

Diagnose invasieve schimmelinfecties



K. Lagrou
UZ/K.U.Leuven

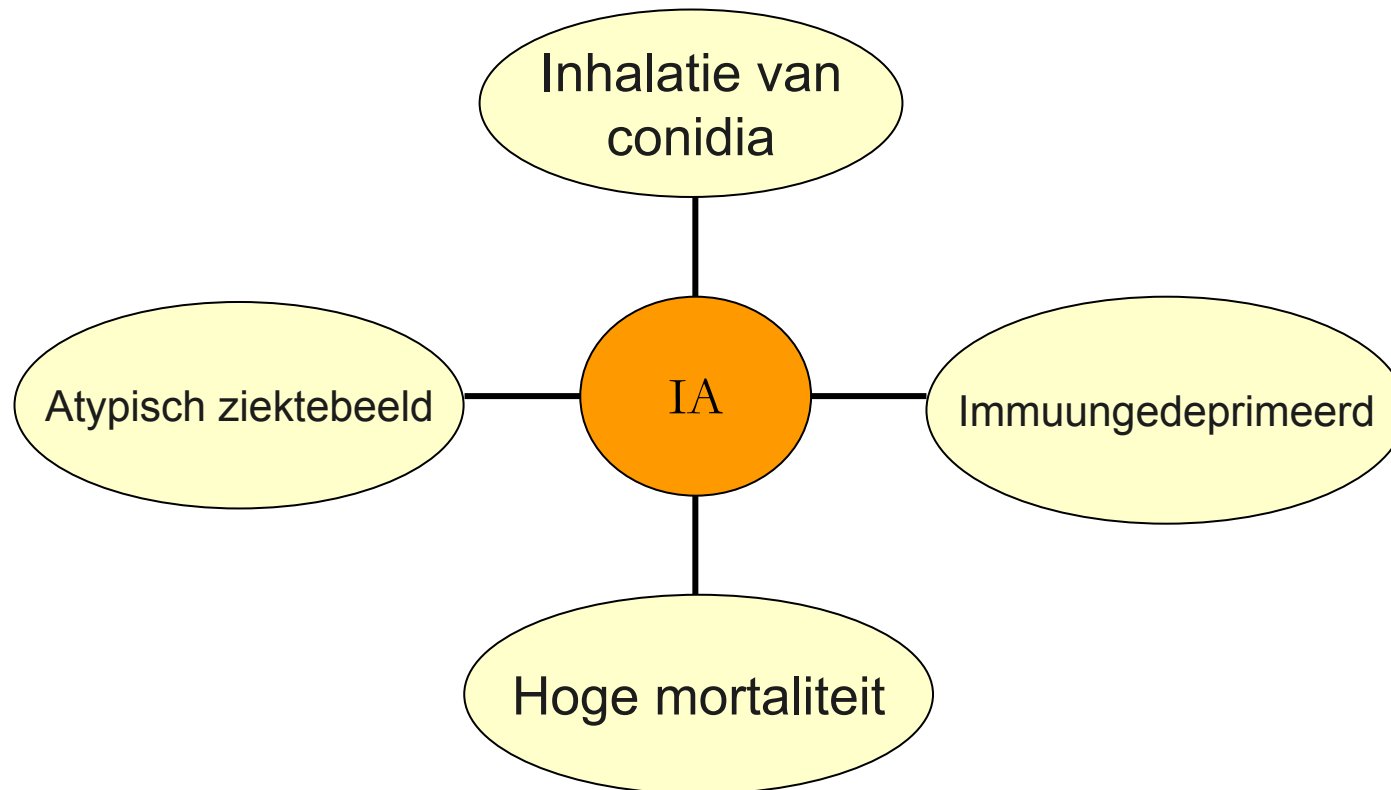


Aspergillus

- Wijd verspreide, opportunistische schimmel, oorzaak van allergische en invasieve syndromen
- Genus: 180 species, 33 geassocieerd met ziekte
- Belangrijkste : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* en *Aspergillus niger*



Pathogenese Aspergillus infectie





Veranderende epidemiologie aspergillosis

- Invasieve ziekte komt in toenemende mate voor in de niet-neutropene fase van hematopoïetische stamcel transplanten (HSCT), niet-klassieke settings zoals kritische zieke patiënten op ICU
- Toename van *Aspergillus* species andere dan *A. fumigatus*, sommige inherent resistent aan antifungale middelen



Internationale consensus definities voor invasieve schimmelinfectie

- European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis study group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (EORTC/MSG)
- Standaarddefinities van invasieve schimmelinfecties voor klinische en epidemiologische research
- 3 waarschijnlijkheids 'levels':
 - Proven
 - Probable
 - Possible

op basis van gastheerfactoren, klinische manifestaties en mycologische resultaten

S. Ascoglu et al., Clin Infect Dis, 2002, 34



Proven

- Histopathologisch onderzoek van naaldaspiraats of biopt toont de aanwezigheid van hyfen, evidentie van weefselschade

OF

- Positief kweek resultaat voor staal van een normaal steriele plaats (niet urine), klinische-radiologische afwijkingen consistent met infectie



Probable

- Minimum 1 gastheerfactor

EN

- 1 microbiologisch criterium +
1 majeur of 2 mineure klinische criteria



Possible

- Minimum 1 gastheerfactor

EN

- 1 microbiologisch criterium **OF**
1 majeur of 2 mineure klinische criteria



Gastheerfactoren

- Neutropenie (<500 neutrofielen/ mm^3) gedurende > 10 dagen
- Persisterende koorts (>96 uur) refractair aan breed spectrum antibiotica bij hoog risico patiënten
- Temperatuur $> 38^\circ\text{C}$ of $< 36^\circ\text{C}$ en één van volgende:
 - Langdurige neutropenie in de voorbije 60 dagen
 - Onder immunosuppressiva in de voorbije 30 dagen
 - Proven of probable invasieve schimmelinfectie in vorige neutropene fase
 - AIDS
- Langdurig gebruik van corticosteroiden (> 3 weken) gedurende de laatste 60 dagen



Microbiologische factoren

- Positieve kweek van sputum of BAL
- Positieve kweek of direct microscopisch onderzoek van sinusaspiraats
- Positief resultaat voor *Aspergillus* antigeen in BAL vocht, CSF of ≥ 2 bloedstalen



Klinische criteria

- Lage luchtweginfectie
 - Sinonasale infectie
 - CNS infectie
 - Gedissemineerde ziekte
- } mineure en majeure criteria



Impact IA bij patiënten zonder maligniteit in medische ICU

- Retrospectieve studie, gehospitaliseerde patiënten tussen 2000 en 2003 op MICU
- 127 patiënten /1850 opnamen (6.9%): microbiologische of histopathologische evidentie voor *Aspergillus*
- 89 (70%) casussen zonder hematologische maligniteit
 - Proven IA: 30, mortaliteit: 97%; 5 patiënten geen predisponerende factoren volgens EORTC-MSG definitie (lever cirrhosis)
 - Probable IA: 37, mortaliteit: 87%
 - Possible IA: 2
 - Kolonisatie: 20



DIAGNOSTIEK



Belang accurate diagnose

- Vroegere diagnose is geassocieerd met een verbeterde overleving van de patiënt

Therapie opgestart	<10 dagen	>11 dagen
Mortaliteit	40%	90%

Von Eiff et al., *Respiration*, 1995, 62.

- Test met hoge negatieve predictieve waarde kan therapie met dure en potentieel toxische antifungale middelen voorkomen



Belang accurate diagnose

- Nieuwe middelen met differentiële activiteit voor verschillende schimmels: toenemend belang van een specifieke diagnose van invasieve aspergillosis



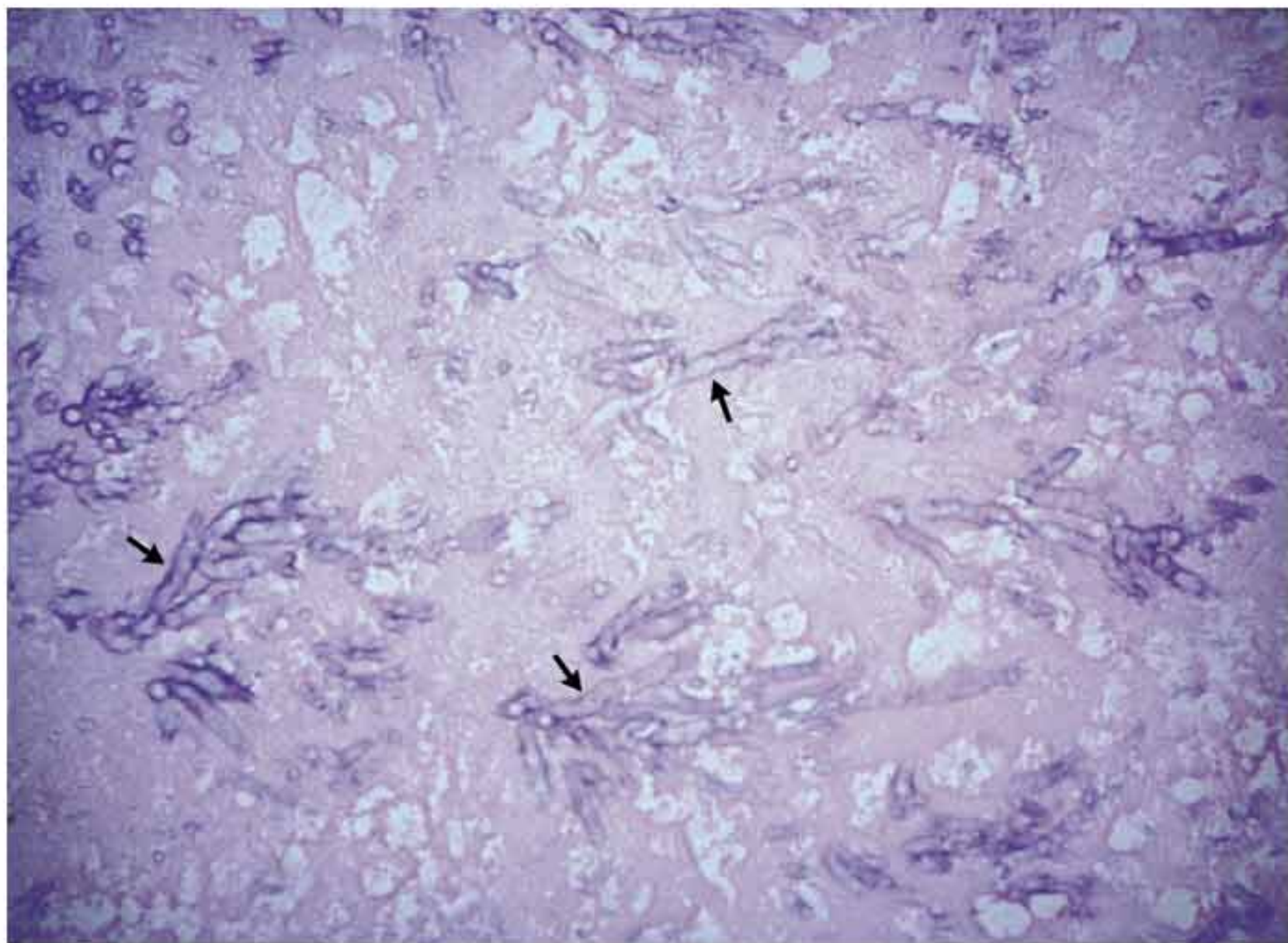
Toepassen van diagnostische modaliteiten

- Histopathologisch onderzoek en kweek op weefsel = referentie diagnostische standaard voor invasieve aspergillosis
- Echter:
 - diep weefsel staal dikwijls moeilijk te bekomen
 - analytische gevoeligheid van zowel histologie als kweek is relatief laag
 - hoge specificiteit bij combinatie van histologie en kweek



Rechtstreeks microscopisch onderzoek

- Voordelen op kweek
 - Hogere sensitiviteit
 - Relatieve snelle TAT
- Nadelen: geen definitieve identificatie





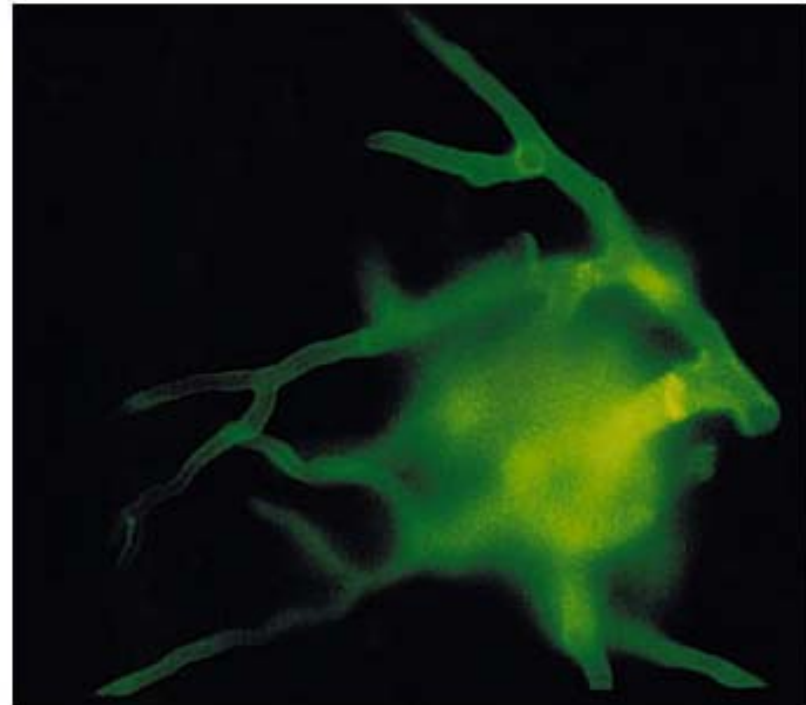
Rechtstreeks microscopisch onderzoek

- Voordelen op kweek
 - Hogere sensitiviteit
 - Relatieve snelle TAT
- Nadelen: geen definitieve identificatie
- Stalen bekijken:
 - Wet mount +/- KOH 10%
 - Schimmelkleuringen
 - Gomori's methenamine zilver kleuring (Grocott kleuring) en periodic acid-Schiff (PAS): histologische coupes en uitstrijkjes

Rechtstreeks microscopisch onderzoek

- Fluorescerende kleurstoffen oa. Calcofluor white: wateroplosbare kleurstoffen die selectief binden aan chitine binnen de fungale celwand

- Relatief sensitief
- Snelle TAT
- Brede toepasbaarheid



Kweek

- Voordeel: Species identificatie
- Nadeel: traag en relatief ongevoelig, expertise noodzakelijk voor species identificatie
 - Goede groei op routine gebruikte media
 - Betere opbrengst op Sabouaud dextrose agar
 - *Aspergillus spp* wordt slechts in 30-50% van de gevallen met positieve histologie geïsoleerd uit weefsel





Surrogaat merkers

- In afwezigheid van weefselstaal \Rightarrow stalen van een aangrenzende niet steriele site: surrogaat voor diagnose van invasieve aspergillosis
 - IPA: bovenste en onderste respiratoire tractus: shedding van hyfen en gerelateerde serologische en moleculaire markers door geïnficeerd parenchym
 - Shedding relatief laat in natuurlijk ziekteproces \leftrightarrow vroegtijdige diagnose



Microscopie/kweek BAL vocht

- Noodzaak competent bronchoscopist
- Sensitiviteit (kweek en microscopie) in de orde van 50%, beïnvloed door:
 - variaties in BAL techniek
 - locatie, grootte en type van longletsels
 - timing van de bronchoscope
 - impact therapie?
- Waarschijnlijkheid onderliggende invasieve IPA bij isolatie van *Aspergillus spp* uit de respiratoire tractus
 - bij ernstig immuungecompromitteerden = heel hoog
 - voor andere patiëntengroepen: enorme variatie in waarschijnlijkheid

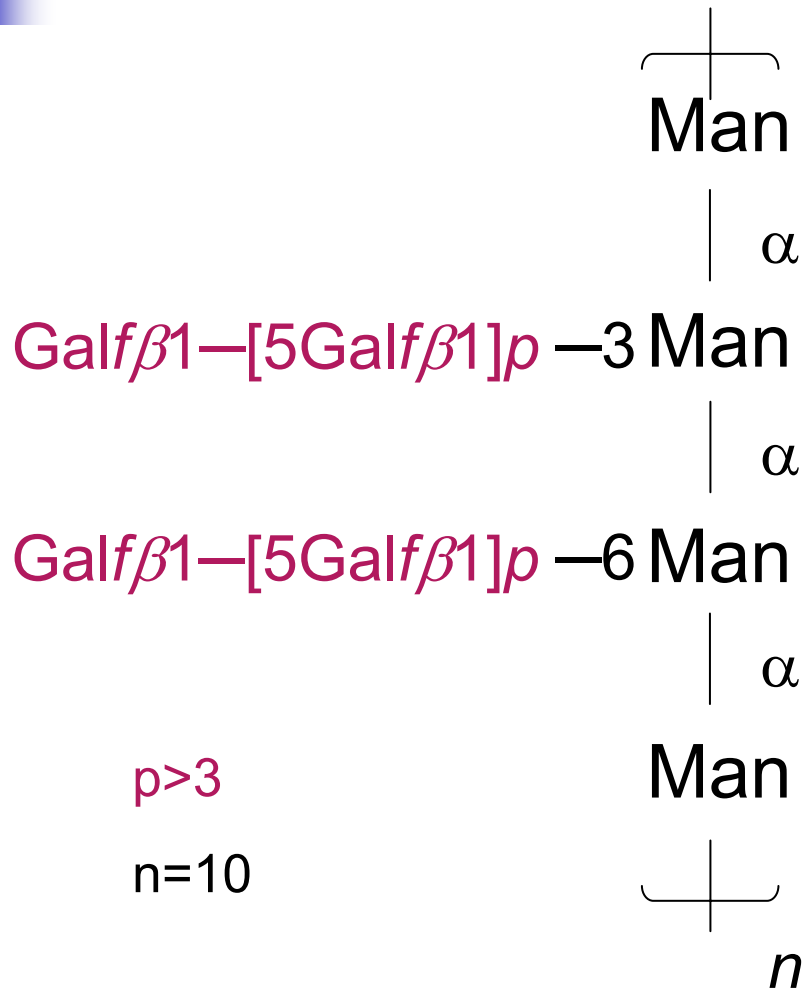


Serologische technieken

- Galactomannan detectie
- (1-3)- β -D-glucan detectie



Galactomannan



hitte stabiel hetero-
polysaccharide
aanwezig in de
celwand van meeste
Aspergillus en
Penicillium species,
release tijdens groei

n



Galactomannan detectie

- Commerciële kit: Platelia[®] Sandwich ELISA (BioRad), beschikbaar in Europa voor ongeveer 10 jaar, ook FDA goedgekeurd
- Rat monoclonale antistoffen EB-A2 tegen de $\beta(1-5)$ -gelinkte galactofuranoside zijketens; ≥ 4 epitopen zijn noodzakelijk voor binding aan antilichaam
- Detectielimiet sandwich ELSIA = 1 ng/L (latex agglutinatie 15 ng/L)



Galactomannan detectie

- Determinanten van de analytische sensitiviteit:
 - Gesecreteerde antigenen met minder dan 4 galactofuranoside epitopen: geen detectie
 - Voorbehandelingsstap: doel verwijderen van complexerende antistoffen die EB-A2 binding kunnen blokkeren
- Lange termijn precisie gegevens in huis: doelwaarde ratio: 0.59 (6 maanden, 77 bepalingen): CV= 16,3%



Performantie galactomannan detectie

- Prospectieve klinische validatie studies bij hematologische patiënten: variabele performantie
 - Detectie van circulerend antigeen gemiddeld 8 dagen voordat diagnose op andere basis kon gesteld worden in 2/3 van de patiënten

J. Maertens et al., J Infect Dis 2002, 186.
 - ⇒ Prospectieve monitoring van patiënten gedurende hoge risico periode, galactomannan positief: diagnostische work-up en pre-emptieve therapie



Preemptieve therapie

Galactomannan en CT-gebaseerde preemptieve antifungale therapie bij neutropene patiënten met een hoog risico voor een invasieve schimmelinfectie

- 136 behandelingsepisodes
- Dagelijkse screening voor galactomannan
- CT-scan + BAL op basis van goed-gedefinieerde klinische, radiologische en microbiologische criteria
- Enkel therapie indien galactomannan ratio $2 \times \geq 0.5$ of CT suggestief voor invasieve schimmelinfectie + positieve microscopie/kweek BAL



Preemptieve therapie

- Neutropene koorts in 117 episodes
 - Minimum 41 episodes (35%) voldeden aan criteria voor opstarten van empirische therapie
 - Slechts 9/41 episodes werden preemptief behandeld (7.7%)
 - Vroege antifungale therapie werd ingesteld in 10 episodes die klinisch niet verdacht waren voor een invasieve schimmelinfectie
 - 12-week survival rate (liposomaal amfo B) = 63,6%

J. Maertens et al., CID, 2005, 41.



Performantie galactomannan detectie

- Prospectieve klinische validatie studies bij hematologische patiënten: variabele performantie

- Detectie van circulerend antigeen gemiddeld 8 dagen voordat diagnose op andere basis kon gesteld worden in 2/3 van de patiënten

J. Maertens et al., J Infect Dis 2002, 186.

⇒ Prospectieve monitoring van patiënten gedurende hoge risico periode, galactomannan positief: diagnostische work-up en pre-emptieve therapie

- Sensitiviteit: 29%-100%

Mennink-Kersten et al., The Lancet Infectious Diseases, 2004, 4.



Factoren die performantie galactomannan detectie beïnvloeden

- biologische factoren
- epidemiologische factoren



Biologische factoren

- Infectieplaats (micro-omgeving)
- Aspergillus species
- Expositie aan antifungale middelen!
 - Sensitiviteit 16.7%-20%: mold actieve (profylactische) therapie
 - Sensitiviteit 80%-87.5%: geen mold actieve therapie

Marr KA et al., J Infect Dis 2004, 190

- Aanwezigheid van anti-Aspergillus antistoffen
- Onderliggende ziekte
- Staalbewaring, voorbehandelingprocedure



Epidemiologische factoren

- Specifieke patiënt populatie
 - Angioinvasieve groei van *Aspergillus* vereist om galactomannan te detecteren in bloedbaan of vrije diffusie over endotheelcellaag van pulmonaire capillairen?
 - Gevoeligheid antigendetectie is het hoogst bij de meest immuungecompromitteerde patiënten, allogene HSCT
 - Invasieve aspergillosis is niet één ziekte-entiteit maar een spectrum van verschillende ziekte manifestaties
- Sampling strategie
- Prevalentie infectie
- Laboratoriumervaring



Epidemiologische factoren

- Interpretatieve cut-off/definitie positief resultaat
 - Prospectieve klinische validatie van lagere cut-off waarden voor volwassen neutropene kankerpatiënten en HSCT (124 neutropene episodes)

OD index cut-off	0,8	0,7	2 × ≥ 0,5
Sensitiviteit (%)	96,5	96,5	96,5
Specificiteit (%)	97,3	93,2	98,6
PPV (%)	93,3	84,8	98,6
NPV(%)	98,6	98,6	98,4



Vals positieve resultaten

- Specificiteit meestal > 90%
- IV therapie met:
 - Piperacilline-tazobactam
 - Amoxicilline clavulaanzuur
- Systematisch bij neonaten
 - Lipoteichoïnezuur van *Bifidobacterium bifidum* subsp pennsylvanicum bevat een terminaal lineair polysaccharide van > 7 β (1-5)-gelinkte galactofuranoside zijketens
- Cross-reaktiviteit *in vitro* met *Penicillium spp.* en *Paecilomyces spp.*
- Voedsel gecontamineerd met *Aspergillus* of galactomannan in circulatie bij patiënten met dysfunctie van de intestinale mucosale barrière: pasgeborenen-cytostatica



Galactomannan

- Details betreffende de release en kinetiek van circulerend galactomannan blijven grotendeels ongedefinieerd
- Stijging van negatief naar positief verloopt klassiek over twee tot drie dagen
- Galactomannan productie is proportioneel met fungale lading in weefsel
- Galactomannan spiegels hebben prognostische waarde
- Weinig validatiestudies bij kritisch zieke patiënten zonder hematologische maligniteit



Prospectieve studie diagnose invasieve aspergillosis bij kritisch zieke patiënten

- Een prospectieve validatie van de beschikbare diagnostische mogelijkheden in een brede groep van risicopatiënten (patiënten met hematologische maligniteit ↔ vaste orgaantransplanten, cirrhosis patiënten, patiënten met auto-immune aandoeningen, patiënten onder steroiden en COPD)
- Klinische, radiologische en biochemische afwijkingen
- Kweek BAL vocht
- Galactomannan in serum en BAL vocht



(1-3)- β -D-glucan detectie

- Celwand polysaccharide specifiek voor fungi, uitz. Zygomycetes en Cryptococcus
- Verschillende commerciële kits beschikbaar: Glucatell, Fungitec-G glucan detection test, Wako test
- Ervaring vooral in Japan



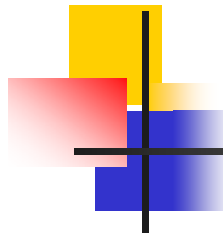
(1-3)- β -D-glucan detectie

- Vergelijking met galactomannan bij neutropene volwassenen, GlucateLL kit
 - Retrospectief
 - 40 behandelingsepisodes/patiënten: 5 proven, 3 probable en 3 possible invasieve Aspergillosis
 - Performantie galactomannan en (1-3)- β -D-glucan detectie identiek: sensitiviteit = 87,5%, specificiteit = 89,6%, PPW = 70% en NPW = 96,3%
 - Vals positieve resultaten voor beide testen \pm 10%, maar verschillende patiënten
 - Combinatie van beide testen: specificiteit = 100%



Nucleïnezuurtesten

PCR



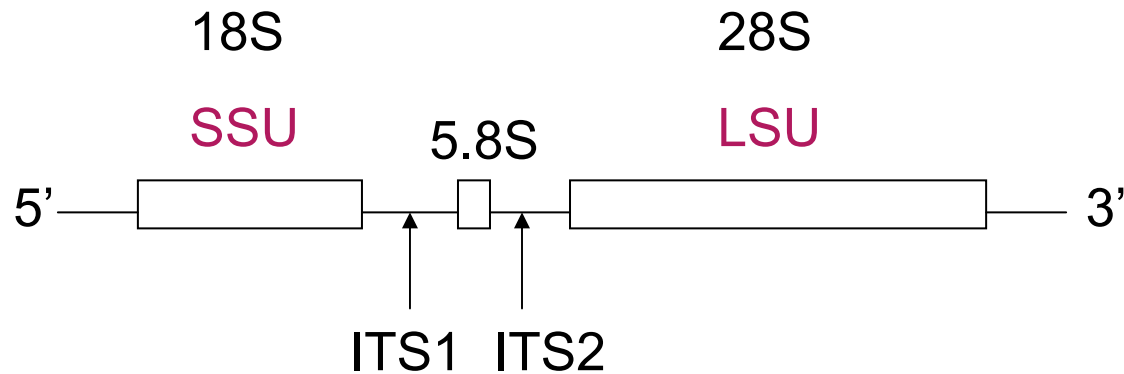
PCR

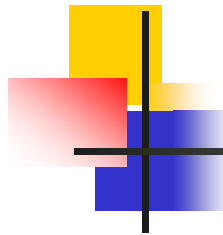
- Gebrek aan standaardisatie belet algemene toepassing van PCR voor de diagnose van invasieve *Aspergillosis*
- Staal
 - Optimale bloedfractie voor testing: niet gekend
 - BAL en weefsel
- Extractie: efficiëntie, automatiseerbaarheid, contaminatie..., fungale celwand belangrijke belemmering voor extractie DNA
- Target: meestal ribosomaal DNA complex, multicopy gene (*A. fumigatus*: 35 repeterende eenheden)



Meest gebruikte target PCR

Ribosomaal DNA complex





PCR

- Amplificatie
 - Nested PCR
 - Real-time: automatiseerbaar, snel en reproduceerbaar → vergelijking tussen studies eenvoudiger
- Analytische sensitiviteit: seriële dilutie van infectieus agens in niet-infectieus klinisch materiaal als diluent: echter accurate dilutie van hyfen niet mogelijk!
 - Dilutie van conidiën: echter hyfen invasieve vorm
 - Dilutie van DNA: extractie-efficiëntie niet geïncorporeerd
 - Meeste studies: detectielimiet: 1-10 fg DNA



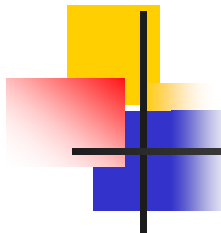
PCR: weefsel

- Histologie en kweek: referentie standaard, echter beperkte gevoeligheid
- Experimentele modellen: gevalideerde PCR is meer sensitief dan kweek voor de detectie van *Aspergillus spp* in weefsel, vooral wanneer er substantiële necrose is
 - ⇒ Mogelijkheid om positief PCR resultaat te accepteren als referentiestandaard?
- Testvalidatie: uitermate belangrijk



PCR: bloed

- Frequente staalnames zijn noodzakelijk: DNA meestal maar in een minderheid van de stalen van patiënten met IA gedetecteerd:
 - Release en circulatie van fungaal DNA is variabel OF
 - Concentratie van fungaal DNA is in de buurt van de detectielimiet
- Timing van bloedname is nog onduidelijk, sensitiviteit daalt significant onder antifungale therapie



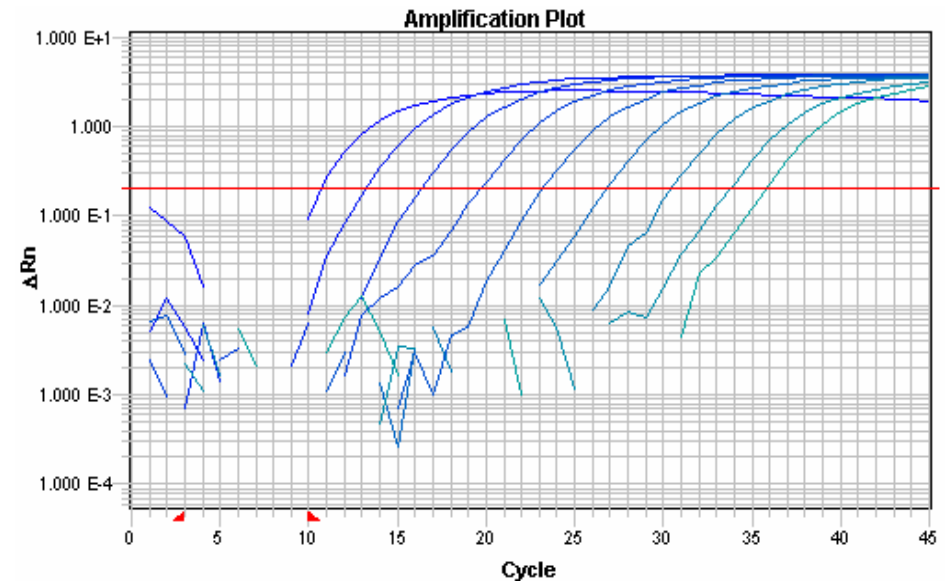
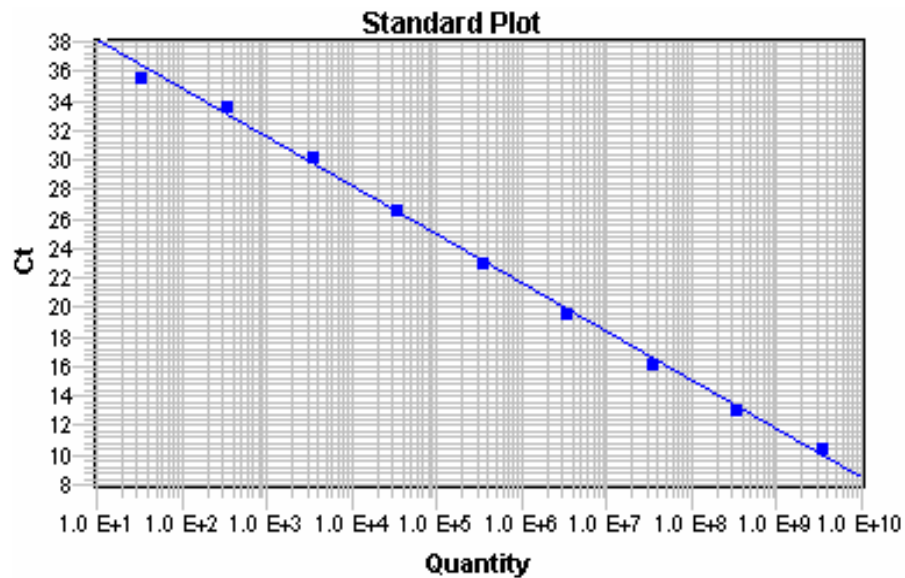
PCR

- ‘Vals positieve stalen’
 - Contaminatie
 - Detectie van echte DNAemie bij patiënte met subklinische aspergillus infectie
 - Interpretatie PCR van positieve galactomannan of bij patiënt met risico op invasieve aspergillosis maar zonder daaropvolgend evidentie voor invasieve ziekte blijft onduidelijk
 - Meest conservatieve benadering: éénmalig positieve resultaten = vals positief
 - Kan echter ook invasieve ziekte reflecteren die niet-progressief is

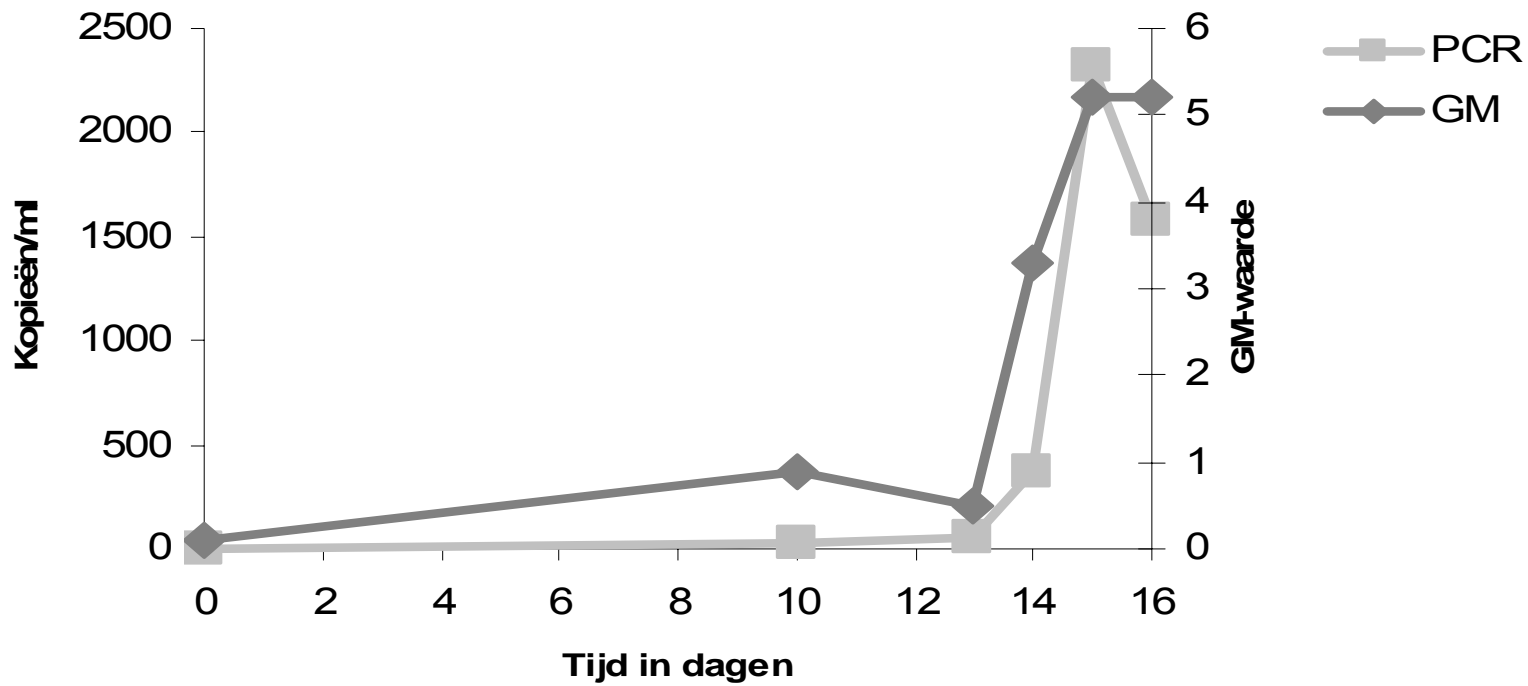
A. fumigatus specifieke TaqMan real-time PCR

Target: 67 bp DNA fragment, codeert voor 28S rRNA

STANDAARDCURVE



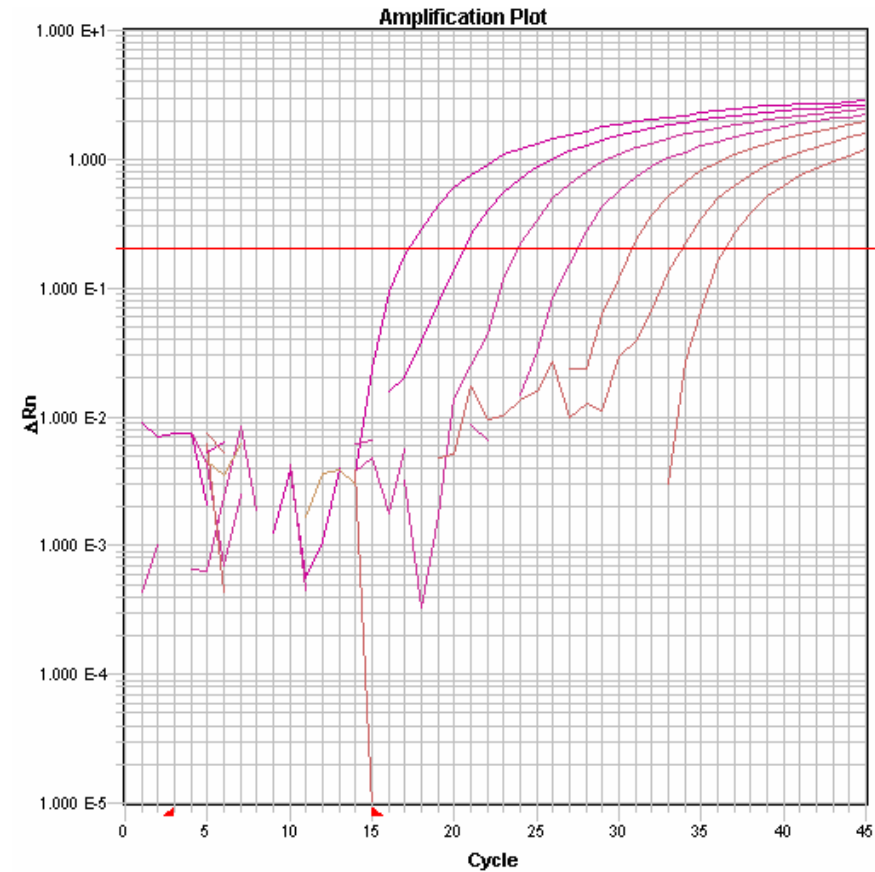
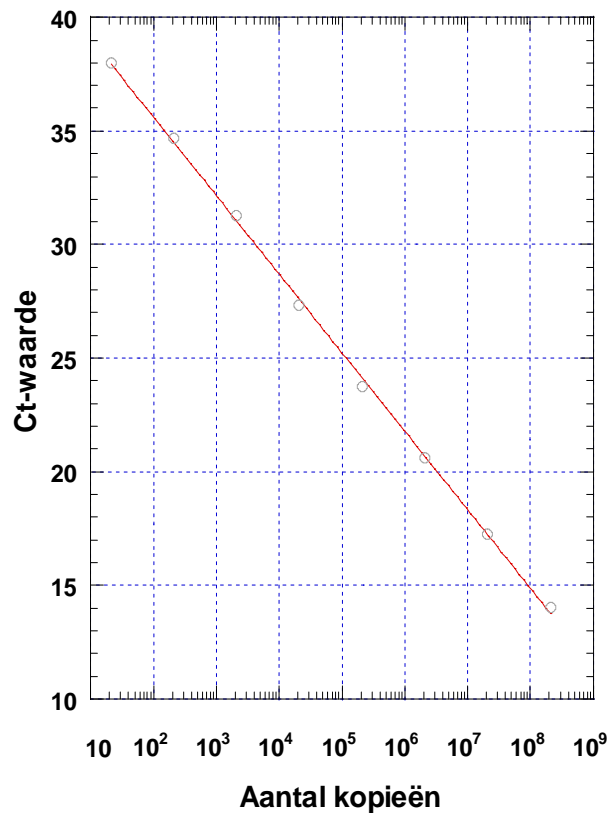
Evolutie DNA/galactomannan bij patiënt met invasieve Aspergillosis

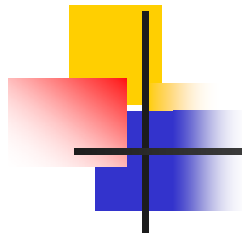


Panfungale TaqMan real-time PCR

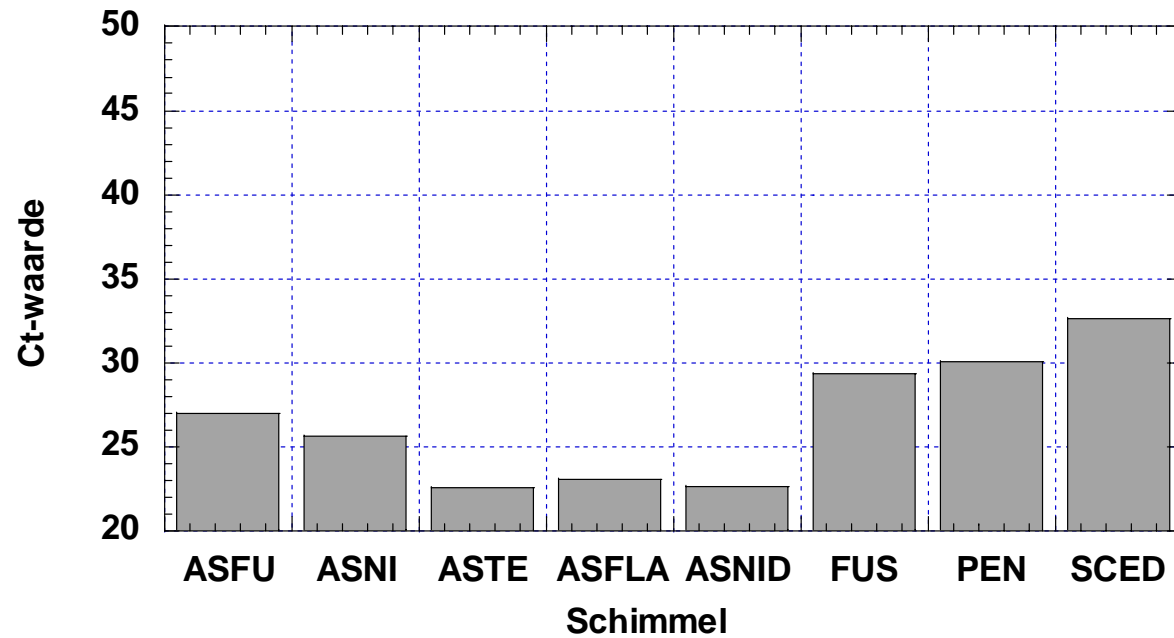
Target: 142 bp DNA fragment, codeert voor 5.8S rRNA

STANDAARDCURVE

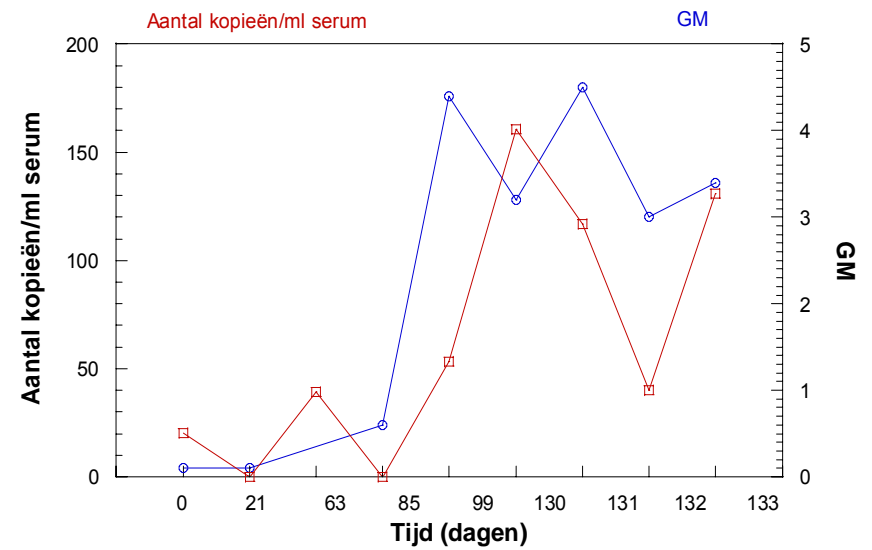
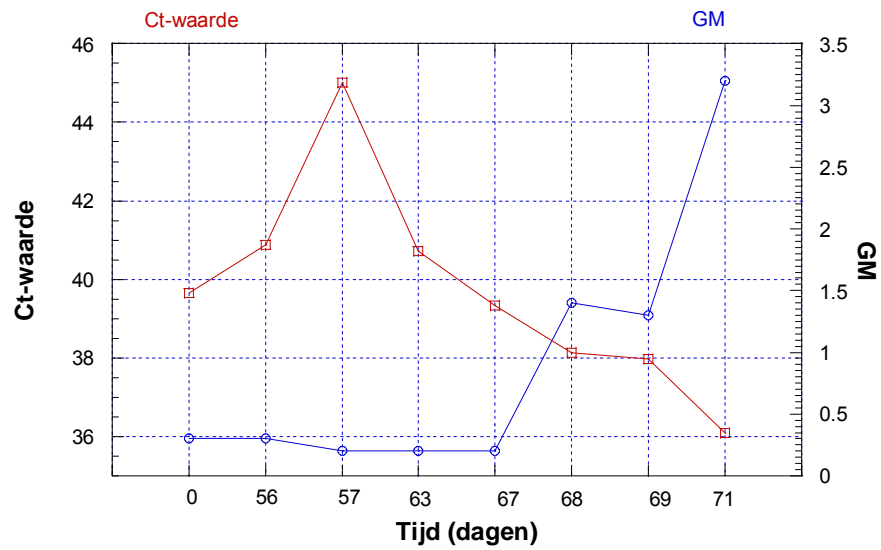


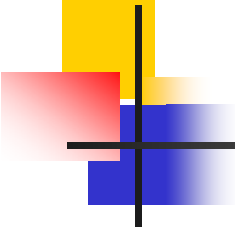


Evaluatie panfungaal karakter



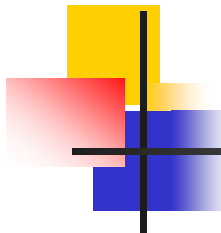
Evolutie DNA/galactomannan





Commerciële PCRs: in ontwikkeling...

- LightCycler Test voor detectie van pathogenen bij sepsis (Roche)
- Ontwikkeling van speciale reagentia en wegwerpmateriaal omwille van 'contaminatie' van standaard reagentia en plastic met bacterieel en fungaal DNA (in heel kleine hoeveelheden)
- Detectie van Gram-, Gram+ bacteriën + 5 *Candida species* + *A. fumigatus*



PCR

- Data dat zowel PCR als galactomannan detectie tot een vroegere specifieke diagnose kunnen leiden dan met de conventionele aanpak
- Combinatie van verschillende diagnostische modaliteiten is een strategie die de diagnostische accuraatheid kan optimaliseren
- Zowel PCR als galactomannan kunnen belangrijke prognostische info leveren: dalende galactomannan titer of negatief worden van PCR signaal onder antifungale therapie is meestal geassocieerd met een succesvolle outcome



Diagnose van invasieve aspergillosis: uitdagingen

- Verbeteren van de test accuraatheid is een prioriteit
- Kost-effectiviteitsstudies nodig
- Bepalen van economisch efficiënte teststrategie: welke test eerst, welke winst door toevoegen van tweede, derde test...
- Echter in vergelijking met behandelingskosten zijn de kosten van diagnostische testen relatief laag

Hope et al., The Lancet, 2005, 5.