)	Σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς: όχι η ίδια διαγνωστική και προγνωστική αξία (4,5) Δεν συνιστάται για screening αν SOT και σε ασθενείς με CGD (6) Θεραπεία με αντιμυκητικά έναντι υφομυκήτων (<u>mold-active e.g. posa- and vorico-nazole</u>) επηρεάζει την ανίχνευση GM (1) Εμμένουσα GM αντιγοναιμία: κακός προγνωστικός δείκτης και χρειάζεται επανεκτίμηση του περιστατικού (3,5)

Μυκητολογικό κριτήριο

2. Cuenca-Estrella M, et al. J Antimicrob Chemother 2011;66(Suppl 1):i15–24
3. Koo S, et al. J Clin Microbiol 2010;48:1255–60

4. Lackner M, Lass-Flörl C. Curr Pharm Des 2013;19:3595–614
5. Marchetti O, et al. Bone Marrow Transplant 2012;47:846–54
6. Patterson T et al. CID 2016;63(4):e1-e60
7. Donnelly P et al. CID 2019

Ανίχνευση **GM** με μέθοδο sandwich ELISA - Ειδικότητα

ΘΕΤΙΚΗ

- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- *Acremonium*
- *Histoplasma capsulatum*
- *Alternaria*
- *Penicillium*
- *Paecilomyces*
- *Exophiala dermatitidis*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Emmonsia spp.*

Συνήθως αρνητική

- *Mucorales*

Αρνητική

- *Candida, Cryptococcus, Pneumocystis*

GM: καλύτερη ευαισθησία στο BAL

Table 1 Performance characteristics of molecular and serologic tests for invasive Aspergillosis

Test	Specimen	Sensitivity, %	Specificity, %	Challenges
Galactomannan	Serum	79*	81–86*	Decreased performance in patients receiving antifungal agents. Optimal cut-off unclear.
Galactomannan	BAL	90*	94*	Optimal cut-off unclear. Performance in high-risk patients challenged by recent study

Arvanitis M & Mylonakis E. Eur J Clin Invest 2015; 45: 646–652

Galactomannan testing in samples other than blood

Strength of recommendation A, B, C, D (against use) Quality of evidence: level I, II, III

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Any	To diagnose pulmonary IA	To apply GM test on BAL fluid	A	II	GM in BAL is a good tool to diagnose, optimal cut-off to positivity 0.5 to 1.0
Any	To diagnose cerebral IA	To apply GM test on cerebrospinal fluid	B	II	No validated cut-off
Any	To detect GM in tissue	To apply GM test on lung biopsies	B	II	Using a cut-off 0.5 resulted in a sensitivity of 90 % and a specificity of 95%; specimens need to be sliced, precondition for doing so is that sufficient material is available; dilution in isotonic saline

A.J. Ullmann et al. / Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) e1–e38

Λήψη Piperacillin/Tazobactam (Tazocin): αποτελεί πρόβλημα στην ανίχνευση GM ;

J Antimicrob Chemother 2012; **67**: 1746–1748
doi:10.1093/jac/dks111 Advance Access publication 11 April 2012

**Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy**

Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay

M. Mikulska^{1*}, E. Furfaro¹, V. Del Bono¹, A. M. Raiola², S. Ratto¹, A. Bacigalupo² and C. Viscoli¹

¹*Division of Infectious Diseases, San Martino University Hospital and University of Genoa, Genoa, Italy;* ²*Division of Haematology and HSCT Unit, San Martino University Hospital, Genoa, Italy*

*Corresponding author. Tel: +39-010-555-4654; Fax: +39-010-555-6700; E-mail: m.mikulska@unige.it

Received 1 December 2011; returned 9 January 2012; revised 5 March 2012; accepted 7 March 2012

Objectives: Galactomannan (GM) testing is extremely useful for diagnosing invasive aspergillosis in high-risk patients, but false-positive results have been reported in patients treated with piperacillin/tazobactam. The aims of this study are to test if the recent piperacillin/tazobactam (Tazocin™; Pfizer) preparation still contains GM, and if serum GM positivity in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients receiving piperacillin/

Although some residual GM might still be present in piperacillin/tazobactam, currently available brand piperacillin/tazobactam preparations seem no longer responsible for false-positive GM results.

However, with the arrival of generic compounds of piperacillin/tazobactam, clinicians fear the re-emergence of the problem of false-positive GM results in patients treated empirically with generic piperacillin/tazobactam.

GM: εφαρμογή και επαναληψιμότητα

RESEARCH ARTICLE

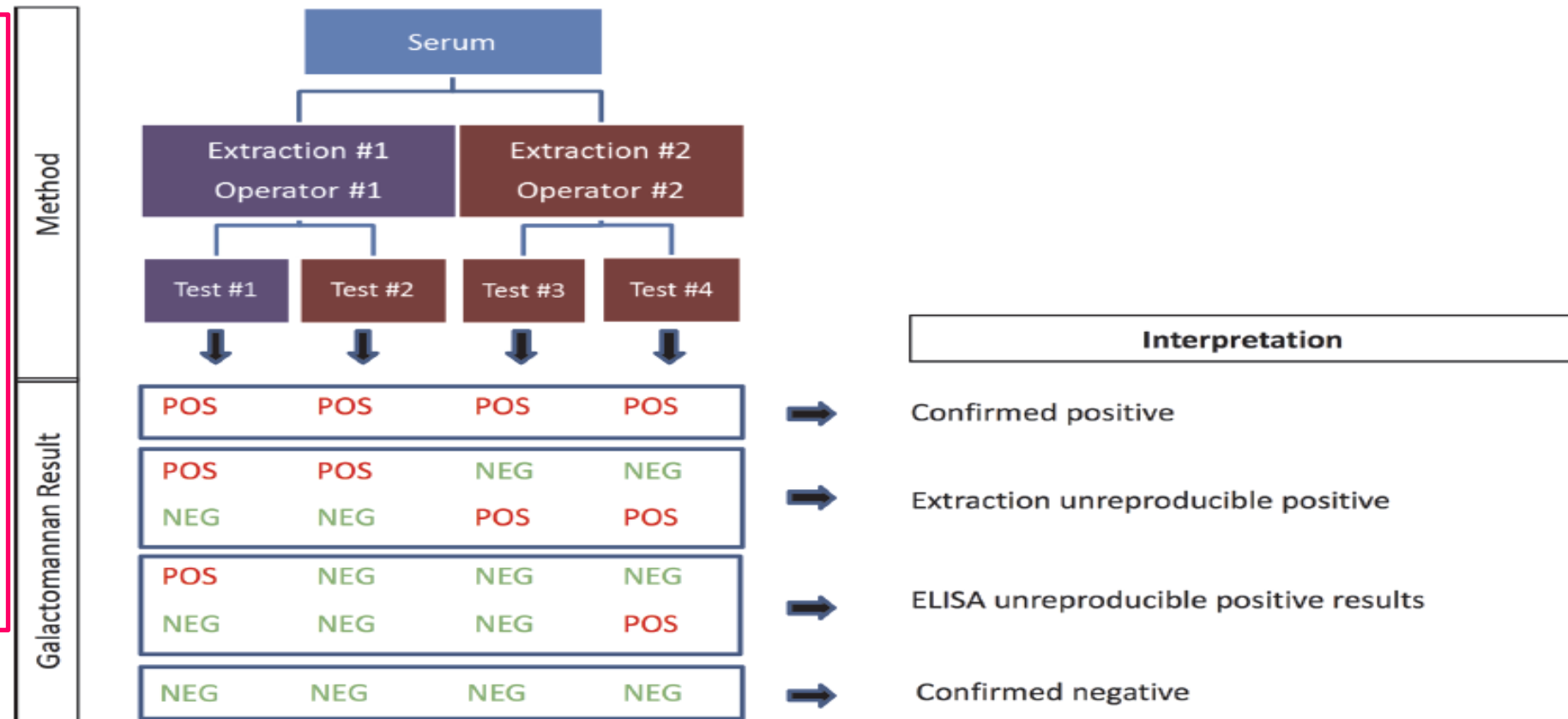
Importance of Operational Factors in the Reproducibility of *Aspergillus* Galactomannan Enzyme Immune Assay

Nicolas Guigue^{1,2}, Samuel Lardeux³, Alexandre Alanio^{1,2,4,5}, Samia Hamane¹, Marc Tabouret³, Stéphane Bretagne^{1,2,4,5*}

PLOS ONE |
DOI:10.1371/journal.pone.0124044
April 10, 2015

Operational unreproducible positives represent **33% of the GM-positive results** and a **second sample evaluation appears mandatory** to avoid useless investigations or treatments.

When operational artifacts are excluded, GM remains **stable at standard storage conditions (after storage 72h at 4°C or 8 months at -20°C)**

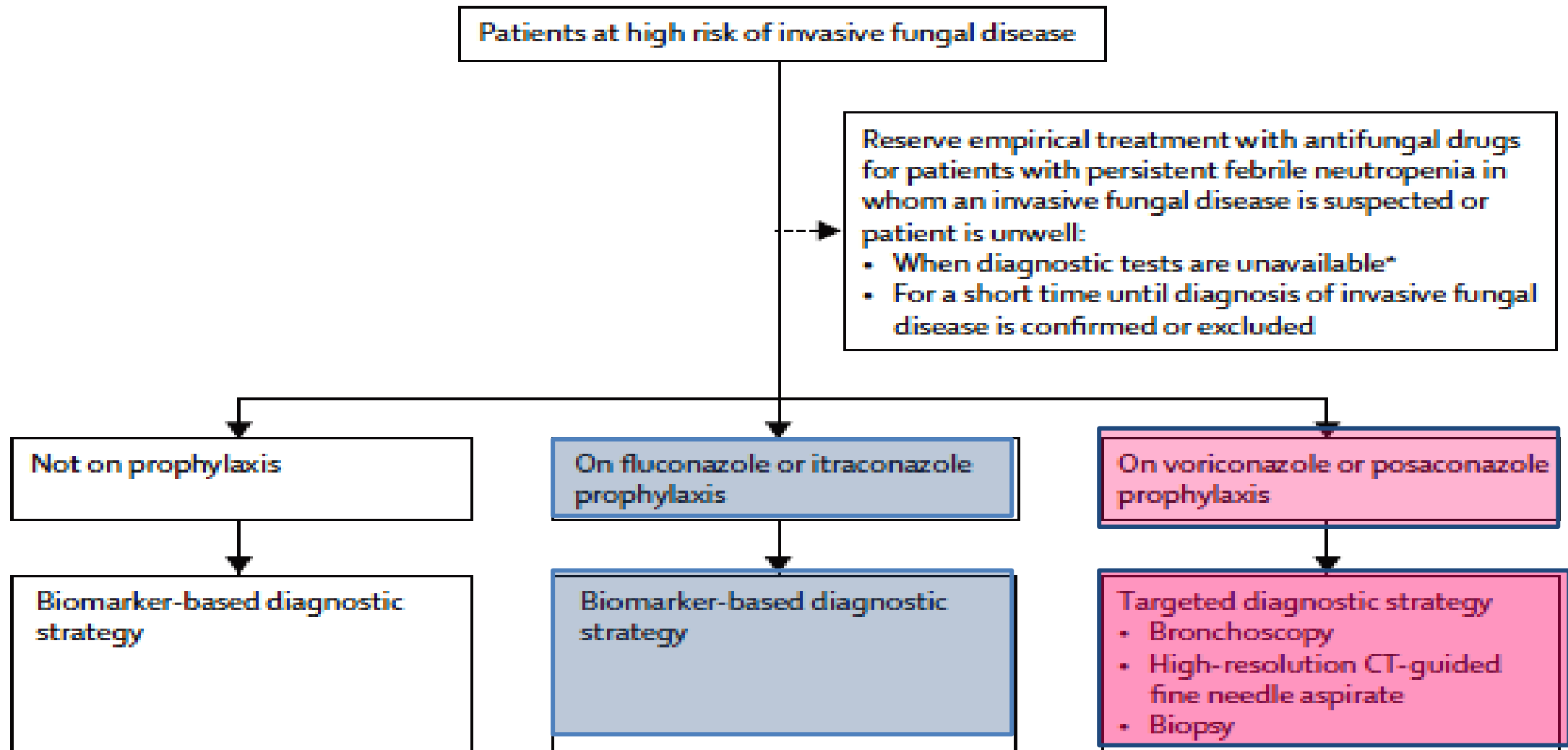


Γαλακτομαννάνη GM: μέτρηση στον ορό

Strength of recommendation A, B, C, D (against use) Quality of evidence: level I, II, III

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Patients with prolonged neutropenia or allogeneic stem cell transplantation recipients not on mould-active prophylaxis	<u>Prospective screening for IA</u>	GM in blood ^a Draw samples every 3–4 days	A C	I III	Highest test accuracy requiring two consecutive samples with an ODI ≥ 0.5 or retesting the same sample Prospective monitoring should be combined with HRCT and clinical evaluation
Patients with prolonged neutropenic or allogeneic stem cell transplantation recipients on mould active prophylaxis	Prospective screening for IA	GM in blood ^a	D	II	Low prevalence of IA in this setting with consequently low PPV of blood GM test Prophylaxis may have a negative impact on sensitivity of the test or the low yield may be due to decreased incidence of IA
Patients with a haematological malignancy	To diagnose IA	GM in blood ^a	A B	II II	Significantly lower sensitivity in non-neutropenic patients
<ul style="list-style-type: none"> • Neutropenic patients • Non-neutropenic patients ICU patients	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Better performance in neutropenic than in non-neutropenic patients
Solid organ recipients	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Low sensitivity, good specificity Most data for lung SOT
Any other patient	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Piperacillin/tazobactam may no longer be responsible for false-positive results according to recent studies Cross-reactivity in case of histoplasmosis, fusariosis, talaromycosis (formerly: penicilliosis) False-positive results reported due to ingestion of ice-pops, transfusions, antibiotics, Plasmalyt® infusion
Cancer patients	<u>To monitor treatment</u>	GM in blood ^a	A	II	

Η GM είναι διαγνωστικός δείκτης αν ο ασθενής λαμβάνει προφύλαξη έναντι υφομυκήτων (mould active);



Pat
n
st
re
p

est

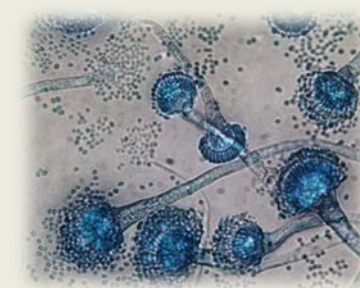
ntly low

ivity of
cidence



Γαλακτομαννάνη – GM

Χαρακτηριστικά



- Απόδοση ανάλογα **πληθυσμού ασθενών και επίπτωση νόσου**
 - καλύτερη ευαισθησία (70%–89%) και ειδικότητα (85%–92%) σε HM/H SCT ασθενείς
- **Αύξηση ευαισθησίας στο BAL**, σε σχέση με τον ορό σε πνευμονική ΙΑ μετά HM/H SCT και SOT
- **Ψευδώς θετικά αποτελέσματα** έχουν συσχετιστεί με:
 - άλλους υφομύκητες (*Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp./ *Purpureocillium licacinum*, και *Histoplasma* spp.)
 - λήψη ορισμένων αντιβιοτικών (αλλά όχι πλέον με PIP/TAZO)
 - κατανάλωση ορισμένων τροφίμων (π.χ. τύποι γάλακτος, και popsicles)
 - ύπαρξη *Bifidobacterium* στο έντερο των νεογνών
- Ανίχνευση GM στο BAL δε διαφοροποιεί αποικισμό από διεισδυτική λοίμωξη



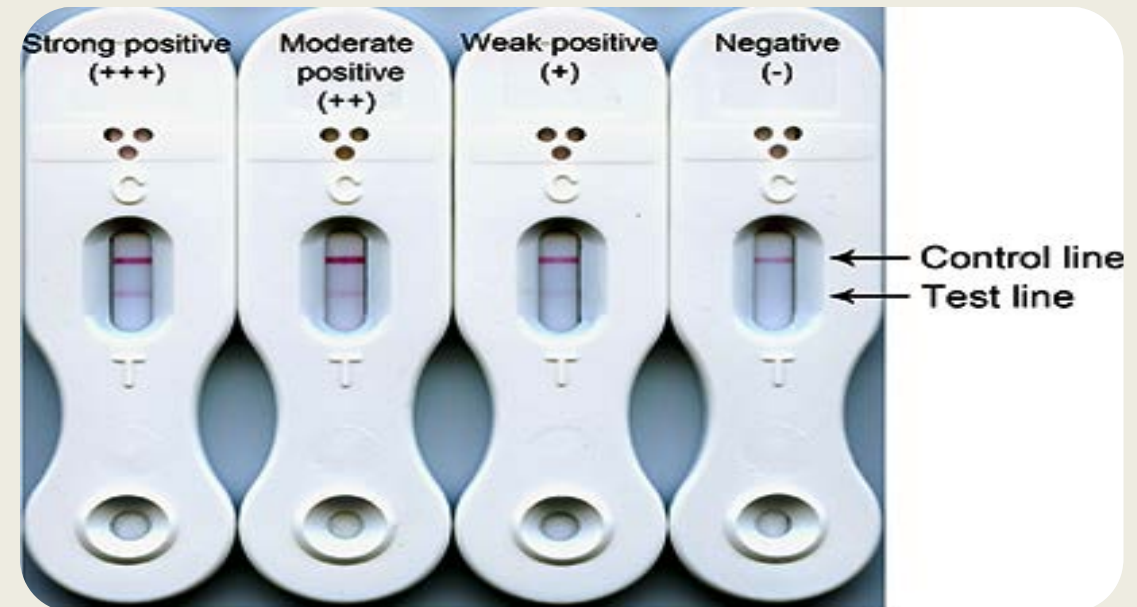
Ανοσοχρωματογραφία - Lateral-Flow Technology



Ανοσοχρωματογραφία GM

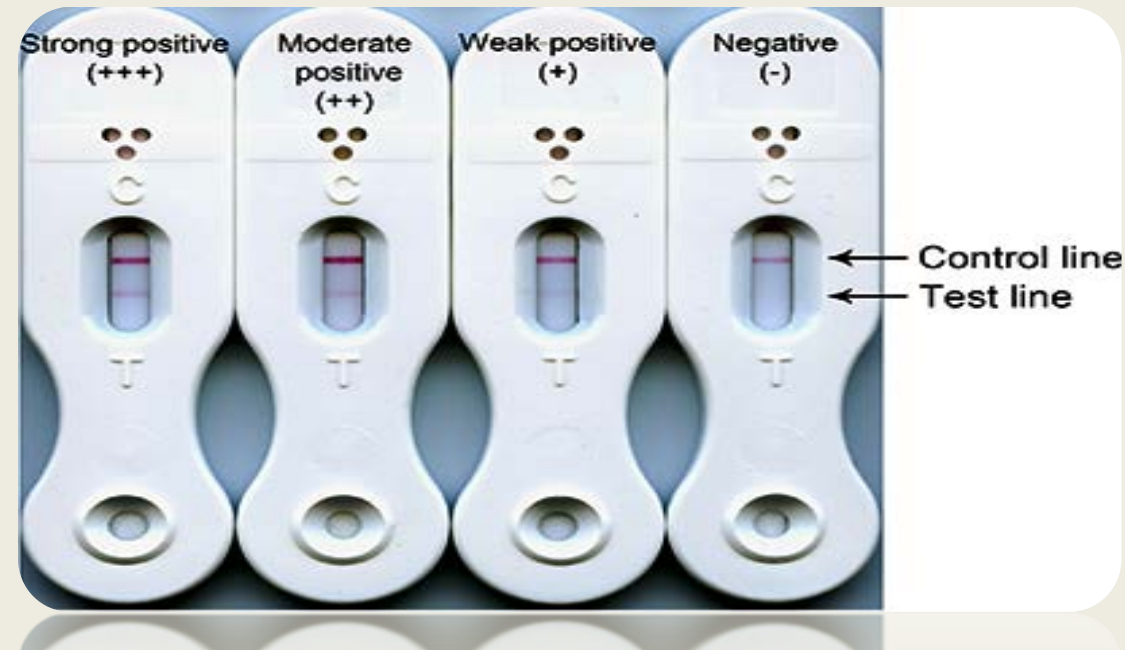
Lateral-Flow Technology

- *Aspergillus*-specific MAb (JF5) (hybridoma technology)
- Ανοσοχρωματογραφία (LFD) ως παρακλινία δοκιμασία - point-of-care (POC) για IPA.
- **Σημαντικό πλεονέκτημα:** ανίχνευση ενεργού δράσης γιατί το MAb JF5 συνδέεται με εξωκυττάρια πρωτεΐνη που εκκρίνεται **MONO** κατά τη διάρκεια πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης του μύκητα
- Απλό, γρήγορο (15 min), μονο-test
- Εφαρμογή σε BAL ή ορό



Ανοσοχρωματογραφία GM

Lateral-Flow Technology



- *Aspergillus*-specific MAb (JF5) (hybridoma technology)
- Ανοσοχρωματογραφία (LFD) ως παρακλινία δοκιμασία - point-of-care (POC) για IPA.

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Haematological malignancy and solid organ transplant	To diagnose IA	LFD applied on BAL samples	B	II	Σε αιματολ. κακοήθεια και μεταμοσχ. συμπαγών οργάνων: ευαισθησία 100%, ειδικότητα 81% (PPV 71%, NPV 100%)
Haematopoietic stem cell transplantation	To diagnose IA	LFD applied on serum samples	B	II	Prospective screening in 101 patients undergoing allogeneic HSCT
Immunocompromised patients	To diagnose IA	LFD applied on BAL samples	B	II	Retrospective study. Sensitivities for LFD, GM, BDG and PCR were Σε ανοσοκατεσταλμένους: μαζί με GM (cut-off >1.00) αύξηση ευαισθησίας σε 94%

Aspergillus antigen **GP** ELISA

Galactomannan (GM) **vs** Galactomannoprotein (GP)

- GM και GP ELISA βασίζονται σε MAbs ειδικά έναντι *Aspergillus Ag*.
- **Platelia GM ELISA** → rat IgM **EB-A2** συνδέεται με polysaccharide galactomannan (GM).
- **GP ELISA** → **IgG3 Ab JF5** συνδέεται με επίτοπο του τοιχώματος των υφών.

Πλεονεκτήματα GP ELISA

- **ΌΧΙ διασταυρούμενες αντιδράσεις** με κλινικά σημαντικούς μύκητες
 - *Cryptococcus neoformans*,
Candida spp., *Talaromyces*
(προηγ. ονομασία *Penicillium*)
marneffeii, *Fusarium solani*που παρατηρούνται με EB-A2 Ab (GM ELISA)
- Ευαισθησία και ειδικότητα μεθόδων παρόμοιες
- **Ευαισθησία ΔΕΝ επηρεάζεται σε ΜΗ αιματολογικούς ασθενείς**

Εφαρμογή GM & Aspergillus PCR

- Prospective screening of **high-risk haematological patients** by a combination of GM and PCR improves the diagnostic accuracy and is associated with an earlier diagnosis

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Patients with haematological malignancies	To diagnose IA	PCR on blood samples	B	II	Meta-analysis: 16 studies PCR single positive test: Sensitivity: 88%, specificity: 75%; PCR two consecutive positive tests: Sensitivity: 75%, specificity: 87% 97% of protocols detected threshold of 10 genomes/mL serum volume >0.5 mL, elution volume <100 µL, sensitivity: 86%; specificity: 94% First blood PCR assay to be compatible with EAPCRI recommendations, fever driven: Sensitivity: 92%, specificity: 95%, negative PCR result to be used to rule out IA Combination of serum and whole blood superior
	To diagnose IA	PCR on serum samples			
	To diagnose IA	PCR on whole blood samples			
Haematopoietic stem cell transplantation	To diagnose IA	Prospective screening PCR on whole blood samples	B	II	Addition of GM and PCR monitoring provides greater accuracy, PPV 50-80%, NPV 80-90%
	To diagnose IA	Prospective screening PCR on blood samples	B	II	
	To diagnose IA	PCR and GM in BAL	A	II	

Strength of recommendation
A, B, C, D (against use)
Quality of evidence: level I, II, III



Ποια η εμπειρία από την ταυτόχρονη εφαρμογή

GM & *Aspergillus* DNA PCR tests

ως μέθοδοι ρουτίνας για τη διάγνωση ΙΑ σε ανοσοκατεσταλμένα παιδιά ;

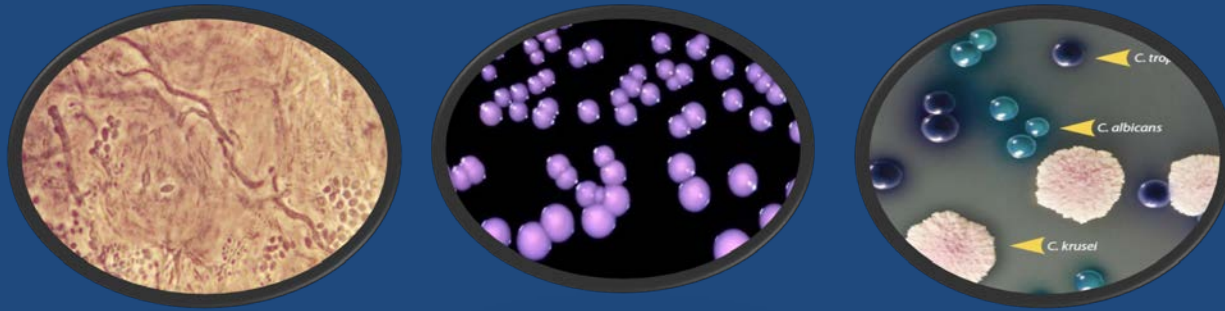
Use of Galactomannan Antigen and *Aspergillus* DNA Real-time Polymerase Chain Reaction as Routine Methods for Invasive Aspergillosis in Immunosuppressed Children in Greece

Diagnostic Result	All Patients	
	No. of Samples	No. of Patients
GM(+)/PCR(+)	24	11 (7.05%)
GM(+)/PCR(-)	23	13 (8.33%)
GM(-)/PCR(+)	6	4 (2.57%)
GM(-)/PCR(-)	691	128 (82.05%)
Total	744	156

Overall disagreement in 17 patients

GM and PCR results for detecting IA in 156 immunosuppressed children

- ❖ The **combination** of both methods provides:
 1. a high rate of positive or negative agreement.
 2. a high diagnostic accuracy in consecutive samples (twice a week)
- ❖ The use of GM and PCR was very useful in the **rapid and effective therapeutic management**
- ❖ The combination of GM and PCR detection can be used as a **routine method**



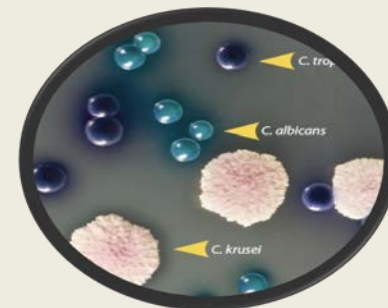
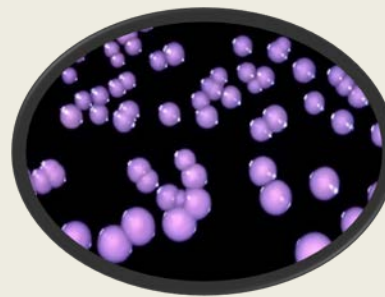
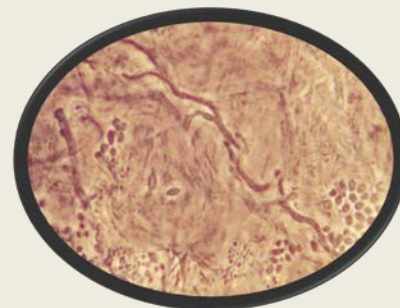
Μαννάνη – αντιμαννάνη, Mn, anti-Mn


ΜΗ μυκητολογικό κριτήριο

ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedure

Disease	Specimen	Test	Recommendation	Level of evidence
Candidaemia Καντινταιμία	Blood Serum	Blood	Essential investigation	NA
		Mannan/anti-mannan	Recommended	II
		B-D-glucan	Recommended	II
		Other antibodies	No recommendation	No data
		Septifast PCR kit	No recommendation	No data
In-house PCR	No recommendation	No data		
Invasive candidiasis (IC) Δεισδοτική	Blood Serum	Blood	Essential investigation	NA
		Mannan/anti-mannan	No recommendation (IC)	No data
		B-D-glucan	Recommended (CDC)	II
		Septifast PCR kit	Recommended	II
		In-house PCR	No recommendation	No data
Chronic disseminated candidiasis (CDC) Χρόνια διάσπαρτη	Tissue and sterile body fluids	Direct microsc. & histopathol.	Essential investigation	NA
		Culture	Essential investigation	NA
		Immuno-histochemistry	No recommendation	No data
		Tissue PCR	No recommendation	No data
		In situ hybridization	No recommendation	No data

Μαννάνη + αντι-Μαννάνη



Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Mannan + Anti-mannan 	Καντινταιμία Χρόνια διάσπαρτη	Καλή ευαισθησία και ειδικότητα σε συνδυασμό σε ασθενείς της ΜΕΘ (3) Νωρίτερα θετικοποίηση από κ/α αίματος (3) Προτείνεται στις οδηγίες του ESCMID ο συνδυασμός με υψηλή NPV (1)	Περιορισμένη εμπειρία Δεν είναι μυκητολογικό κριτήριο Οι ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 89.3% & 63% για Mn + anti-Mn (2) <i>C. parapsilosis</i> & <i>C. guilliermondii</i> καντινταιμίες δεν ανιχνεύονται με την Platelia Candida Ag Plus τεχνική (2) Καλύτερα αποτελέσματα αν λοίμωξη από <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> ή <i>C. glabrata</i>

Δεν είναι μυκητολογικό κριτήριο

1. Cuenca-Estrella M, et al. Clin Microbiol Infect 2012;18(Suppl 7):9–18
2. Held J, et al. J Clin Microbiol 2013;51:1158–64
3. Mikulska M, et al. Crit Care Med 2010;14:R222

Ανίχνευση μαννάνης / αντι-μαννάνης → μειωμένη εμπειρία

- ▶ Ταχεία κάθαρση αντιγόνου από το αίμα [1]
- ▶ Καλή παραγωγή αντισωμάτων σε αιματολογικούς και μεταμοσχευμένους [1,2]
- ▶ Καλύτερα αν μέτρηση IgG (όχι IgM), πιθανά λόγω αναμνηστικής αύξησης ή υποκλινικής ιστικής διείσδυσης [2]

Μετα-ανάλυση 14 μελετών [3]:

▶ Θετικοποίηση ΠΡΙΝ

- ✓ **Αιμοκ/α** σε 73% ασθενών
- ✓ **Ακτινολογικά ευρήματα** σε 86% ασθ.
ηπατοσπληνική καντιντίαση

	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Μαννάνη	58	93
Αντι-μαννάνη IgG	59	83
Μαννάνη + αντι-μαννάνη IgG	83	86

Επιπολής μυκητιάσεις: *ποιες τεχνικές έχουμε στη διάθεσή μας ;*

Μικροβιολογική

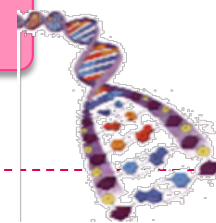
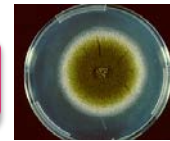
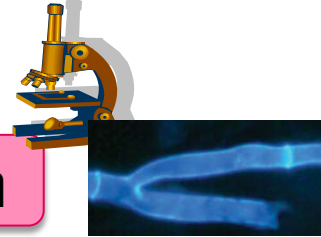
Συμβατικές
(κλασικές)

Νεότερες
ΜΗ
καλλιεργητικές

Άμεση μικροσκοπική

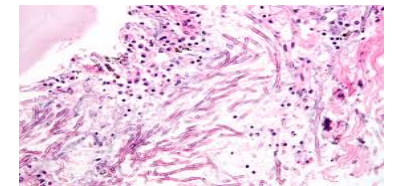
Καλλιέργεια

Μοριακές



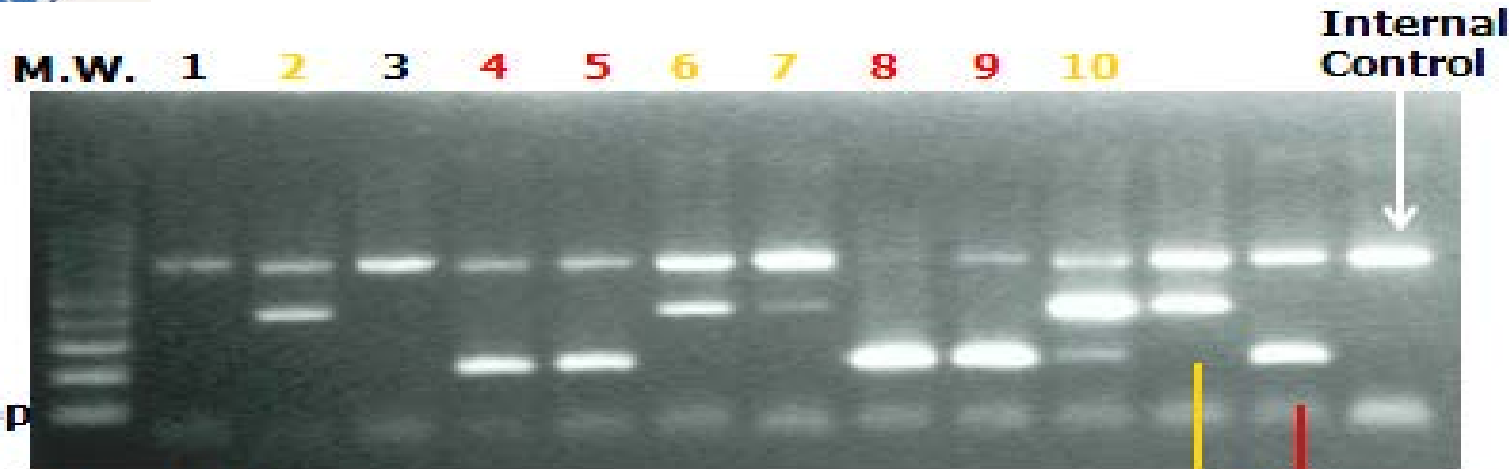
Μη μικροβιολογική

Ιστολογική



Trichophyton rubrum-specific and/or pan-dermatophyte multiplex PCR product analysis

Dermatophyte PCR kit (Statens Serum Institut
Diagnostica, Denmark)



Results:

T. rubrum: samples 4, 5, 8, 9

Dermatophytes: samples 2, 6, 7, 10

Negative for dermatophytes: samples 1, 3

Διάγνωση ονυχομυκητίασης

Πολυπλεκτική PCR (Dermatophyte PCR kit, Statens Serum Institut, SSI Diagnostica, Denmark) με 2 ζεύγη primers:

α. chitin synthase 1 για την ανίχνευση γενικά «δερματόφυτο» και

β. ITS2 (internal transcribed spacer) για ανίχνευση *T. rubrum*.

- Ολοκλήρωση διαδικασίας σε 5 ώρες

Evaluation of a multiplex-PCR-based method for the rapid identification of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis

- Συνολικά από τα 252 δείγματα από ισάριθμους ασθενείς που μελετήθηκαν
 - 86 (34.1%) βρέθηκαν θετικά με την PCR, ενώ
 - 79 (31.3%) με τις κλασικές μεθόδους διάγνωσης
- Με τη χρήση της PCR **αυξήθηκε τόσο**
 - ο αριθμός των θετικών δειγμάτων (αύξηση 7.1%), όσο και
 - η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους (αύξηση 11.9%).
- Προηγούμενη λήψη αντιμυκητικής αγωγής **δεν επηρέασε το αποτέλεσμα της PCR**
 - 12 δείγματα (4 αρνητικά με κλασικές τεχνικές και 8 θετικά με την μικροσκοπική εξέταση)

DermaGenius®

- Πολυπλεκτική multiplex real-time PCR kit

- Ανίχνευση και ταυτοποίηση των πιο συχνά απομονούμενων δερματοφύτων

- **Δείγματα:** δέρμα, νύχια, τρίχες

- *Candida albicans* (*C. albicans*)
- *Trichophyton interdigitale* (*T. interdigitale*)
- *Trichophyton tonsurans* (*T. tonsurans*)
- *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*)
- *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*)
- *Trichophyton soudanense* (*T. soudanense*)
- *Trichophyton violaceum* (*T. violaceum*)
- *Trichophyton benhamiae* (*T. benhamiae*)
- *Trichophyton verrucosum* (*T. verrucosum*)
- *Microsporum canis* (*M. canis*)
- *Microsporum audouinii* (*M. audouinii*)
- *Epidermophyton floccosum* (*E. floccosum*).

Δυνατότητα ανίχνευσης και διπλής μόλυνσης

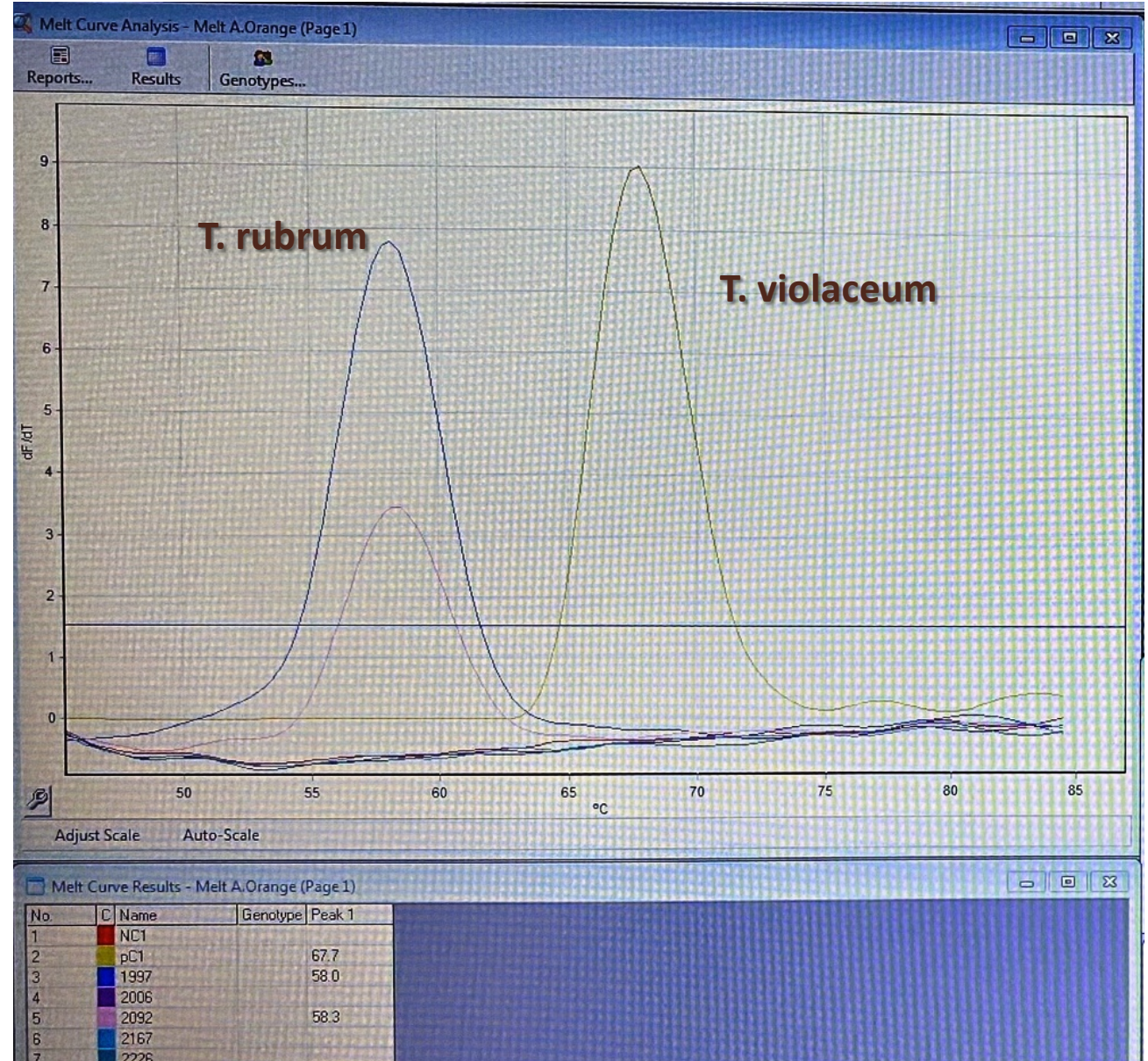
Επιτρέπει ταυτόχρονα την άμεση ανίχνευση και ταυτοποίηση των *T. rubrum*, *T. interdigitale* και *C. albicans*.

- Ανάλυση με melting curve

➔ Σε μελέτη **138 δειγμάτων** νυχιών πιθανής ονυχομυκητίασης:

- **sensitivity 80%** and
- **specificity 74.4%**, (ιστολογική και κ/α ως μέθοδοι αναφοράς)

1. Καλύτερη ταυτοποίηση
2. Μείωση χρόνου μέχρι το αποτέλεσμα
3. Ταυτοποίηση σε περίπτωση μόνο ιστολογικής θετικής





“Αξιολόγηση πολυπλεκτικής Real-time PCR στην ανίχνευση μυκήτων υπεύθυνων ονυχομυκητιάσεων”

- ❖ Λαμβάνοντας ως μέθοδο αναφοράς (gold standard) θετική άμεση μικροσκοπική με ή χωρίς θετική καλλιέργεια, η RT-PCR είχε στο δείγμα που μελετήθηκε:
 - Ευαισθησία: 81.1%
 - Ειδικότητα: 96.2%
 - Θετική προγνωστική αξία (PPV) : 96.8%
 - Αρνητική προγνωστική αξία (NPV): 83.3%
- Προηγούμενη λήψη αντιμυκητικής αγωγής δεν επηρέασε το αποτέλεσμα της RT-PCR
 - 4 δείγματα (1 αρνητικό με κλασικές τεχνικές και 3 θετικά με την μικροσκοπική εξέταση) από ασθενείς που είχαν λάβει συστηματική ή τοπική αντιμυκητιακή αγωγή βρέθηκαν RT-PCR-θετικά: 3 για *T. rubrum*, και 1 για *C. albicans*.

ΠΩΣ ανιχνεύεται η αντοχή ?

- **Μοριακές τεχνικές**
 - Αλληλούχιση DNA
 - Μοριακή ανάλυση
 - **Εμπορικές τεχνικές**

DermaGenius[®]

Resistance Multiplex PCR kit

Specimen type

- Nail, hair and skin samples
- Culture

Targets

- *T. rubrum/soudanense*
- *T. interdigitale/mentagrophytes*
- *T. mentagrophytes (ITS type IV)*
- *T. tonsurans*
- *T. violaceum*
- *T. quinckeanum/T. schoenleinii*
- SQLE
 - *Leu393Phe*
 - *Phe397Leu*
 - *Leu393Ser*
 - *Phe397Ile*
 - *Phe397Val*
- *Internal Control*

Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study

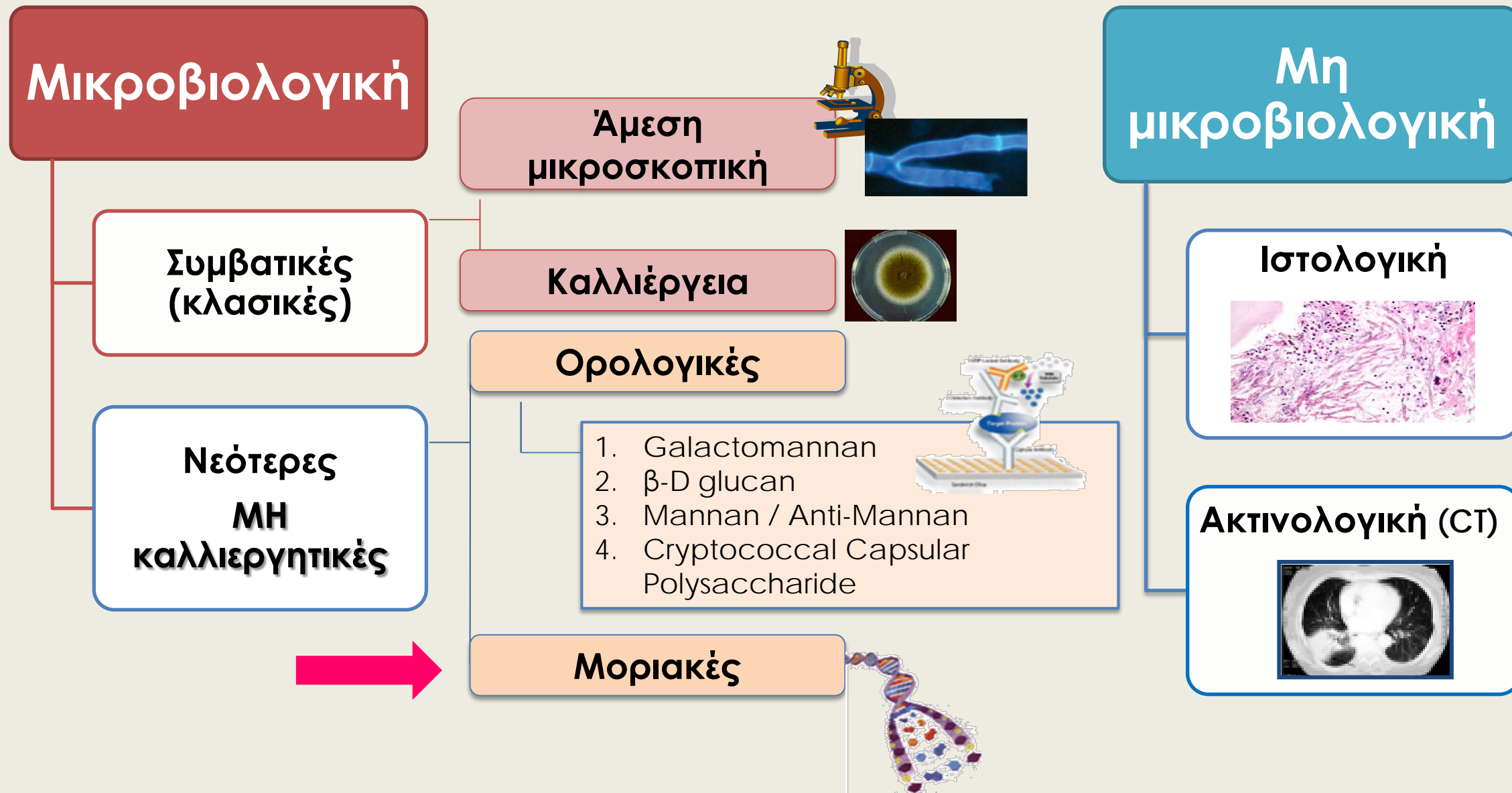
- A direct examination revealed that 31.7% and 60.9% of samples from **symptomatic** patients, and 25.7% and 60% from **asymptomatic** animals were positive, as shown by **light and fluorescence microscopy**, respectively.
- Dermatophytes **were isolated** from 90.2% and 71.4% of these samples.
- The **pan-dermatophyte primers** in real-time PCR assay facilitated detection in 85.3% and 82.9% of the **symptomatic** and **asymptomatic** dermatophytoses, respectively.
- **Species-specific PCR assays** were positive in 70.7% and 37.1% of these samples.
- The **MALDI-TOF MS** analysis yielded positive results consistent with conventional techniques in 97.2% and 72% of **symptomatic** and **asymptomatic** infections, respectively.

Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study

- Significance and Impact of Study: Dermatologists and veterinarians have difficulties in making a diagnosis of dermatophytoses based only on observed symptoms of fungal infections, as they mimic symptoms of other dermatoses.

- In this context, a comparative analysis of the results of diagnostics performed **using conventional methods and new technologies is crucial** for implementing these pioneer methods into routine laboratory practice.

Διεισδυτικές Μυκητιάσεις: ποιες μεθοδολογίες έχουμε στη διάθεσή μας ;



Διάκριση ανάλογα με (1) είδος δειγματος (2) μέθοδο

Θετική καλλιέργεια

Nucleic-acid-based methods

- Multiplex real-time PCR
- Loop-mediated isothermal amplif.(LAMP)

Hybridization methods

- Probes hybridization
- Microarrays

Συνδυασμός

- Nucleic-acid lateral flow assays (NLFA)

Sequencing methods

- WGS/NGS

MALDI-TOF MS



Κλινικό δείγμα

Nucleic-acid-based methods

- Multiplex real-time PCR
- Loop-mediated isothermal amplif. (LAMP)

Hybridization methods

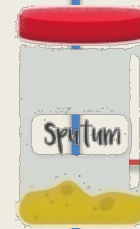
- Probes hybridization
- Microarrays

Συνδυασμός

- Nucleic-acid lateral flow assays (NLFA)

T2 Magnetic Resonance Platform

- T2 Candida



Μοριακές μέθοδοι

Μέθοδος	Ενδείξεις	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<p>Μέθοδοι PCR</p> <p>Μεγαλύτερη εμπειρία με τις in-house τεχνικές (1)</p>	<p>Ανίχνευση DNA κυρίως <i>Aspergillus</i></p> <p>PCR <i>Aspergillus</i>: Ένα από τα παρακάτω:</p> <ul style="list-style-type: none">• ορό ή πλάσμα η ολικό αίμα: ≥ 2 θετικό αποτέλεσμα σε διαδοχικά δείγματα• BAL fluid: ≥ 2 θετικό αποτέλεσμα σε διαδοχικά δείγματα• 1 θετικό αποτέλεσμα σε ορό ή πλάσμα η ολικό αίμα και 1 σε BAL <p>Μικρότερη εμπειρία για <i>Candida</i></p> <p>T2 <i>Candida</i> θετικό αποτέλεσμα</p> <p>Νέα kits για <i>Mucorales</i></p>	<p>Πρώιμη διάγνωση (ταχείες τεχνικές), υψηλή NPV (2,3)</p> <p>Υψηλή ευαισθησία (αν γονίδια σε πολλά αντίγραφα)</p> <p>Δυνατότητα:</p> <ul style="list-style-type: none">• τυποποίησης σε επίπεδο είδους• ποσοτικοποίηση <p>Ανίχνευση μικρού φορτίου σε καντιναιμίες: < 10 CFU/mL (σε 25% < 1 CFU/mL) (περιπτώσεις περιοδικής ελευθέρωσης από φλεγμένων όργανο στην κυκλοφορία ή λόγω κάθαρσης στο ήπαρ)</p>	<p>Επιπρόσθετες τεχνικές</p> <p>Σε εργαστήρια αναφοράς (μη ευρέως διαδεδομένες τεχνικές)</p> <p>Υψηλό κόστος, εξειδικευμένο προσωπικό, εξοπλισμός</p> <p>Δυσκολίες στην απομόνωση επαρκούς ποσότητας DNA από διάφορα δύσκολα δείγματα</p> <p>Ασαφής η επίδραση των αντιμυκητικών στην ευαισθησία</p> <p>Λίγα δεδομένα από ασθενείς αποικισμένους με <i>Candida</i>, αλλά τάση μείωσης ειδικότητας</p>

Είναι μυκητολογικό κριτήριο για

- Διεισδυτική ασπερίλλωση
- Διεισδυτική καντιντίαση

Donnelly P et al. CID 2019

Fungiplex *Aspergillus*

Qualitative detection of the most prevalent pathogens associated with invasive aspergillosis

- Test on suspicion of, or “at risk” of invasive aspergillosis
- Detects the most prevalent species associated with invasive aspergillosis
- Differentiates *A. terreus*
- Uses routinely collected samples without culture (serum, plasma, BAL)
- Same day results
- Early indicator of fungal infection
- Excellent performance
 - sensitivity 95 %, specificity 90 % (retrospective clinical samples)



Νέα μοριακά διαγνωστικά tests για AzoleR-Af

ESCMID-ECMM-ERS
Aspergillus guideline
recommends resistance
testing in *A. fumigatus* and
local resistance
surveillance

▶ **AsperGenius[®] Resistance multiplex kit, PathoNostics**

▶ **Species multiplex**

▶ *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Aspergillus* species

▶ **Resistance multiplex**

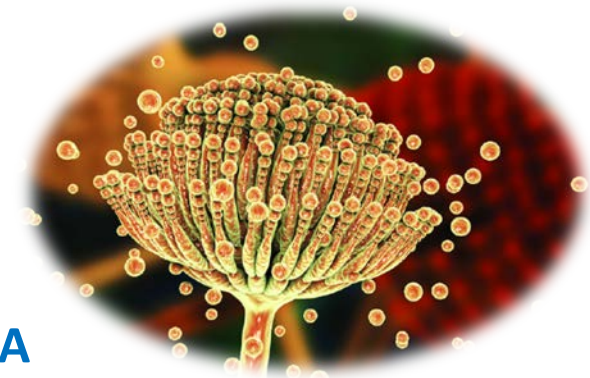
▶ L98H, Tandem repeat 34, T289A, Y121F

▶ **Direct detection in BAL**

▶ **Results within 3.5 hours**

▶ **Differentiation of *A. fumigatus*, *A. terreus* and *Aspergillus* species**

▶ **Identification of azole-resistant markers: L98H/TR34 and TR46/Y121F/T289A**



▶ **Fungiplex[®] Aspergillus Azole-R, Bruker**

▶ the presence of mutations in the *Cyp51* gene of *A. fumigatus* (tandem repeat sequences TR₃₄ and TR₄₆)

▶ **MycoGENIE[®] Aspergillus fumigatus and resistances TR34/L98H , Ademtech**



Νέα μοριακά διαγνωστικά tests

▶ **MucorGenius[®] real-time PCR, PathoNostics**

- ▶ Pan-Mucormycetes
 - Rhizopus* spp.
 - Mucor* spp.
 - Lichtheimia* spp.
 - Cunninghamella* spp.
 - Rhizomucor* spp.
- ▶ **Direct detection in BAL-, serum, and biopsy samples**
- ▶ **Results within 3.5 hours**



▶ **Fungiplex Mucorales, Bruker**

▶ **MycoGENIE Aspergillus – Mucorales, Ademtech**



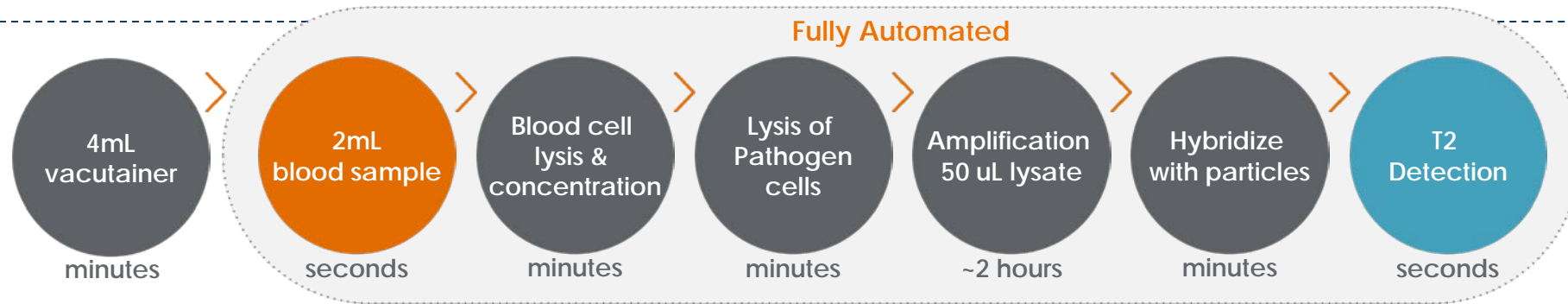
Fungiplex Pneumocystis

Quantitative detection of *Pneumocystis jirovecii*

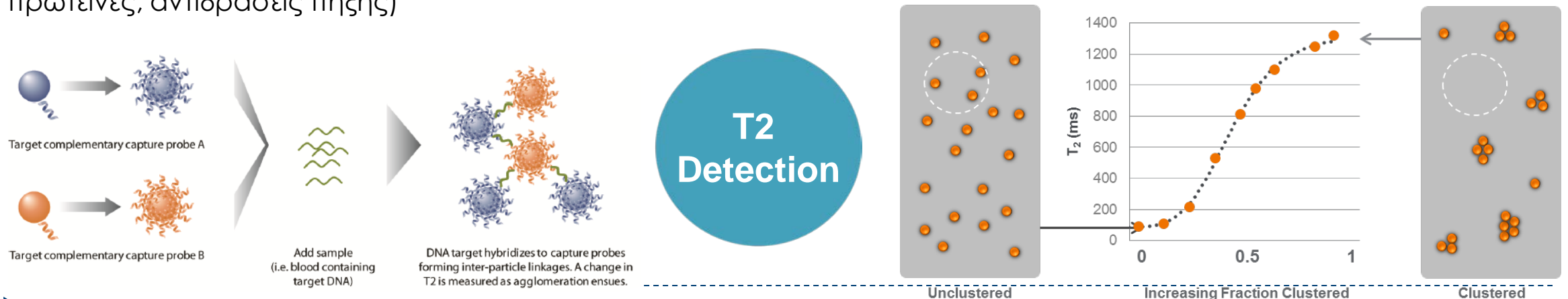
- Detects *Pneumocystis jirovecii*
- **Quantitative** real-time PCR
- Includes endogenous control (beta-actin) to provide information on sample quality
- Includes five DNA standards to generate calibration curve
- Validated on DNA extracted from:
 - **Bronchoalveolar lavage (BAL)**
 - **Non-directed bronchial lavage (NBL)**
 - **Oropharyngeal swabs**
- Excellent performance:
 - sensitivity 99 %, specificity 99 % (retrospective clinical samples)



T2Dx Instrument - μεθοδολογία



- ▶ Εξειδικευμένη μεθοδολογία που επιτρέπει πολ/σμό DNA από ποικίλα κλινικά δείγματα, (π.χ. πλάσμα, αίμα, πτύελα, ούρα, κλπ), χωρίς κίνδυνο αναστολής της αντίδρασης PCR από ύπαρξη αναστολέων στο δείγμα.
- ▶ Καμία επίδραση από ανθρώπινο DNA ή αντιβιοτικά, απλοποίηση διαδικασίας, χωρίς προηγηθείσα απομόνωση .
- ▶ Η μεθοδολογία T2 Magnetic Resonance (T2MR) εφαρμόζεται απευθείας στο κλινικό δείγμα και έχει υψηλή ευαισθησία
- ▶ Ο ανιχνευτής T2MR μπορεί να διαμορφωθεί για να ανιχνεύει πολλούς διαφορετικούς τύπους στόχων (π.χ. μικρά μόρια, πρωτεΐνες, αντιδράσεις πήξης)

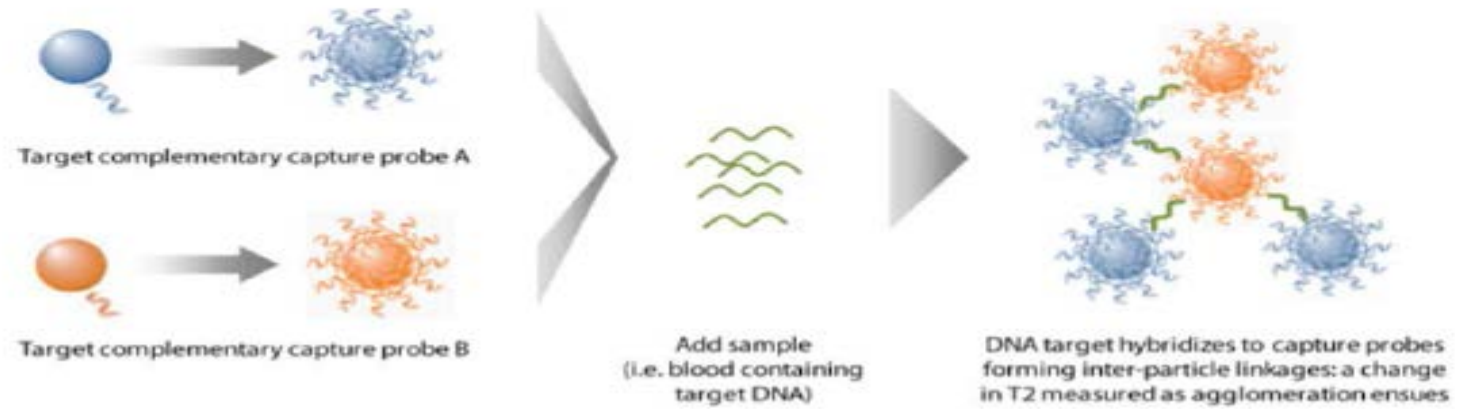
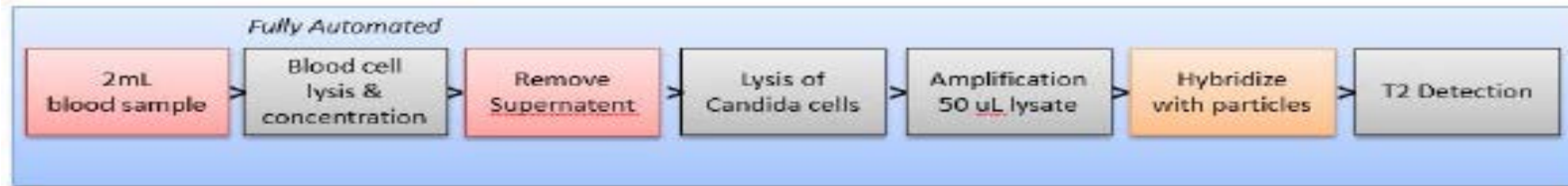


T2Dx Diagnostics

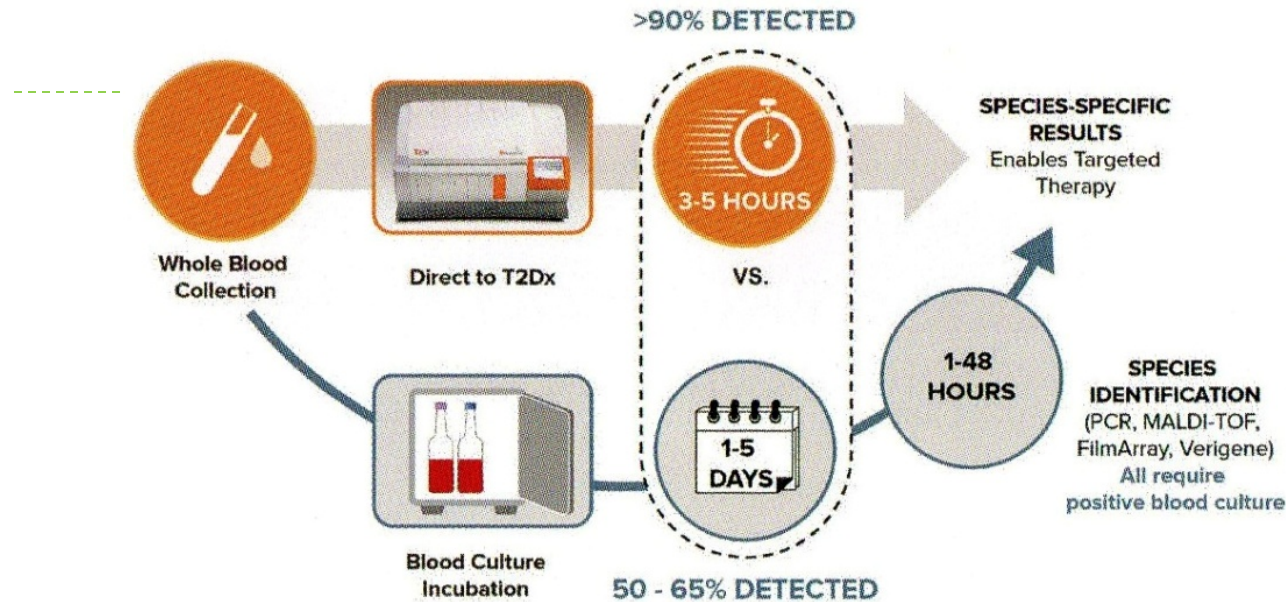
T2Dx Instrument

▶ T2 Panels

- ▶ T2 Magnetic Resonance (T2MR) technology platform.
- ▶ T2MR combines proven magnetic resonance with innovative nanotechnology to accurately identify pathogens



T2 NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE



▶ T2Dx Instrument

- ▶ Άμεσα από ολικό αίμα
- ▶ Αποτέλεσμα σε 3-5 ώρες
- ▶ Ανίχνευση 1 CFU/mL LoD
- ▶ Ευκολία , cartridge-based

▶ T2Candida panel

- ▶ *C. albicans*
- ▶ *C. tropicalis*
- ▶ *C. krusei*
- ▶ *C. glabrata*
- ▶ *C. parapsilosis*

Ευσαιθησία: 91,1%
Ειδικότητα: 99,4%

Mylonakis E et al.
2015;CID

T2Candida Panel⁶

Wilson NM et al. Poster Presentation IDWeek 2016

	T2 Panel Positive	BC Positive
Blood Culture	31	33
Proven/Probable	22	0
Total	53/55 (96%)	33/55 (60%)

T2Direct Diagnostics™

Powered by **CARB-X**

T2Candida®

Sensitivity: 91.1%²
Specificity: 99.4%²

C. albicans
C. tropicalis
C. parapsilosis
C. krusei
C. glabrata

New FDA Product Code
1-3 CFU/mL LoD

T2Bacteria®

Sensitivity: 95.8%¹
Specificity: 98.2%¹

E. faecium
S. aureus
K. pneumoniae
*A. baumannii**
P. aeruginosa
E. coli

New FDA Product Code
2-11 CFU/mL LoD
*Only available on CE/IVD Panel

T2Resistance™

FDA Breakthrough Device
CE Mark/RUO 2019

mecA/C
vanA/B
CTXM-14/15
KPC
OXA-48 Group
NDM, VIM, IMP
AmpC (CMY/DHA)

In Development
2-5 CFU/mL LoD

T2Candida auris

Sensitivity: ≥89%
Specificity: 98%

C. auris
C. duobushaemulonii
C. haemulonii

RUO; Validated by CDC for patient swabs, demonstrated performance in blood; ≤5 CFU/mL LoD

1. T2Bacteria Pivotal Clinical Study. This is a combination of samples run in both prospective and contrived arms of study. T2Bacteria showed an overall average sensitivity of 90% in the prospective arm of the study and the contrived arm an overall average PPA of 97%.

2. Mylonakis, E., et al. Clinical Infectious Diseases 2015

3. Research reported in this presentation is supported by the Cooperative Agreement Number IDSEP160030 from ASPR/BARDA and by an award from Wellcome Trust, as administered by CARB-X. The content is solely the responsibility of T2 Biosystems and does not necessarily represent the official views of the Department of Health and Human Services Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response, other funders, or CARB-X.

Fungiplex *Candida*

Qualitative detection of the most common pathogens associated with invasive candidiasis

- Test at first suspicion of invasive candidiasis
- Detects the **most prevalent species** associated with Invasive candidiasis
- **Differentiates species with intrinsic resistance**
- Uses routinely collected samples **without culture** (whole blood, serum, plasma)
- **Same day results**
- Excellent performance:
 - sensitivity 97 %, specificity 99 % (retrospective and contrived samples)



Μοριακή διάγνωση

Απομόνωση γενετικού υλικού
Extraction

Πολλαπλασιασμός
Amplification

Ανίχνευση
και
αποτέλεσμα

Κλειστά συστήματα (όλα τα ενδιάμεσα στάδια σε ένα μηχάνημα)

Άρα

Μείωση ανάγκης εκπαιδευμένου προσωπικού και χώρων
Διεκπεραίωση εξέτασης σε όλες τις βάρδιες → Βελτίωση χρόνου αποτελέσματος

Biofire™ filmarray system

- ✓ Multiplex – Nested – Array PCR
- ✓ Απευθείας από το δείγμα ή **από θετική αιμοκαλλιέργεια**
- ✓ **Συνδρομική διάγνωση:**
 - ➔ **Θετική αιμοκαλλιέργεια (SN 98,8%, SP 99,6%)**
 - Μηνιγγίτιδα/Εγκεφαλίτιδα (SN 94,2%, SP 99,8%)
 - Ανώτερο αναπνευστικό (SN 97%, SP 99%)
 - Κατώτερο αναπνευστικό (SN 96,3%, SP 98,3%)
 - Γαστρεντερικό (SN 98,5%, SP 99,3%)
- ✓ **Ευαισθησία:** 94,2-98,8%, **Ειδικότητα:** 98,3-99,8%
- ✓ **TAT: ~1h**



ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΘΕΤΙΚΗ ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (BCID2) PANEL

GRAM-NEGATIVE BACTERIA

- Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex
- Bacteroides fragilis**
- Enterobacteriales**
 - Enterobacter cloacae* cp.
 - Escherichia coli*
 - Klebsiella aerogenes**
 - Klebsiella oxytoca*
 - Klebsiella pneumoniae* group
 - Proteus*
 - Salmonella**
 - Serratia marcescens*
 - Haemophilus influenzae*
 - Neisseria meningitidis*
 - Pseudomonas aeruginosa*
 - Stenotrophomonas maltophilia**

GRAM-POSITIVE BACTERIA

- Enterococcus faecalis**
- Enterococcus faecium**
- Listeria monocytogenes*
- Staphylococcus**
 - Staphylococcus aureus*
 - Staphylococcus epidermidis**
 - Staphylococcus lugdunensis**
- Streptococcus**
 - Streptococcus agalactiae*
 - Streptococcus pneumoniae*
 - Streptococcus pyogenes*

YEAST

- Candida albicans*
- Candida auris**
- Candida glabrata*
- Candida krusei*
- Candida parapsilosis*
- Candida tropicalis*
- Cryptococcus neoformans/gattii**

ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES

Carbapenemases

- IMP**
- KPC
- NDM**
- OXA-48-like**
- VIM

Colistin Resistance

- mcr-1**

ESBL

- CTX-M**

Methicillin Resistance

- mecA/C*
- mecA/C and MREJ (MRSA)**

Vancomycin Resistance

- vanA/B*

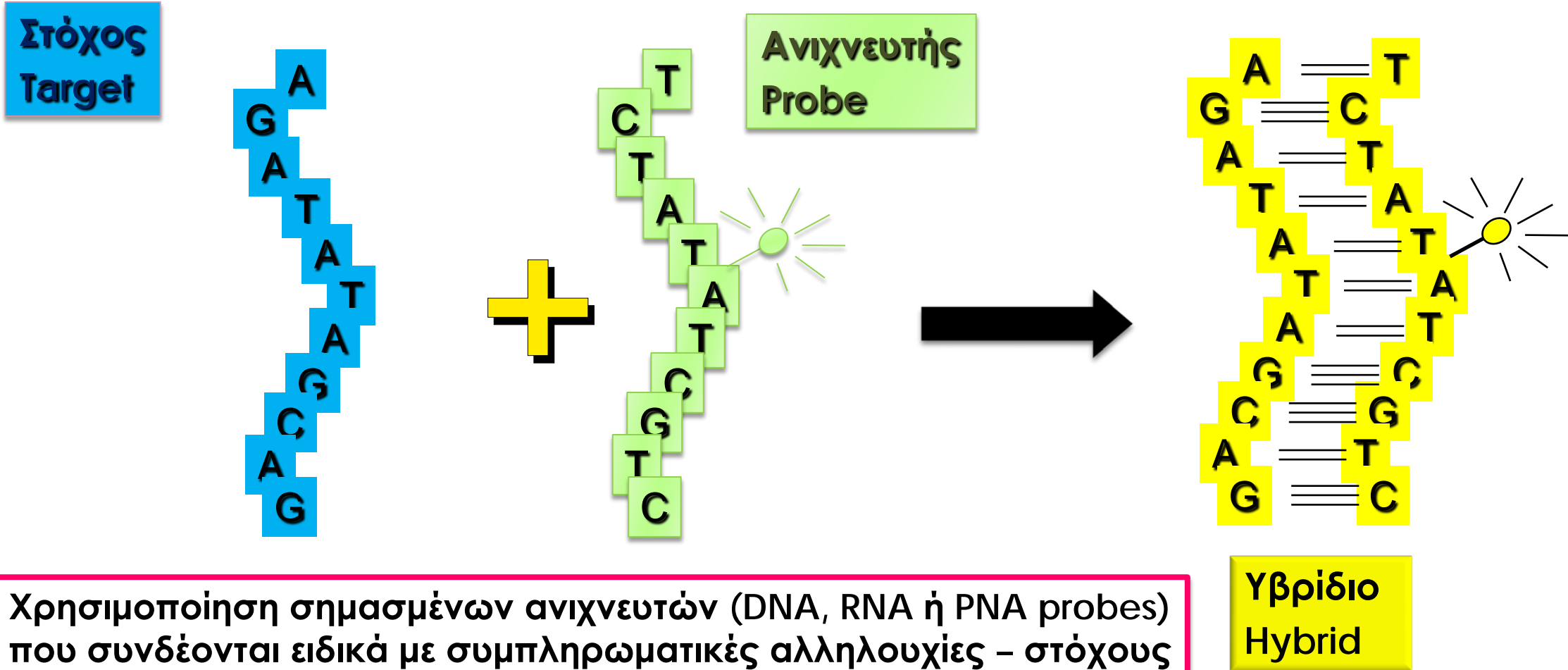
43 ΣΤΟΧΟΙ

New target on the BioFire BCID2 Panel

Target improvement on the BioFire BCID2 Panel



Μέθοδοι υβριδισμού (Hybridization methods)



Χρησιμοποίηση σημασμένων ανιχνευτών (DNA, RNA ή PNA probes) που συνδέονται ειδικά με συμπληρωματικές αλληλουχίες - στόχους



Θετική αιμοκαλλιέργεια

```
graph TD; A[Θετική αιμοκαλλιέργεια] --> B[Χρώση Gram]; A --> C[Καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά]; A --> D[Άμεση ανίχνευση και ταυτοποίηση];
```

Χρώση Gram

Καλλιέργεια σε
στερεά θρεπτικά υλικά

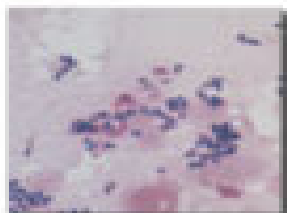
Άμεση ανίχνευση και
ταυτοποίηση

Θετική αιμοκαλλιέργεια

Positive Blood Culture



Gram Stain

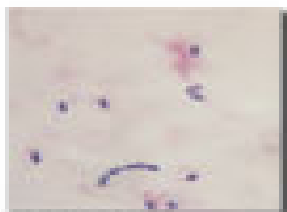


GPCC

S. aureus/CNS



PNA FISH™



GPCPC

E. faecalis/OE



PNA FISH™



Yeast

C. albicans/*C. glabrata*



PNA FISH™

✓ Στόχος rRNA

✓ Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (probes)

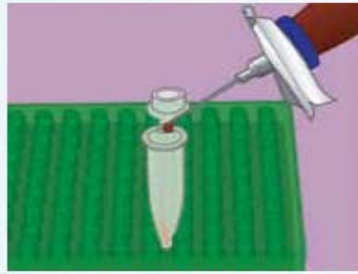
- μονής έλικας σημασμένα με fluorescein ή rhodamine
- ουδέτερης φόρτισης
- μικρό μέγεθος και υδροφοβικότητα → διέλευση μέσω κυτταρικής μεμβράνης → δεν απαιτείται κυτταρική λύση, ούτε απομόνωση γενετικού υλικού

▪ Μετά τον υβριδισμό, ανίχνευση με μικροσκόπιο φθορισμού.

Οδηγός Διαδικασίας

QuickFISH™ για Αιμοκαλλιέργειες

Προετοιμασία



Προσθέστε δείγμα σε ένα σωληνάριο.

Φιάλες Αιμοκαλλιεριγείων με Ρητίνες



Προσθέστε 10 ή περισσότερες σταγόνες δείγματος στο φιαλίδιο AdvanDx Filter Vial.

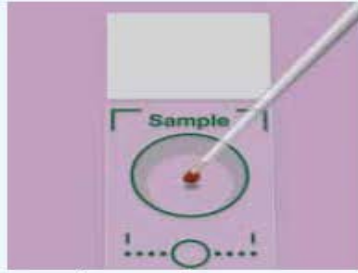


Εισάγετε το φίλτρο-έμβολο και πιέστε για να απομακρυνθούν οι ρητίνες. Αφαιρέστε το καπάκι για πρόσβαση στο δείγμα.

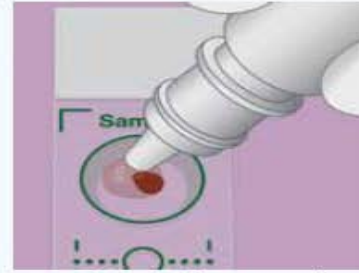


Τοποθετήστε το πλακάκι QuickFISH στους 55°C στην τράπεζα υβριδισμού. Διατηρήστε το στους 55°C σε όλη την διαδικασία.

Μονιμοποίηση



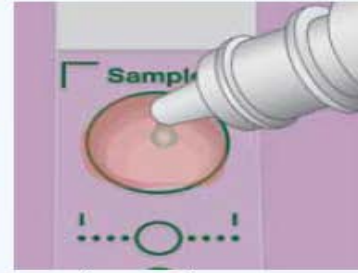
Προσθέστε με πιπέττα 10 µL δείγματος στην υποδοχή του δείγματος.



Προσθέστε 1 σταγόνα αντιδραστήριο QuickFIX-1.

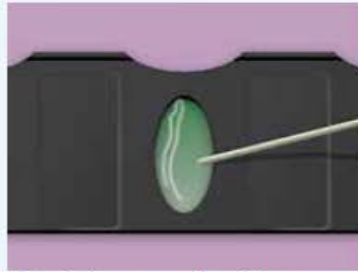


Αναμίξτε ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια και αφήστε να στεγνώσει τελείως (~1-3 λεπτά.).

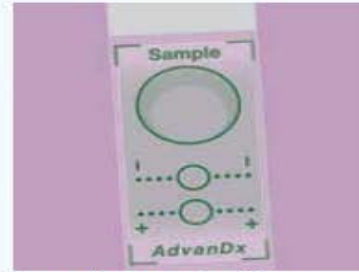


Προσθέστε 2 σταγόνες αντιδραστήριο QuickFIX-2 και αφήστε να στεγνώσει (~1 λεπτό.).*

Υβριδισμός



Τοποθετήστε την καλυπτρίδα στο πλαίσιο ανάμιξης. Προσθέστε 1 σταγόνα PNA Yellow και 1 σταγόνα PNA Blue στο κέντρο της. Αναμίξτε έως ένα ομοιόμορφο πράσινο χρώμα.



Αναστρέψτε την καλυπτρίδα και τοποθετήστε την στο πλακάκι QuickFISH στην τράπεζα υβριδισμού στους 55°C.



Υβριδίστε για 15 λεπτά στους 55°C.

Εξέταση



Εξετάστε σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας καταδυτικό φακό 60x ή 100x.



3 ώρες

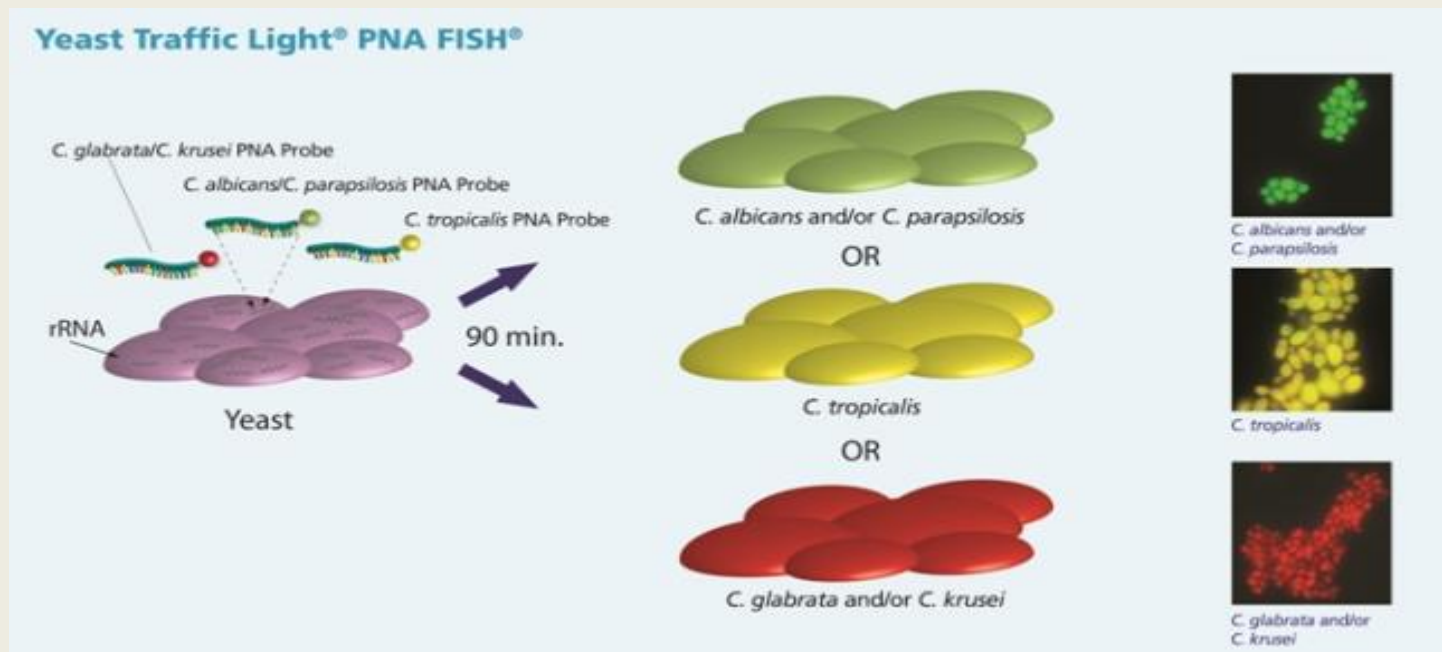
από Gram stain ως
PNA FISH αποτέλεσμα



QuickFISH testing platform
Μείωση χρόνου σε 30 min

PNA-FISH: χρησιμότητα εφαρμογής της

- Υψηλές ευαισθησία (98.7%) και ειδικότητα (99%)
- Γρήγορη ταυτοποίηση: μείωση θνητότητας, χρήσης αντιβιοτικών και παραμονής στο νοσοκομείο



Διάκριση ειδών *Candida*:

- ▶ σωστή αντιμυκητική αγωγή,
- ▶ μείωση θεραπευτικού κόστους

1. Gescher DM, et al. Int J Antimicrob Agents 2008;32 (Suppl 1):S51–S59; 2. Kudo M, et al. J Infect Chemother 2009;15:23–6. 3. Forrest GN, et al. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3558–63; 4. Forrest GN, et al. J Clin Microbiol 2006;44:3381–3; 5. Della-Latta, P. et al. Presented at: 18th ECCMID; Barcelona, Spain. 2008; 6. Ly T, et al. Ther Clin Risk Manag 2008;4:637–40; 7. Forrest GN, et al. J Antimicrob Chemother 2006;58:154–8; 8. Alexander BD, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54:277–82

Ποια η θέση των μη-καλλιεργητικών μεθοδολογιών στη ΔΚ;

Clinical Infectious Diseases

IDSA GUIDELINE



Infectious Diseases Society of America



hiv medicine association



OXFORD

Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America

Peter G. Pappas,¹ Carol A. Kauffman,² David R. Andes,³ Cornelius J. Clancy,⁴ Kieren A. Marr,⁵ Luis Ostrosky-Zeichner,⁶ Annette C. Reboli,⁷ Mindy G. Schuster,⁸ Jose A. Vazquez,⁹ Thomas J. Walsh,¹⁰ Theoklis E. Zaoutis,¹¹ and Jack D. Sobel¹²

- Ερμηνεία ειδικότητας δύσκολη όταν αρνητικοί μάρτυρες επίσης σε κίνδυνο για ΔΚ. **Άρα:**
 - θετικό αποτέλεσμα για μάρτυρες μπορεί ΨΘ ή ΑΘ (λόγω φτωχής ευαισθησίας των καλλιεργείων)
 - η ερμηνεία του αποτελέσματος πραγματική πρόκληση

How can test performance be accurately measured when the gold standard is inadequate?

Πως θα ενσωματωθούν οι μη καλλιεργητικές τεχνικές στην κλινική πρακτική;

“candidemia paradox”

- diagnostic studies of blood culture-positive invasive candidiasis commonly face a “candidemia paradox”, in which **non-culture tests appear inferior to a gold standard that is accepted to be suboptimal.**



Review

Invasive Candidiasis in Various Patient Populations: Incorporating Non-Culture Diagnostic Tests into Rational Management Strategies

Cornelius J. Clancy ^{1,2,*}, Ryan K. Shields ² and M. Hong Nguyen ^{2,*}

J. Fungi 2016, 2, 10

Μη-καλλιεργητικές μέθοδοι: πιθανότητα να έχει ή όχι ΔΚ

- No matter how sensitive or specific non-culture assays for invasive candidiasis may be, **clinicians must accept a level of uncertainty** when interpreting results.
 - By definition, **a positive blood culture or tissue culture obtained in a sterile manner** establishes the diagnosis of invasive candidiasis.
 - In contrast, **non-culture tests** are **Bayesian biomarkers** that assign a probability of disease, which is shaped by the pre-test likelihood, and sensitivity and specificity

Table 2. Performance of non-culture tests for invasive candidiasis in various populations.

Type of IC	Risk Category	Pre-Test Probability of IC *	Post-Test Probability of IC					
			β-D-Glucan **		PCR ***		Ideal Assay ****	
			Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Candidemia	Low	1%	4%	<1%	8%	<1%	48%	<1%
	Low-to-moderate	5%	17%	1%	32%	<1%	83%	<1%
	Moderate	10%	31%	3%	50%	1%	91%	1%
Intra-abdominal candidiasis	Low-to-moderate	5%	11%	3%	12%	1%	83%	<1%
	Moderate	10%	21%	6%	23%	3%	91%	1%
	High	30%	51%	22%	53%	11%	97%	4%

** β-D-Glucan: Sensitivity/specificity for candidemia 80%/80% and intra-abdominal candidiasis 60%/75%;

*** PCR: Sensitivity/specificity for candidemia 90%/90% and and intra-abdominal candidiasis 80%/70%;

**** Ideal Assay: Sensitivity/specificity for candidemia 90%/99% and intra-abdominal candidiasis 90%/99%.