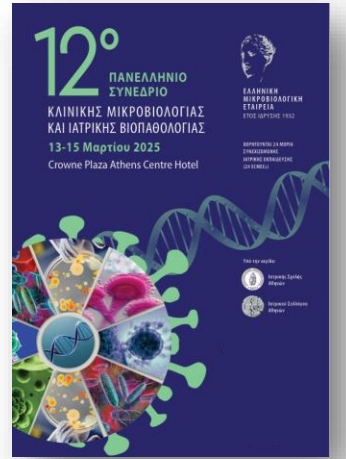




Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ιατρική Σχολή
Εργαστήριο Μικροβιολογίας



Επίκαιρα θέματα επιπολής και συστηματικών μυκητιάσεων: από τη θεωρία στην πρακτική εφαρμογή
(επίδειξη μακρο- και μικροσκοπικής εικόνας καλλιεργημένων μυκήτων)

**Συστηματικές μυκητιάσεις:
μη καλλιεργητικές τεχνικές και η σημασία των POC tests**

Μαρία Μαυρούλη
Βιολόγος, MSc, MSc, PhD

Δήλωση μη σύγκρουσης συμφερόντων

Η παρούσα εισήγηση δεν τελεί υπό καμία σύγκρουση συμφερόντων.

Μυκητιακές λοιμώξεις

Η επιδημιολογία των μυκητιακών λοιμώξεων έχει αλλάξει τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της αύξησης του πληθυσμού των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών (καρκινοπαθείς, λευχαιμικοί, μεταμοσχευμένοι και HIV-θετικοί ασθενείς)

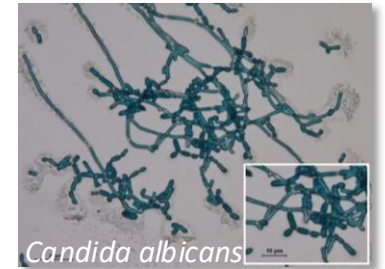
Καλύτερη αντιμετώπιση υποκείμενης νόσου
+ χρήση βελτιωμένων και περισσότερο επιθετικών θεραπειών
(χημειοθεραπεία, ακτινοβολίες, κορτικοειδή, παρεντερική διατροφή, ενδοφλέβιοι καθετήρες και ευρέως φάσματος αντιβιοτικά)



Παράταση επιβίωσης + υψηλός κίνδυνος λοίμωξης από ευκαιριακούς μύκητες

- Σακχαρώδης διαβήτης
- Εγκαύματα
- Εκτεταμένες βλάβες δέρματος και βλεννογόννων
- Βαριές καρδιαγγειακές και ενδοκοιλιακές επεμβάσεις

Αυξημένη συχνότητα
μυκητιασικών
λοιμώξεων



Διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων

Οι διεισδυτικές μυκητιάσεις συνοδεύονται από **αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα**, εξαιτίας της καθυστερημένης διάγνωσης και θεραπείας.

🚫 στην έγκαιρη διάγνωση:

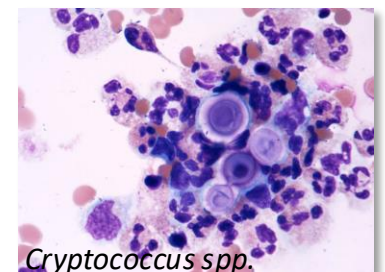
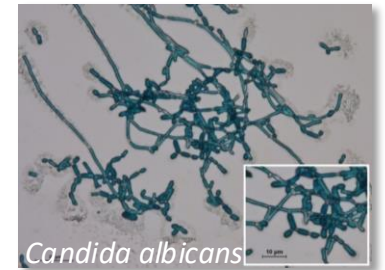
Μη τυπικά συμπτώματα και τα κλινικά σημεία κατά την αρχική φάση των μυκητιασικών λοιμώξεων (ανοσοκαταστολή και υποκείμενα νοσήματα των ασθενών)

🚫 στην επιτυχή θεραπεία:

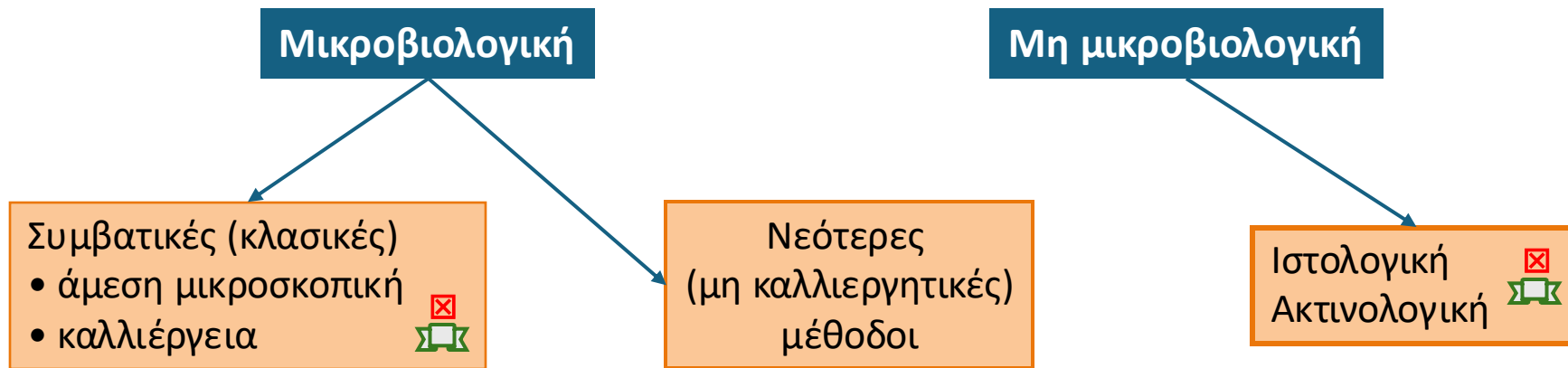
Έλλειψη ευαίσθητων και ειδικών διαγνωστικών μεθόδων → η ορθή διάγνωση των διεισδυτικών μυκητιακών λοιμώξεων τίθεται συχνά post mortem.



Η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για την **πρώιμη έναρξη της κατάλληλης αντιμυκητιακής αγωγής** και κατ'επέκταση την τελική έκβαση της νόσου



Διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων



⊗ Οι καλλιέργειες συχνά είναι αρνητικές ή απαιτούν μεγάλο χρονικό διάστημα για να θετικοποιηθούν και, αν συμβεί αυτό, συχνά δε μπορεί να διευκρινιστεί αν οφείλεται σε αποικισμό ή λοίμωξη.

⊗ Για τη διάγνωση διεισδυτικής μυκητίασης απαιτείται ιστολογική επιβεβαίωση ή καλλιέργεια θετική από φυσιολογικά στείρα περιοχή. Συχνά, όμως, η λήψη υλικού βιοψίας ή μετά από παρακέντηση είναι προβληματική λόγω υποκείμενης νόσου.

⊗ Ακτινολογικός έλεγχος: οι βλάβες πρέπει να είναι ορατές μακροσκοπικά (φτωχή πρόγνωση)

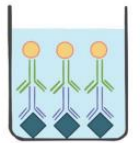
ΣΤ: gold standard μέθοδοι ⊗: περιορισμένη αξία στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς



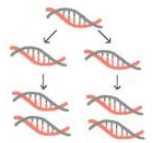
Microscopy



Culture



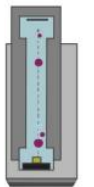
Serological test



PCR

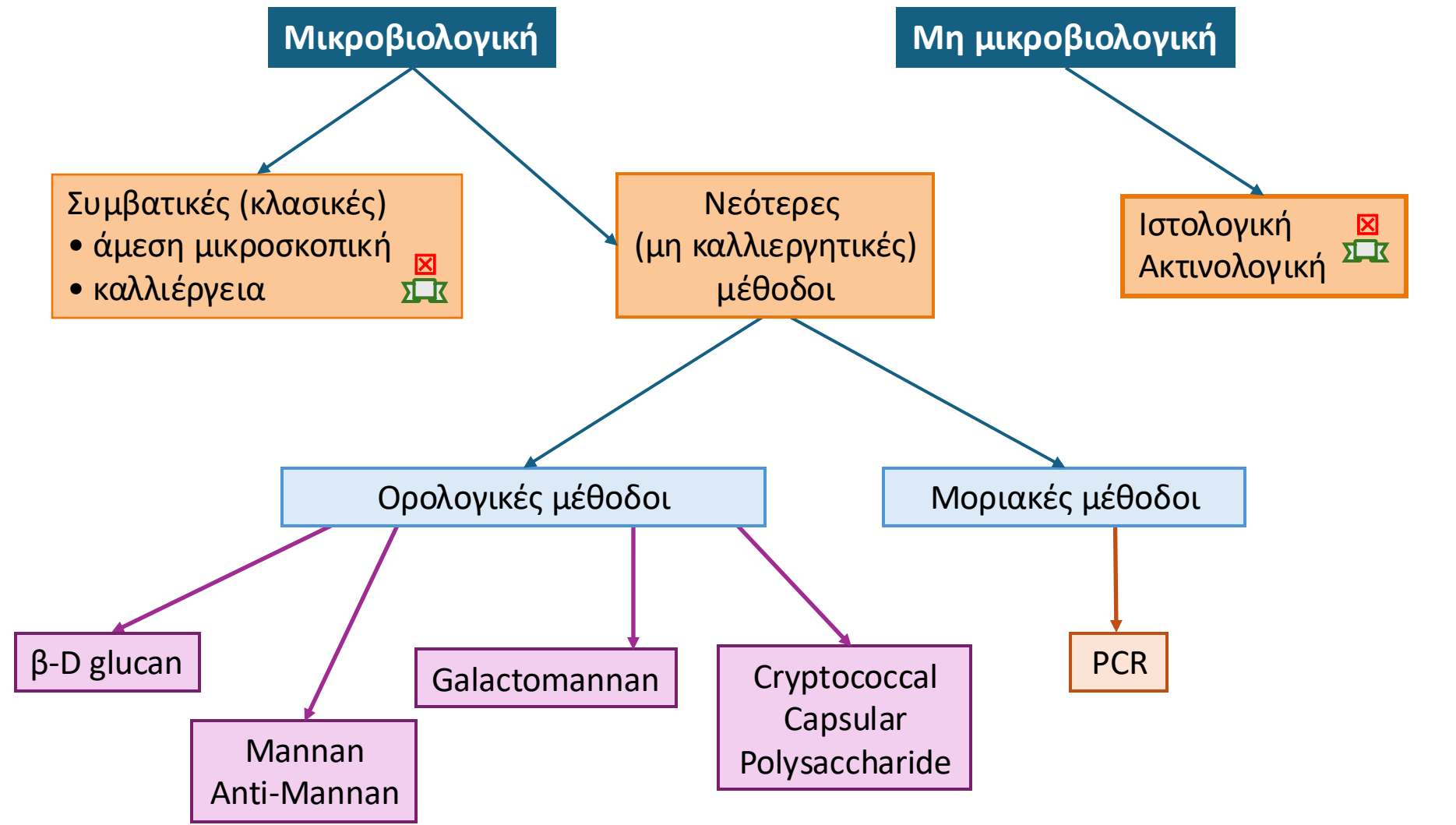


Sequencing

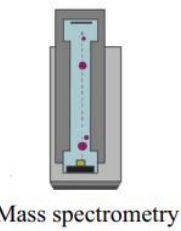
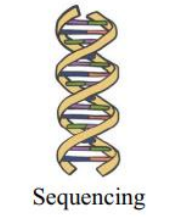
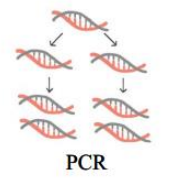
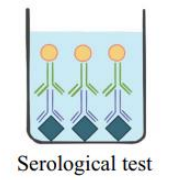
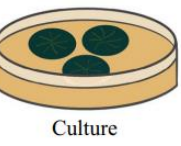


Mass spectrometry

Διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων



: gold standard μέθοδοι : περιορισμένη αξία στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς



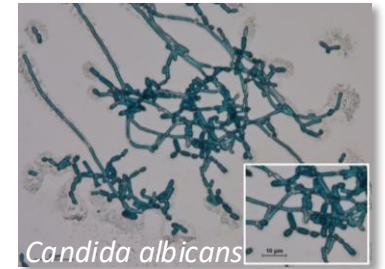
Μύκητες που προκαλούν συστηματικές μυκητιάσεις

• Ζυμομύκητες

- ▶ *Candida*
- ▶ *Cryptococcus*
- ▶ *Trichosporon*
- ▶ *Rhodotorula*
- ▶ *Saccharomyces*
- ▶ *Malassezia*
- ▶ *Pneumocystis*

• Υφομύκητες

- ▶ *Aspergillus*
- ▶ Mucorales (Zygomycetes)
- ▶ Hyaline hyphomycetes
 - *Fusarium*
 - *Scedosporium*
 - *Acremonium*
- ▶ Dematiaceous hyphomycetes
 - *Alternaria*
 - *Bipolaris*



Τα πιο συχνά παθογόνα: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* και *Pneumocystis*

↪ υπεύθυνα για >90% των θανάτων από μυκητιακή λοίμωξη

Ορολογικοί διαγνωστικοί δείκτες

Είδος μύκητα	Αντιγόνο, αντίσωμα, ένζυμο, μεταβολίτης	Κλινικό δείγμα
<i>C. neoformans</i>	Γλυκουρονοξυλομαννάνη*	ΕΝΥ, ορός
<i>Aspergillus</i>	Γαλακτομαννάνη*	Ορός, BAL (ΕΝΥ, ούρα)
<i>Candida</i>	Μαννάνη, αντι-μαννάνη*	Ορός, ΕΝΥ
<i>Candida</i>	Ενολάση	Ορός
<i>Candida</i>	Αντι-ενολάση & αντισώματα έναντι άλλων ενδοκυττάρων αντιγόνων	Ορός
<i>Candida</i>	D-αραβινιτόλη	Ορός
Μύκητες άλλοι εκτός μουκορμυκήτων και <i>C. neoformans</i>	(1,3)-β-D-γλυκάνη*	Πλάσμα, ορός

* Χρησιμοποιείται στη ρουτίνα

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

Στα κριτήρια EORTC/MSG

► συμπεριλαμβάνονται:

- ♦ Γλυκουρονοξυλομαννάνη (CrAg)
(κρυπτοκόκκωση)
- ♦ Γαλακτομαννάνη (GM)
(διεισδυτική ασπεργίλλωση-IA)
- ♦ (1,3)-β-D-γλυκάνη (BDG)
(διεισδυτική καντιντίαση-IC και IA)

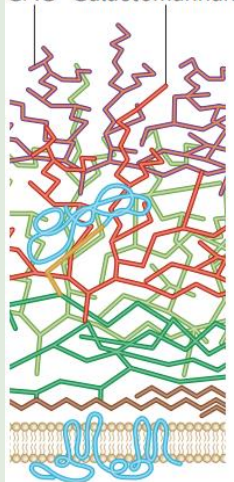
► δεν συμπεριλαμβάνονται

- ♦ Μαννάνη (Mn) και αντι-μαννάνη (A-Mn)
(διεισδυτική καντιντίαση-IC)

Γαλακτομαννάνη (Galactomannan, GM)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
<p>Εμπορικά διαθέσιμα κιτ</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bio-Rad GM-EIA™ ▪ Immy GM-EIA™ ▪ Euroimmun™ GM EIA ▪ Virclia® Monotest Aspergillus GM Ag 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Ανίχνευση GM σε ορό και BAL ▶ Πρώιμη διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης (IA) σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (screening test) που <u>δεν λαμβάνουν αντιμυκητιακή αγωγή</u> ▶ Κριτήρια EORT/MSG (θετική GM ΣΕ συνδυασμό με παράγοτες του ξενιστή και κλινικά κριτήρια), συστάσεις: <ul style="list-style-type: none"> • 2 οροί / εβδομάδα: cut-off > 0.5 • 1 ορός θετικός, cut-off > 0.7 • BAL (target diagnostic test): cut-off ≥ 1 ▶ Παρακολούθηση επιπέδων GM 2 φορές την εβδομάδα σε παιδιατρικό πληθυσμό υψηλού κινδύνου ▶ Ούρα: GM/Cr ▶ EORTC/MSG: ίδια cut-off σε ενήλικες και παιδιά 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Ορός cut-off > 0.5 (ευαισθησία: 56-89%, ειδικότητα: 67-99%) ▶ Ισχυρή σύσταση για GM ορού σε <u>αιματολογικούς ασθενείς με πνευμονικές διηθήσεις</u> ▶ Συνεχόμενα αποτελέσματα με cut-off ≥ 1.4 \Rightarrow θεραπευτική αποτυχία (θνητότητα 48% σε αιματολογικούς ασθενείς) ▶ BAL cut-off > 1.0 (ευαισθησία 88%, ειδικότητα 81%) ▶ GM στο BAL: καλύτερη διαγνωστική απόδοση σε σχέση με τον ορό σε ασθενείς που λαμβάνουν προφυλακτική αντιμυκητιακή αγωγή ▶ \uparrow ευαισθησίας σε επαναλαμβανόμενα τεστ ▶ GM στο ENY cut-off > 1.0 (Χρήσιμη, όχι τυποποιημένη και επικαιροποιημένη) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Φτωχή παραγωγή GM σε μερικά είδη Aspergillus ▶ Διασταυρούμενες αντιδράσεις με Fusarium, Paecilomyces, Trichoderma, Histoplasma and Penicillium species ▶ \downarrow προγνωστική αξία σε <u>μη ουδετεροπενικούς ασθενείς</u> ▶ <u>Λήψη αντιμυκητιακής αγωγής</u> (ιτρακοναζόλη) ελαττώνει ευαισθησία και ειδικότητα ιδίως στον ορό ▶ Ψευδώς (+): αποικισμός αεραγωγών, χρήση β λακτακταμικών, αποικισμός νεογνών και παιδιών με Bifidobacterium spp., αγωγή με ανοσοσφαιρίνες και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, ηλεκτρολυτικά διαλύματα και μεγάλη ανάπτυξη <i>Candida</i> spp.

GAG Galactomannan



Aspergillus fumigatus hyphae

2020 EORTC/MSG definitions for probable invasive pulmonary mold diseases

Παράγοντες ξενιστή

- ♦ Πρόσφατο ιστορικό ουδετεροπενίας ($<0,5 \times 10^9$ ουδετερόφιλα/L [<500 ουδετερόφιλα/ mm^3] για >10 ημέρες) που σχετίζεται χρονικά με την έναρξη της μυκητιασικής νόσου.
- ♦ Αιματολογική κακοήθεια υπό θεραπεία και σε ύφεση κατά το πρόσφατο παρελθόν
- ♦ Αλλογενής μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων
- ♦ Μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου
- ♦ Παρατεταμένη χρήση κορτικοστεροειδών σε θεραπευτική δόση $\geq 0,3$ mg/kg για ≥ 3 εβδομάδες κατά τις τελευταίες 60 ημέρες
- ♦ Θεραπεία με ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες των T κυττάρων (αναστολείς καλσινευρίνης, αναστολείς TNF- α , μονοκλωνικά Abs έναντι λεμφοκυττάρων ή νουκλεοσιδικά ανάλογα) κατά τις τελευταίες 90 ημέρες
- ♦ Θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά των B κυττάρων (αναστολείς κινάσης τυροσίνης του Bruton)
- ♦ Κληρονομική σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (χρόνια κοκκιωματώδης νόσος, ανεπάρκεια STAT 3 ή σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια)
- ♦ Οξεία νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή βαθμού III ή IV (έντερο, πνεύμονες ή ήπαρ), ανθεκτική σε θεραπεία πρώτης γραμμής με στεροειδή

Κλινικά κριτήρια

- (Πνευμονική ασπεργίλλωση)
Παρουσία 1 από τα ακόλουθα 4 μοτίβα στην αξονική τομογραφία:
- Πυκνές, καλά περιγεγραμμένες βλάβες με ή χωρίς περιοχή θολής υάλου (halo sign).
 - Σχηματισμός ημισελήνου (Air crescent sign)
 - Κοιλότητες
 - Σφηνοειδείς και τμηματικές λοβώδεις διηθήσεις

- **Μυκητολογικά κριτήρια μαζί με παράγοντες ξενιστή και την ύπαρξη κλινικών κριτηρίων, θέτουν τη διάγνωση πιθανής ασπεργίλλωσης.**
- Μέτρηση μπορεί να γίνει και σε άλλα στείρα υλικά, ανάλογα με την υποψία εντοπισμού της λοίμωξης (π.χ. ENY)

Μυκητολογικά κριτήρια

- ♦ Άμεση δοκιμή
 - Ανάπτυξη μυκήτων (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* ή *Mucorales*) σε καλλιέργεια από πτύελα, BAL, βρογχικές εκκρίσεις.
 - Μικροσκοπική ανίχνευση μυκητιακών στοιχείων σε πτύελα, BAL, βρογχικές εκκρίσεις
- ♦ Έμμεση δοκιμασία
 - **Αντιγόνο GM**
Οποιοδήποτε 1 από τα ακόλουθα:
 - ✓ **Ορός ή πλάσμα: $\geq 1,0$**
 - ✓ **BAL: $\geq 1,0$**
 - ✓ **Ορός ή πλάσμα: $\geq 0,7$ και BAL: $\geq 0,8$**
 - ✓ **ENY: $\geq 1,0$**
 - PCR *Aspergillus*
Οποιοδήποτε 1 από τα ακόλουθα:
 - ✓ Θετική PCR σε 2 ή περισσότερα διαδοχικά δείγματα πλάσματος, ορού ή ολικού αίματος.
 - ✓ Θετική PCR σε 2 ή περισσότερα δείγματα BAL
 - ✓ Τουλάχιστον 1 θετική PCR σε πλάσμα, ορό ή ολικό αίμα και 1 θετική PCR σε BAL

Platelia™ Aspergillus Ag

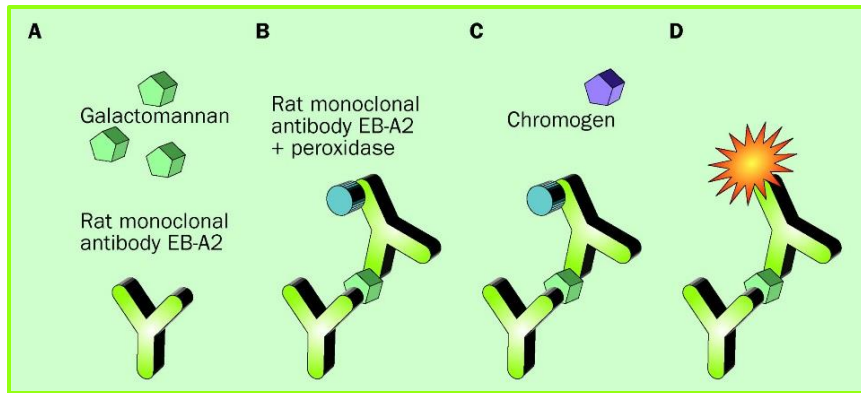
BIO-RAD

FDA 2003

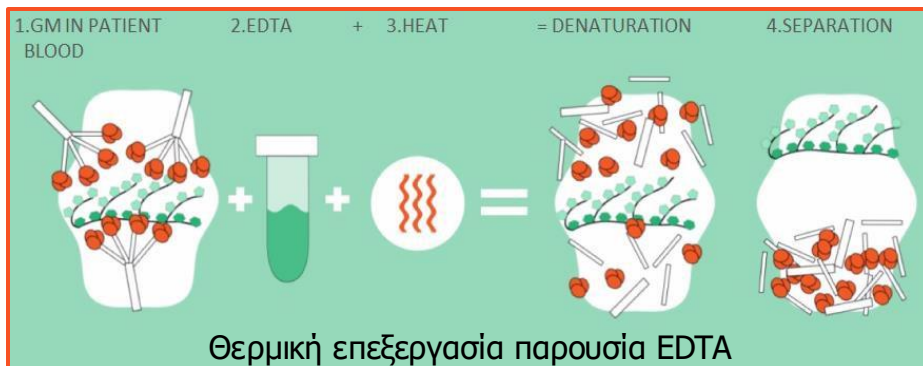
Sandwich ELISA ενός σταδίου σε μικροπλάκες – ανίχνευση GM σε ορός ή πλάσμα, BAL, ENY

* Σε συνδυασμό με μικροβιολογική καλλιέργεια, ιστολογική αξιολόγηση δειγμάτων βιοψίας & ακτινολογικά ευρήματα

• Το όριο ανίχνευσης είναι 0.5-1.0 ng/ml σε ορό.



Μονοκλωνικά Abs επίμομος EBA-2 έναντι Aspergillus GM



↪ Διαχωρισμός ανοσοσυμπλόκων ↪ Καθίζηση πρωτεϊνών

Η ύπαρξη ή μη GM στο υπό εξέταση δείγμα καθορίζεται με υπολογισμό του δείκτη (I).

$$I = \frac{\text{OD δείγματος}}{\text{Μέση OD cut-off}}$$

* τακτικός έλεγχος (2 φορές/εβδομάδα)
↪ Αύξηση ευαισθησίας (~92.1%)

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

- ▶ Τα δείγματα ορού ή BAL με δείκτη $I < 0.50$ θεωρούνται αρνητικά για GM
 - Η GM στο δείγμα βρίσκεται κάτω από το ανιχνεύσιμο από τη μέθοδο επίπεδο.
 - Δεν αποκλείουν τη διάγνωση διεσδυτικής ασπεργίλλωσης.
 - Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας εάν υπάρχει υποψία για τη νόσο.
- ▶ Τα δείγματα ορού ή BAL με δείκτη $I \geq 0.50$ θεωρούνται θετικά για GM
 - Συνιστάται επανάληψη της δοκιμασίας με νέα ποσότητα από το ίδιο δείγμα.

Μυκητολογικό κριτήριο διεσδυτικής ασπεργίλλωσης

- ορός ή πλάσμα: ≥ 1.0
- ορός ή πλάσμα: ≥ 0.7 και BAL: ≥ 0.8
- BAL: ≥ 1.0 • CSF: ≥ 1.0

Η GM ορού μπορεί να ανιχνευθεί από **7-14 ημέρες πριν τη θετικοποίηση της καλλιέργειας.**

Ψευδώς (+) αποτελέσματα

- ♦ ~5% σε ενήλικες και ~83% σε νεογέννητα
- ♦ Είσοδος της θερμοανθεκτικής GM των τροφών στην κυκλοφορία μέσω του ανώριμου ή κατεστραμμένου εντερικού βλεννογόνου
- ♦ Φυσιολογική χλωρίδα ενηλίκων (~3%) και βρεφών που τρέφονται με μητρικό (~91%) ή ξένο γάλα (~75%)
- ♦ Διασταυρούμενες αντιδράσεις: *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *Paecilomyces varioti*, *Geotrichum capitatum*, *Histoplasma*
- ♦ Λιποτειχοϊκό οξύ του *Bifidobacterium bifidum* subsp *pennsylvanicum*
- ♦ Ενδοφλέβια χορήγηση αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη και λοιπά β-λακταμικά αντιβιοτικά)

Ψευδώς (-) αποτελέσματα

- ♦ <5%
- ♦ Παρουσία αντισωμάτων έναντι *Aspergillus*
- ♦ Περιορισμένη αγγειακή διείσδυση
- ♦ Χαμηλό μυκητιακό φορτίο
- ♦ Χαμηλή απελευθέρωση GM από το τοίχωμα του μύκητα (υψηλότερες τιμές: *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*)
- ♦ **Χρήση προφυλακτικής αντιμυκητιακής αγωγής με δράση έναντι των υφομυκήτων (μείωση ανάπτυξης μυκηλλίων)**
 - ↓ ευαισθησίας στο **20%** (≠ 80% σε ασθενείς χωρίς θεραπεία)
 - ↓ ευαισθησίας μόνο κατά 8% στο BAL
 - ↳ Επίλυση του προβλήματος: χρήση άλλων τεχνικών (π.χ. αξιολόγηση απεικονιστικών ευρημάτων)



- Μονοκλωνικό αντίσωμα JF-5 που συνδέεται σε πρωτεϊνικό του εξωκυττάριου γλυκοπρωτεϊνικού Ag **γαλακτομαννοπρωτεΐνη (galactomannoprotein, GP)** που εκκρίνεται κατά την ενεργό ανάπτυξη του *Aspergillus*
- Ανίχνευση GP σε **ορό** και **BAL**
- ✓ **ΌΧΙ** διασταυρούμενες αντιδράσεις με κλινικά σημαντικούς μύκητες *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.*, *Talaromyces marneffeii*, *Fusarium solani* που παρατηρούνται με EB-A2 monoclonal antibody (GM ELISA)
- ✓ Ευαισθησία και ειδικότητα συγκρίσιμες με Platelia Aspergillus Ag (BioRad).
- ✓ Ευαισθησία ΔΕΝ επηρεάζεται σε ΜΗ αιματολογικούς ασθενείς

TABLE 4 Sensitivities and specificities

Sensitivity and specificity data	Test	
	GM	GP
Sensitivity (%) ^a		
All cases	45	45
Cases of proven IA only	40	40
Hematologic patients (proven IA)	53	40
Nonhematologic patients (proven IA)	33	40
Serologic diagnosis of IA (%) ^b		
Serum sampled ±7 days from day 0	51	59
Cases of proven IA only	47	56
Hematologic patients (proven IA)	60	53
Nonhematologic patients (proven IA)	40	57
Serum sampled -6 to +1 weeks from day 0	55	71
Cases of proven IA only	51	69
Hematologic patients (proven IA)	67	67
Nonhematologic patients (proven IA)	43	70
Specificity (%)		
All control sera	99	97
High-risk patients ^c	100	96
Suspicion of borreliosis	99	97

Dichtl K., et al. J Clin Microbiol 2019; 57:e00136-19.

	EUROIMMUN ELISA (Cut-off: ratio 0.40 [*])	Bio-Rad Platelia Aspergillus-Ag-ELISA (Cut-off: ratio 0.50)
Sensitivity	56%	47%
Specificity	97%	99%

^{*} Deviating from the cut-off recommended by the manufacturer

- ▶ Retrospective study with 43 IA patients (according to EORTC/MSG guideline)² and 77 persons without IA
- ▶ Positive predictive value: 90%
Negative predictive value: 88%
- ▶ Higher sensitivity with comparable specificity

¹ J Clin Microbiol, Apr 2019

² IA confirmed in 39 patients, likely in 4 patients

Aspergillus Galactomannan Ag VIRCLIA® monotest

- Πλήρως αυτοματοποιημένη ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας
- Γρήγορη μέθοδος (~1 h)
- Ανίχνευση GM σε πλάσμα, ορό & BAL
- Κάθε monotest περιέχει αντιδραστήρια και controls ξεχωριστά για κάθε δείγμα → εξατομικευμένη δοκιμασία → άμεση κλινική απόκριση



> No sample accumulation

ELISA Need to accumulate samples



Delayed diagnosis!



VIRCLIA® No need to accumulate samples



VirClia®
monotest

Immediate response!



TABLE 3 Results according to clinical classification^a

Result correlation	Platelia N	VirClia N
True positive	60	72
False positive	0	0
True negative	25	25
False negative	35	17
Borderline	0	6
Total	120	120
Sensitivity (%)	63,2	80,9
Specificity (%)	100	100
PPV	100	100
NPV	41.7	59.5

^aResults obtained with the EORTC/MSG criteria as gold standard.

GM στα ούρα

Urine Galactomannan-to-Creatinine Ratio for Detection of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematological Malignancies

Frederike M. J. Reischies,^a Reinhard B. Raggam,^b Juergen Prattes,^a Robert Krause,^a Susanne Eigl,^c Agnes List,^d Franz Quehenberger,^e Volker Strenger,^f Albert Wölfler,^d Martin Hoenigl^{a,c,g}

Section of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria^a; Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Graz, Austria^b; Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria^c; Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria^d; Institute for Medical Informatics, Statistics, and Documentation, Medical University of Graz, Graz, Austria^e; Division of Pediatric Hemato-Oncology, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria^f; Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California, San Diego, California, USA^g

Η εξέταση της γαλακτομαννάνης (GM) σε δείγματα ούρων μπορεί να παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα, σε σύγκριση με την εξέταση ορού, όπως η **εύκολη μη επεμβατική συλλογή δειγμάτων**. Αξιολογήσαμε συνολικά 632 σειριακά δείγματα ούρων από 71 ασθενείς με υποκείμενες αιματολογικές κακοήθειες και διαπιστώθηκε ότι ο **λόγος GM/κρεατινίνη ούρων**, ο οποίος λαμβάνει υπόψη την αραίωση των ούρων, ανιχνεύει αξιόπιστα την διεισδυτική ασπεργίλλωση και μπορεί να αποτελέσει **ένα πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο για ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες**.

- Η υπολογιζόμενη τιμή αποκοπής GM/κρεατινίνη ούρων 0,26 σχετίζεται με 79% ευαισθησία για πιθανή ή αποδεδειγμένη ΙΑ μεταξύ ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες.
- ↓ PPV (13%): συμφωνία με μελέτες για GM ορού σε ασθενείς που αντιμυκητιακή προφύλαξη.
- ↑ NPV (>98%): αποκλεισμός πρωτοεμφανιζόμενης ΙΑ και διακοπή εμπειρικής αντιμυκητιακής θεραπείας για ασθενείς που στην πραγματικότητα δεν έχουν ΙΑ.
- * αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης στα ούρα (π.χ. δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε κρέας, ραβδομύλωση, εκτεταμένη άσκηση)

Αντισώματα έναντι *Aspergillus*

Μέθοδος	Ενδείξεις	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
Πρεσιπιτίνες ασπεργίλλου (ανασοδιάχυση, ID ή αντίθετη ηλεκτροφόρηση CIE)	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διάγνωση χρόνιας πνευμονικής ασπεργίλλωσης (CPA) ‣ Ανίχνευση διαφορετικών ανοσοσφαιρινών IgG & IgM 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Ανίχνευση Abs έναντι των πιο κοινών ειδών (<i>A. fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. niger</i>, <i>A. terreus</i>) ‣ Αντικατάσταση από EIA 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Χρονοβόρα, κυρίως in-house μέθοδοι, δύσκολη τυποποίηση και επαναληψιμότητα ‣ Ευαισθησία <60%
<i>Aspergillus</i>-specific IgG EIA (anti-GM) Εμπορικά διαθέσιμα κιτ <ul style="list-style-type: none"> ▪ ImmunoCAP™ ▪ Immunolite™ ▪ Virion/Serion™ ▪ Dynamiker™ ▪ Gensis™ ▪ Bio-Rad™ ▪ Bordier Affinity™ ▪ Immy™ ▪ others 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διάγνωση CPA ‣ Διάγνωση αλλεργικής βρογχοπνευμονικής ασπεργίλλωσης (ABPA) ‣ Παρακολούθηση θεραπευτικής απόκρισης 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διάγνωση CPA (αποκλειστικά σε ασθενείς με χρόνιες πνευμονικές παθήσεις) ‣ Diagnostic cut-offs: Bio-Rad 1.5 AU/ml, Immulite 25 mg/L, ImmunoCAP 50 mg/L, Serion 50 U/nL ‣ SN 75-96%, SP 97-81% (ImmunoCAP™ & Immulite™ υπερτερούν) 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ EIA: πιο αξιόπιστη μέθοδος για διάγνωση CPA ‣ Διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ <i>Aspergillus</i> IgG & άλλων μυκήτων ‣ Οι περισσότεροι υγιείς άνθρωποι έχουν κάποιου βαθμού αντισωματική απόκριση, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με φυματίωση
<i>Aspergillus</i> Western blot IgG (LDBio Diagnostics)	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διάγνωση διαφόρων μορφών ασπεργίλλωσης 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ SN 88%, SP 94% 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Έλλειψη δεδομένων
<i>Aspergillus</i>-specific IgE (EIA ή CIE)	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διάγνωση ABPA ‣ Ευαισθητοποίηση 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Βελτίωση ειδικότητας με μέτρηση IgE έναντι Asp f1 & f2 	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Διασταυρούμενες αντιδράσεις ‣ 30-50% (+) σε ασθενείς με APBA

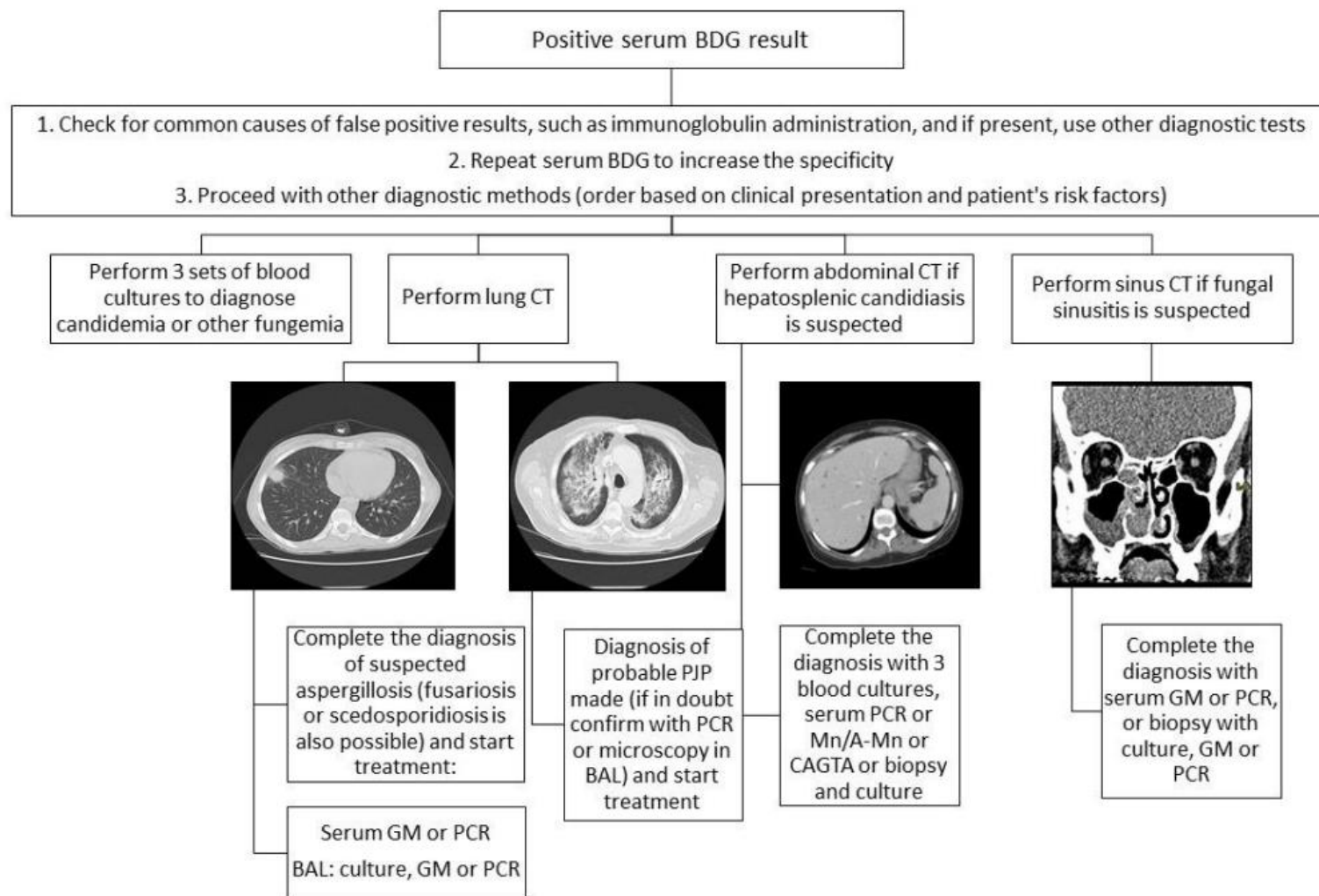
* Δεν συνιστάται για διάγνωση διεισδυτικής πνευμονικής ασπεργίλλωσης, πλην ασθενών με πνευμονικά σπήλαια αγνώστου αιτιολογίας

β-D γλυκάνη (β-D glucan, BDG)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
<p>Εμπορικά διαθέσιμα κιτ</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fungitell™ (χρωματομετρία) FDA approved, cut-off: 60-80 pg/mL ▪ Glucatell Test™ (χρωματομετρία) ▪ Wako-BDG™ (θολοσιμετρία) 11 pg/mL ▪ Dynamiker Fungus™ (θολοσιμετρία) 70-100 pg/mL ▪ Fungitec-G™ (χρωματομετρία) 20 pg/mL ▪ B-G Star (χρωματομετρία) 11 pg/mL ▪ Fungitell STAT™ (χρωματομετρία) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Διάγνωση διδυμοειδών μυκητιακών λοιμώξεων ➤ Παρακολούθηση του BDG σε άτομα υψηλού κινδύνου: 2-3 ανά εβδομάδα μεταξύ ογκοαιματολογικών ασθενών ή σε ασθενείς κατά τη διάρκεια ουδετεροπενικής φάσης ➤ Χρήση ως μέρος πολυδιαγνωστικής προσέγγισης σε συνδυασμό με PCR και GM ➤ Ανίχνευση BDG με Fungitell™ εντάσσεται στα Κριτήρια EORTC/MSG (ορός θετικός για BDG σε συνδυασμό με παράγοντες ξενιστή και κλινικά κριτήρια) σε ορισμένους ασθενείς (Μυκητολογικό κριτήριο σε διδυμοειδή καντιντίαση ή πνευμονία από <i>Pneumocystis jirovecii</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Πανμυκητιακός δείκτης: <i>Aspergillus</i>, <i>Candida</i>, <i>Pneumocystis</i>, <i>Trichosporon</i>, <i>Fusarium</i> και <i>Exserohilum</i> ➤ Επανάληψη εξέτασης σε δείγματα ορού → αύξηση ειδικότητας (80% → 97%) ➤ ↑ ευαισθησία για διάγνωση της εν τω βάθει καντιντίασης από την καλλιέργεια αίματος (62% έναντι 17%) ➤ ↑ αρνητική προγνωστική αξία (>90%) για διδυμοειδή καντιντίαση ➤ <u>Καλύτερη διαγνωστική αξία</u> για ασθενείς υψηλού κινδύνου με αιματολογικές κακοήθειες και ουδετεροπενία που προκαλείται από χημειοθεραπεία ή αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων (ευαισθησία: 60-80% και ειδικότητα: ~ 90%) ➤ <u>Νεογνική διδυμοειδή καντιντίαση</u> (ευαισθησία: 89%, ειδικότητα: 60%) ➤ <u>Πνευμονία από <i>Pneumocystis jirovecii</i></u> (ευαισθησία: 91%, ειδικότητα: 79%) ➤ <u>Μυκητιακή μηνιγγίτιδα:</u> BDG σε ENY (ευαισθησία: 53%-100%, ειδικότητα: 82%-98%) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Δεν ανιχνεύεται σε λοιμώξεις από Mucorales, <i>Blastomyces dermatitidis</i> ή <i>Cryptococcus</i> spp. ➤ Ψευδώς (-): αιμολυμένοι και λιπαιμικοί οροί ➤ Ακατάλληλο σε BAL για διάγνωση πνευμονικής ΙΑ ➤ Ευαισθησία εξαρτάται από είδος <i>Candida</i> (<i>C. parapsilosis</i> ↓) ➤ Αργή ↓ επιπέδων BDG σε πολλές περιπτώσεις διδυμοειδούς ασπεργίλλωσης και καντιντίασης και πνευμονίας από <i>Pneumocystis jirovecii</i> παρά την επιτυχή θεραπεία → αντένδειξη για παρακολούθηση απόκρισης στη θεραπεία ➤ Ανάγκη χρήσης υλικών χωρίς γλυκάνες (στο εργαστήριο)

β-D γλυκάνη (BDG) - Δεν είναι ειδικός δείκτης για συγκεκριμένη μυκητιακή λοίμωξη

Χρήση σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους για την ταυτοποίηση ειδών (π.χ. GM, PCR, απεικονιστικές μέθοδοι)



β-D γλυκάνη (BDG) – Κλινική διάγνωση

➤ Έγκαιρη κλινική διάγνωση (θετικοποίηση BDG πριν από άλλες μεθόδους)

- 1-10 ημέρες πριν από καλλιέργεια (αίματος, βιοψίας ή BAL)
- 9.3 ημέρες πριν τα ακτινολογικά ευρήματα διεισδυτικής ασπεργίλλωσης
- 10 ημέρες πριν την κλινική διάγνωση σε αιματολογικούς ασθενείς (καντιντίαση, ασπεργίλλωση, φουσαρίωση, τριχοσπορόνωση)

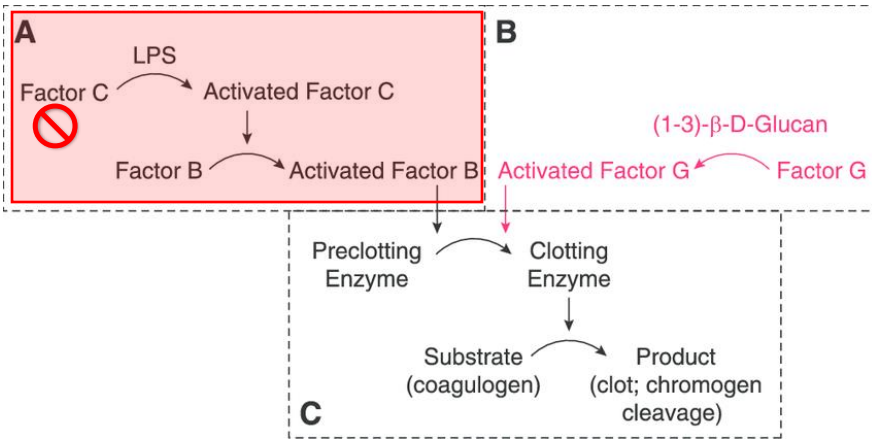
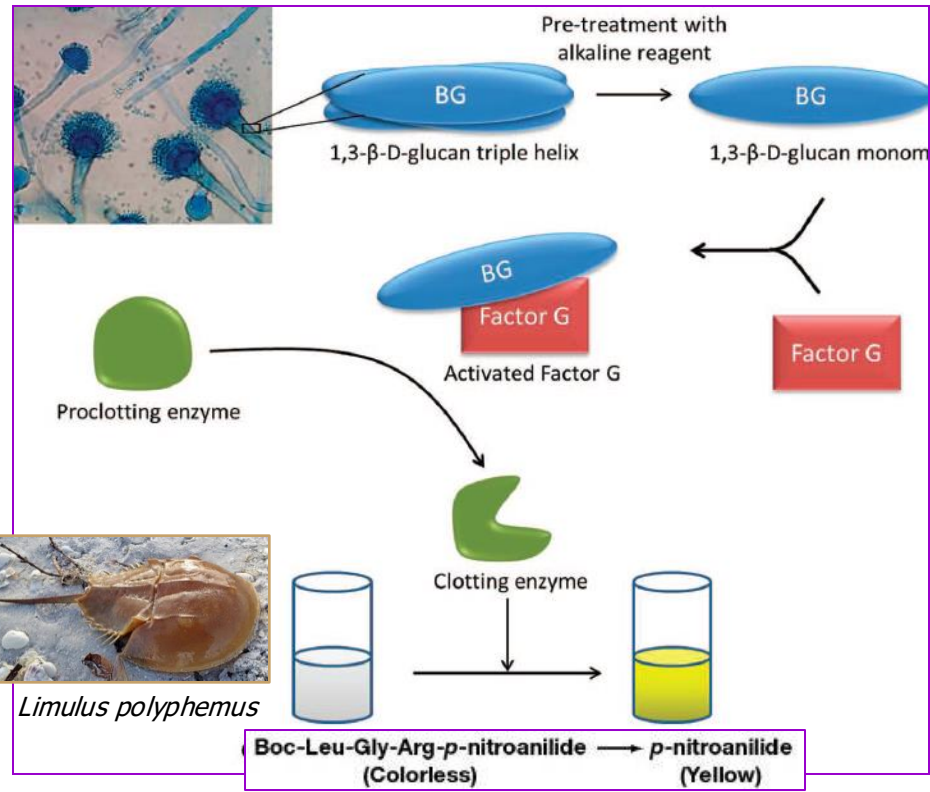
➤ Απάντηση σε αντιμυκητιακή αγωγή (παρακολούθηση θεραπείας)

- ↓ C σε αιματολογικούς ασθενείς υπό amphotericin B και caspofungin
- Σε ασθενείς με αποδεδειγμένη διεισδυτική λοίμωξη
 - » απόκριση στη θεραπευτική αγωγή: αρχικά ↑ και στη συνέχεια ↓
 - » μη απόκριση στη θεραπευτική αγωγή: όχι ↓ / συνεχής ↑
- Σε ασθενείς χωρίς αντιμυκητιακή αγωγή: απότομη ↑ και απότομη ↓
- Συσχέτιση με θέση λοίμωξης: ασθενείς με ιστικές λοιμώξεις δεν καταφέρνουν να μειώσουν επίπεδα BDG παρά την επιτυχή έκβαση
- Βραδεία ↓ σε ασθενείς με IA, IC και PCP παρά την επιτυχή θεραπεία – παραμένει θετική για μεγάλο χρονικό διάστημα

(1,3)-β-D-Glucan assay (Fungitell™)

**CE-marked &
FDA approved 2004**

Μέθοδος Fungitell: ικανότητα της BDG να ενεργοποιεί τον καταρράκτη πήξης του αίματος του κάβουρα *Limulus polyphemus*.



* Το αντιδραστήριο Fungitell είναι τροποποιημένο έτσι ώστε να αποκλείει τον παράγοντα C και να μη γίνεται ενεργοποίηση του καταρράκτη από την ενδοτοξίνη LPS



* Όλα τα αναλώσιμα (tips, σωληνάρια) πρέπει να είναι **ελεύθερα γλυκάνης**.

* Η μέθοδος Fungitell χρειάζεται προσοχή κατά τη διαδικασία εκτέλεσής της για την **αποφυγή επιμολύνσεων**.

Κινητική προσδιορισμού Fungitell: καθορισμός ρυθμού αύξησης οπτικής πυκνότητας ορού Ερμηνεία αποτελεσμάτων και εκτίμηση της συγκέντρωσης BDG με πρότυπες καμπύλες

(1,3)-β-D-Glucan assay (Fungitell™)

Συστηματική μυκητιασική λοίμωξη	Αποτέλεσμα	Συγκέντρωση γλυκάνης
	Αρνητικό	<60 pg/ml
	Αμφίβολο	60-79 pg/ml
	Θετικό	≥ 80 pg/ml

- 10-40 pg/ml γλυκάνης σε φυσιολογικά άτομα: αποικισμός του εντέρου
- (+) αποτέλεσμα δεν υποδεικνύει την τάξη του υπεύθυνου μύκητα
 - όχι πρόβλημα – χορήγηση ευρέως φάσματος αντιμυκητιασικού φαρμάκου
 - πρόβλημα – χορήγηση φαρμάκων (fluconazole, caspofungin) έναντι ορισμένων μυκήτων

➤ Μη καθορισμός cut-off στον παιδιατρικό πληθυσμό

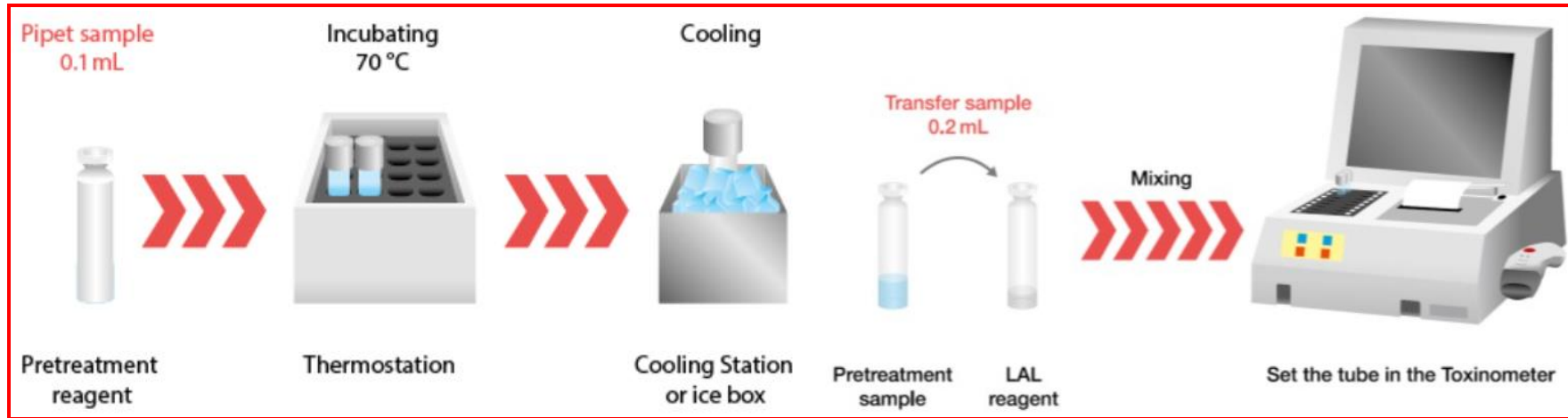
➤ Προγνωστικός δείκτης

- Παρουσία σημείων και συμπτωμάτων & C γλυκάνης ≥ 80pg/ml
 - (+) προγνωστική αξία (ο ασθενής είναι θετικός για μυκητιακή λοίμωξη): ~74-92%
- Απουσία σημείων και συμπτωμάτων & C γλυκάνης < 60pg/ml
 - (-) προγνωστική αξία: ~65-85%
- C γλυκάνης ≥ 400 pg/ml: σηψαιμία (91%) και ↑ θνησιμότητα (36%)
C γλυκάνης < 400 pg/ml: σηψαιμία (28%) και θνησιμότητα (6%)

➤ Απόδοση ανάλογα με το μύκητα:

- ↑ ευαισθησία (96%) και ειδικότητα (84%) σε πνευμονία από *Pneumocystis*
- παρόμοια ευαισθησία με αυτή της GM ορού σε λοίμωξη από *Aspergillus*
- ↑ ευαισθησία σε σύγκριση με αιμοκαλλιέργεια σε διεισδυτική καντιντίαση, με σχετικά καλή ειδικότητα (63–73%)

Ποσοτική μέτρηση
BDG με την τεχνική
της κινητικής
θολωσιμετρίας σε
σωληνάριο



- ♦ Monotest reagent
- ♦ Cut-off value: 11 pg/mL
- ♦ Specimen: serum & plasma

Endotoxin in a sample is inactivated by heating the sample at 70°C for 10 minutes with the pretreatment solution, which contains non-ionic detergent and polymyxin B. This **pretreatment** also deactivates inhibitory protein substances in the sample. When the pretreated sample is mixed with the LAL reagent, **(1→3)-β-D-glucan in the sample activates Factor G which initiates the cascade reactions** shown in Fig. 1. The turbidity change caused by the gelation reaction is detected as transmittance change. The time taken for the transmittance to reach the threshold value is measured. This interval is defined as gelation time and correlates with (1→3)-β-D-glucan concentration. This concentration is automatically calculated from a standard curve, which is available for each lot of LAL reagent.

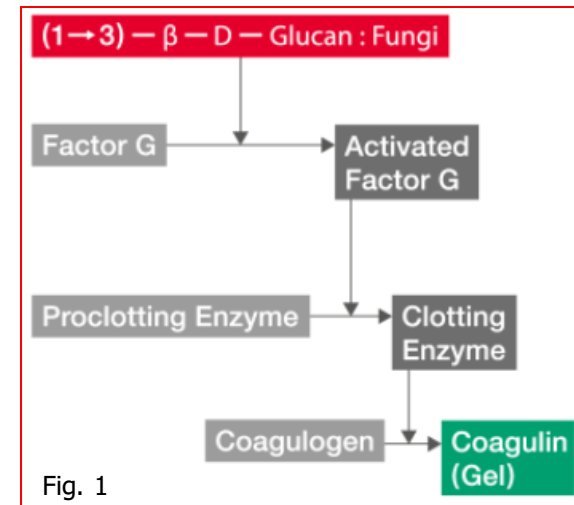


Fig. 1

- ♦ Measurement time: Max 90 minutes

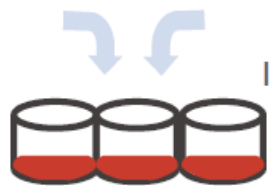
- ELISA (96 θέσεις)
- Ευαισθησία: 78.1%, ειδικότητα: 81.4%
- **Συμφωνία αποτελεσμάτων** με τη μεθοδολογία **Fungitell™**
- Όριο ανίχνευσης: 37.5-600 pg/mL
- Δείγμα: ορός
- Τεχνική ευελιξία (δυνατότητα διαχωρισμού των strips → εφαρμογή σε εργαστήρια με μικρό αριθμό δειγμάτων)



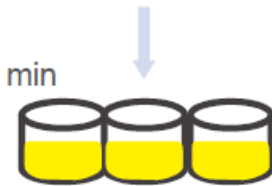
Test Procedure

Serum Sample Treatment Solution

Add Main Reagent



Incubate at 37°C for 10 min



Kinetic reading 37°C
for 30-40min

Results are available

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

Disease	Specimen	Test	Recommendation
Candidaemia	Blood Serum	Blood culture	Essential investigation ^a
		Mannan/anti-mannan	Recommended
Invasive candidiasis	Blood Serum	→ B-D-glucan	✓ Recommended
		Other antibodies	No recommendation
		Septifast PCR kit	No recommendation
		In-house PCR	No recommendation
		Blood culture	Essential investigation
	Tissue and sterile body fluids	Mannan/anti-mannan	No recommendation
		→ B-D-glucan	✓ Recommended
		Septifast PCR kit	No recommendation
		In-house PCR	No recommendation
		Direct microscopy and histopathology	Essential investigation
Chronic disseminated candidiasis	Blood Serum	Culture	Essential investigation
		Immuno-histochemistry	No recommendation
		Tissue PCR	No recommendation
		<i>In situ</i> hybridization	No recommendation
		Blood culture	Essential investigation
	Tissue and sterile body fluids	Mannan/anti-mannan	Recommended
		→ B-D-glucan	✓ Recommended
		Septifast PCR kit	No recommendation
		In-house PCR	No recommendation
		Direct microscopy and histopathology	Essential investigation
	Culture	Essential investigation	
	Immuno-histochemistry	No recommendation	
	Tissue PCR	No recommendation	
	<i>In situ</i> hybridization	No recommendation	

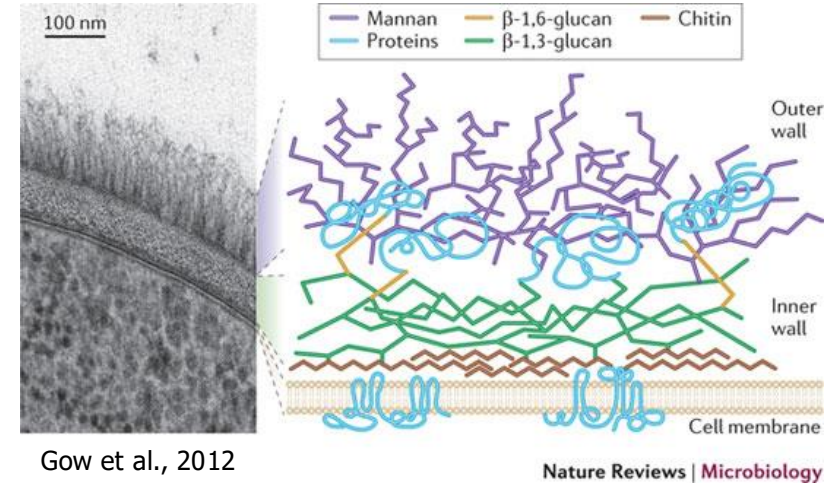
Ρόλος της BDG για τη διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης (IA)

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Mixed population: adult ICU, haematological disorders, SOT	To diagnose IFD	Diagnostic assay	C	II	Five different assays Overall sensitivity of 77% and specificity of 85% Specificity limits its value in this setting
		Screening assays	C	II	Two or more consecutive samples: sensitivity: 65%; specificity: 93% Studies included once to thrice weekly. Varies with assay and cut-off: Wako assay sensitivity: 40%–97%, specificity: 51%–99%
Adult haematological malignancy and HSCT	To diagnose IFD	Diagnostic assay	C	II	Overall sensitivity: 50%–70%, specificity: 91%–99%
ICU—mixed adult immunocompromised patients (haematology, SOT, cancer, immunosuppressive therapy, liver failure, HIV)	To diagnose IA	Diagnostic assay	C	II	Overall sensitivity: 78%–85%, specificity: 36%–75%, NPV: 85%–92% Specificity increased at higher cut-off values
ICU—mixed adult population: SOT, liver failure, immunosuppressed		Screening assays	C	III	Sensitivity: 91%, specificity: 58%, PPV: 25%, NPV: 98%. Positive mean of 5.6 days before positive mould culture High false-positive rate in early ICU admission
Adult haematological malignancy and HSCT	To diagnose IA	Diagnostic assay	C	II	Overall sensitivity: 57%–76%, specificity: 95%–97%
		Screening assays	C	II	Overall sensitivity: 46%, specificity: 97% Confirmation with GM increases specificity Data suggest BDG is unsuitable for ruling out diagnosis of IA

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

Μαννάνη (Mannan, Mn)

- πολυσακχαρίτης, συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος (β-γλυκάνη, χιτίνη, μαννάνη)
- Κυκλοφορεί κατά τη διάρκεια λοίμωξης από *Candida* (διήθηση ιστών από *Candida* σε καντινταμιά)
 - ✦ Λιγότερο πιθανό σε παροδική ή σχετιζόμενη με καθετήρες καντινταμιά
- **Απομακρύνεται γρήγορα από το αίμα***
 - 1 (-) αποτέλεσμα δε μπορεί να αποκλείσει τη διεισδυτική καντιντίαση
 - ✦ απαιτείται συχνή λήψη δειγμάτων (2-3/εβδομάδα) ⇒ αύξηση ευαισθησίας (85-90%)
- Δύο τεχνικές: συγκόλληση με σωματίδια Latex (LA) και Ανοσοενζυμική (EIA)



Bio-Rad	Pastorex Candida (LA)	Platelia Candida (ELISA)
Αντίσωμα	Μονοκλωνικό EB-CA1	Μονοκλωνικό EB-CA1
Όριο ανίχνευσης	2.5 ng/ml	0.25 ng/ml
Ευαισθησία	28%	40% *
Ειδικότητα	100%	98%

Candida: Μαννάνη (Mn) και αντίσωμα έναντι μαννάνης (anti-mannan Ab, A-Mn)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
<p>Εμπορικά διαθέσιμα κιτ</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bio-Rad™ Platelia™ Candida Ag & Ab, EIA (ευαισθησία: 55-89%, ειδικότητα: 60-89%) ▪ Serion™ Serion Mannan kit (ευαισθησία: 52-62%, ειδικότητα: 54-98%) ▪ Dynamiker™ Dynamiker Candida A-Mn IgM και IgG, EIA (ευαισθησία: 57-93%, ειδικότητα: 93-94%) ▪ Άλλες 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Συνιστάται συνδυασμένη ανίχνευση Mn και A-Mn για διάγνωση διδυμοειδούς καντιντίασης, καντινταϊμίας και εν τω βάθει καντιντίασης ▷ Αποκλεισμός καντινταϊμίας (αρνητική προγνωστική αξία: > 85%) ▷ Διάγνωση χρόνιας διάχυτης καντιντίασης 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Συνδυασμένη ανίχνευση Mn και A-Mn → Διάγνωση καντινταϊμίας ακόμη και <u>6 ημέρες πριν τη θετικοποίηση της αιμοκαλλιέργειας</u> → Διάγνωση καντινταϊμίας ακόμη και 16 ημέρες πριν τη θετικοποίηση της καλλιέργειας σε χρόνια διάχυτη καντιντίαση ▷ Υψηλή (-) προγνωστική αξία (>85%) → αποκλεισμός της λοίμωξης 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ Διαφορετική ευαισθησία για διαφορετικά είδη <i>Candida</i> ▷ Ψευδώς (+): βακτηριαϊμία, χορήγηση acyclovir & valacyclovir ▷ Αποκλειστική χρήση Mn περιορισμένη λόγω χαμηλής ευαισθησίας <ul style="list-style-type: none"> ▫ μεταβλητή παραγωγή αντισωμάτων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ▫ αδυναμία διάκρισης μεταξύ αποικισμού /λοίμωξης ▫ απομάκρυνση αντισώματος από το αντιγόνο (ανοσοσυμπλέγματα) ▫ γρήγορη κάθαρση της Mn από ήπαρ και σπλήνα

Μέθοδος – Διάγνωση	Ευαισθησία	Ειδικότητα
Μαννάνη	58%	93%
Αντι-μαννάνη IgG	59%	83%
Μαννάνη + αντι-μαννάνη IgG	83%	86%

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων - Διαφορές ανάλογα με τα είδη Candida

Η ευαισθησία ανίχνευσης αντιγόνου (mannan) και αντισώματος (anti-mannan Ab) είναι μεγαλύτερη για την *C. albicans* και μικρότερη για τις *C. parapsilosis* ή *C. krusei*.

	Mannan	Anti-mannan Ab	Mannan & Anti-mannan Ab
<i>C. albicans</i>	62%	67%	100%
<i>C. glabrata</i>	58%	83%	83%
<i>C. tropicalis</i>	70%	60%	80%
<i>C. parapsilosis</i>	30%	10%	40%
<i>C. krusei</i>	25%	38%	50%

Jacquinet et al. 1998

Sendid et al. 2002

Rimek et al. 2003

► Platelia Candida Ag test

♦ χρήση μονοκλωνικού αντισώματος EB-CA1

(αναγνώριση του επίτοπου μαννοπεντόζης της *C. albicans*)

- σε υψηλά επίπεδα στις *C. glabrata* και *C. tropicalis*, αλλά
- σε χαμηλά επίπεδα στις *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* και *C. guilliermondii*

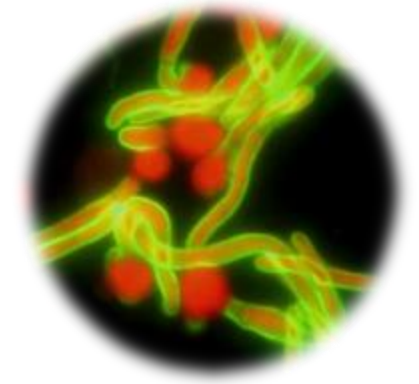
ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures

Disease	Specimen	Test	Recommendation
Candidaemia	Blood Serum	→ Blood culture	Essential investigation ^a
		→ Mannan/anti-mannan	<input checked="" type="checkbox"/> Recommended
		→ B-D-glucan	Recommended
		→ Other antibodies	No recommendation
		→ Septifast PCR kit	No recommendation
		→ In-house PCR	No recommendation
Invasive candidiasis	Blood Serum	→ Blood culture	Essential investigation
		→ Mannan/anti-mannan	<input checked="" type="checkbox"/> No recommendation
		→ B-D-glucan	Recommended
		→ Septifast PCR kit	No recommendation
	Tissue and sterile body fluids	→ In-house PCR	No recommendation
		→ Direct microscopy and histopathology	Essential investigation
		→ Culture	Essential investigation
		→ Immuno-histochemistry	No recommendation
		→ Tissue PCR	No recommendation
		→ <i>In situ</i> hybridization	No recommendation
Chronic disseminated candidiasis	Blood Serum	→ Blood culture	Essential investigation
		→ Mannan/anti-mannan	<input checked="" type="checkbox"/> Recommended
		→ B-D-glucan	Recommended
		→ Septifast PCR kit	No recommendation
		→ In-house PCR	No recommendation
	Tissue and sterile body fluids	→ Direct microscopy and histopathology	Essential investigation
		→ Culture	Essential investigation
		→ Immuno-histochemistry	No recommendation
		→ Tissue PCR	No recommendation
		→ <i>In situ</i> hybridization	No recommendation

* Δεν είναι μυκητολογικό κριτήριο

Candida albicans germ tube antibody (CAGTA)

- Έμμεσος ανοσοφθορισμός
- Ανίχνευση ειδικών **IgG Abs** έναντι αντιγόνων της επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος των βλαστικών σωλήνων (germ tubes) της **Candida albicans**
(κύτταρα με σωληνοειδή εκβλάστηση: καλλιέργεια ή εισβολή σε ιστούς του ξενιστή)
- Κατεργασία δειγμάτων ορού με yeast phase of *C. albicans*:
απομάκρυνση άλλων anti-Candida Abs → αποφυγή πιθανών ψευδώς (+)
- Ταχεία και απλή μέθοδος **διάγνωσης διεσδυτικής καντιντίασης** (2 ώρες)
- Συνολική ευαισθησία: 77-89%, ειδικότητα: 91-100%
- **↓ τίτλοι CAGTA**: ασθενείς με διεσδυτικές λοιμώξεις από είδη *Candida* εκτός της *C. albicans* και σε ανοσοκατασταλμένους
- Διάκριση μεταξύ λοίμωξης και αποικισμού
- **Προγνωστικός δείκτης**: ↓ ποσοστά θνησιμότητας σε ασθενείς με ↑ τίτλους CAGTA
(καλύτερη έκβαση - ταυτόχρονη λήψη αντιμυκητιακής αγωγής, σύγκριση με ασθενείς χωρίς Abs)
- Παρακολούθηση αποτελεσματικότητας αντιμυκητιακής αγωγής
(σωστή απόκριση στη θεραπευτική αγωγή → αρνητικοποίηση μεθόδου)



Invasive Candidiasis (CAGTA) VIRCLIA® IgG Monotest

Indirect chemiluminescent immunoassay (CLIA) to test **IgG antibodies** against antigens located on the cell wall surface of the mycelium of **Candida albicans** (CAGTA Candida albicans germ tube antibody) in human **serum/plasma**.

- Discriminates between infection and colonization
- High Negative Predictive Value (NPV)
- Highly convenient solution to urgent samples
- Simple and automated protocol that provides results within 1 hour
- Sample dispensed from primary tube
- Objective method with extraordinary sensitivity and accuracy in the results
- Monotest format with ready-to-use reagents
- CAGTA (Candida albicans germ tube antibody) is widely recognized in the scientific literature as an excellent diagnostic tool

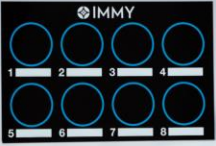
Table 1 Sensitivities, specificities, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of CAGTA and VirCLIA assays as compared to the clinical gold standard in patients with invasive candidiasis, candidemia, and intra-abdominal candidiasis

	IC (overall)	C	IAC
CAGTA			
Sensitivity % (95% CI)	69.2 (53.6–81.4)	76.2 (54.9–89.4)	61.1 (38.6–79.7)
Specificity % (95% CI)	80.3 (69.2–88.1)	80.3 (69.2–88.1)	80.3 (69.2–88.1)
PPV % (95% CI)	67.5 (52.0–79.9)	55.2 (37.5–71.6)	45.8 (27.9–64.9)
NPV % (95% CI)	81.5 (70.4–89.1)	91.4 (81.4–96.3)	88.3 (77.8–94.2)
VirCLIA			
Sensitivity % (95% CI)	76.9 (61.7–87.4)	85.7 (65.4–95.0)	66.7 (43.7–83.7)
Specificity % (95% CI)	75.8 (64.2–84.5)	75.8 (64.2–84.5)	75.8 (64.2–84.5)
PPV % (95% CI)	65.2 (50.8–77.3)	52.9 (36.7–68.5)	42.9 (26.5–60.9)
NPV % (95% CI)	84.7 (73.5–91.8)	94.3 (84.6–98.1)	89.3 (78.5–95.0)

CI confidence interval. Gold-standard method: positive blood or peritoneal fluid culture. IC invasive candidiasis, C candidemia, IAC intra-abdominal candidiasis



Αντιγόνο Κρυπτοκόκκου (CrAg) – Γλυκουρονοξυλομαννάνης (GXM)

Μέθοδος	Ενδείξεις	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Περιορισμοί
<p>EIA: ποσοτικός προσδιορισμός CrAg</p> <ul style="list-style-type: none"> Meridian™ Immy™ Dynamiker™ Άλλες 	<ul style="list-style-type: none"> Διάγνωση κρυπτοκοκκικής μηνιγγίτιδας 	<ul style="list-style-type: none"> HIV ασθενείς ENY SN: 95-100%, SP: 91-100% Αυτοματοποίηση Ορός (SN & SP: 98-100%) Ούρα (SN: 80%) 	<ul style="list-style-type: none"> Ψευδώς (+): ασθενείς με <i>Trichosporon</i> sp., <i>Carnocytophaga canimorsus</i>, <i>Stomatococcus mucilaginosus</i>
<p>Συγκόλληση σφαιριδίων latex</p> <ul style="list-style-type: none"> IMMY™ CALAS™ Meridian Diagnostics™ Immy™ άλλες 	<ul style="list-style-type: none"> Ορός & ENY Ανίχνευση GCM σε 4 κύριους οροτύπους: <i>Cryptococcus neoformans</i> (serotypes A and D) & <i>Cryptococcus gattii</i> (serotypes B and C) και 1 υβριδικό ορότυπο AD 	<ul style="list-style-type: none"> Ορός (SN: 87%), ENY (SN: 97%), SP: 93-100% Δοκιμασία προσυμπτωματικού ελέγχου (screening test): Ποσοτικά αποτελέσματα (τίτλοι): χρήσιμοι προγνωστικοί δείκτες για επιβίωση και συμμετοχή ΚΝΣ. 	<ul style="list-style-type: none"> Ψευδώς (+): παρουσία ρευματοειδούς παράγοντα σε ορό Απαιτείται επεξεργασία ορού (βρασμός και επεξεργασία με προνάση) Ψευδώς (-): φαινόμενο προζώνης

* CrAg θετικό στον ορό σε τυχαία εξέταση

↪ είσοδος ασθενούς στο νοσοκομείο για εκτίμηση, οσφυονωτιαία παρακέντηση και πιθανώς χορήγηση θεραπείας.

* Διάσπαρτη νόσος μπορεί να υπάρχει και χωρίς μηνιγγική προσβολή, ενώ στο 50% των περιπτώσεων συνυπάρχει προσβολή των πνευμόνων (βήχας + δύσπνοια, παθολογική ακτινογραφία θώρακα)

Τεστ ανίχνευσης **Ag κρυπτοκόκκου**

Διάγνωση κρυπτοκοκκικής μηνιγγίτιδας

European Organisation for the Research & Treatment of Cancer & Mycosis Study Group (EORTC/MSG)

Μοριακές μέθοδοι

Πλεονεκτήματα

Ταχύτητα (συμβολή στην έγκαιρη διάγνωση)

Ευαισθησία σε σχέση με καλλιεργητικές μεθόδους

Λιγότερο χρονοβόρες από τις καλλιέργειες

Εφαρμογή σε πολλούς τύπους κλινικών δειγμάτων (αίμα, σωματικά υγρά, BAL, ENY κ.λπ.)

Εφαρμογή και ταυτοποίηση ειδών που **δεν καλλιεργούνται ή αναστέλλεται η ανάπτυξή τους λόγω πρώιμης έναρξης αντιμυκητιακής αγωγής**

Περιορισμοί

Περιορισμοί **διαθεσιμότητας**

Έλλειψη κλινικής επικύρωσης (μη προτυποποιημένες μέθοδοι)

Σπάνια ελέγχονται σε προοπτικές κλινικές μελέτες

Εφαρμογή σε καθαρές καλλιέργειες ή in vitro

Περιορισμένο φάσμα ειδών που ανιχνεύονται

Υψηλό κόστος

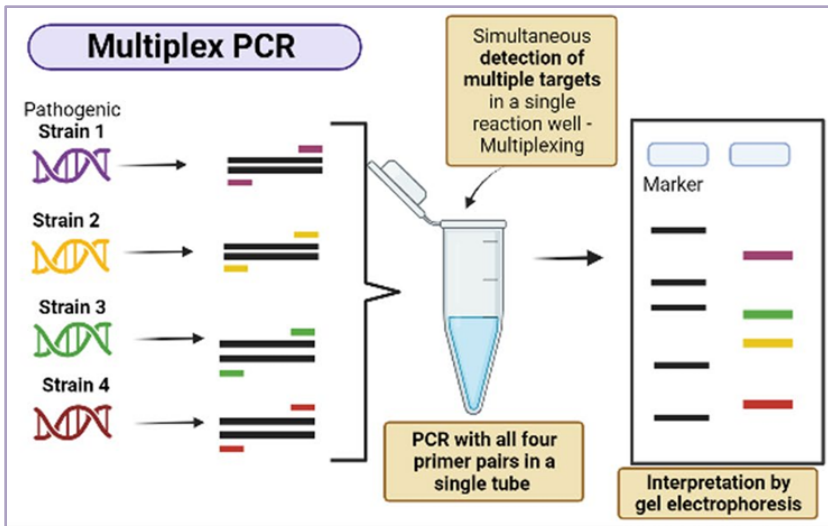
Εκχύλιση: έλλειψη ενιαίας διαγνωστικής πλατφόρμας με εφαρμογή σε όλα τα είδη μηκύτων

Εμπορικά διαθέσιμες μοριακές μέθοδοι για ανίχνευση *Aspergillus* spp.

Product (Manufacturer)	Assay method	PCR targets	Detected species	Detected resistance mutations	Specimens	Assay Time	Sensitivity & Specificity
SeptiFast LightCycler (Roche)	Multiplex Real-time PCR	ITS region	<i>C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. glabrata, A. fumigatus</i>	–	WB	6–7 h	60–86% & 96.1–100%
Magicplex Sepsis Real-Time Test (Seegne)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>A. fumigatus, C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis</i>	–	WB	6 h*	29% & 95%
A. fumigatus Bio-Evolution (Bio-Evolution)	Real-time PCR	ITS1 region	<i>A. fumigatus</i>	–	BAL	<80 min**	81% & 100%
MycAssay Aspergillus (Myconostica)	Real-time PCR with molecular beacons	18 S rDNA	18 <i>Aspergillus</i> spp. including: <i>A. fumigatus, A. flavus, A. terreus, A. niger</i>	–	Serum, BAL	4 h***	80–100% & 82.4–98.6%
AsperGenius® (PathoNostics)	Multiplex real-time PCR	28 S rRNA	<i>Aspergillus</i> spp. including: <i>A. fumigatus, A. terreus</i>	Cyp51 A gene: - TR34/L98H - TR46/Y121F/T289A	BAL, Serum Plasma, Biopsy CSF	<3 h***	65.5–88.9% & 77.8–93.3%
Fungiplex® Aspergillus & Dungiplex® Aspergillus Azole-R (Bruker Daltonics)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>A. fumigatus, A. flavus, A. niger, A. terreus</i>	Cyp51 gene: - TR34/L98H - TR46/Y121F/T289A	WB, Serum, Plasma, BAL	2 h**	60% & 91.2%
Aspergillus spp. ELITE MGB® Kit (ELITechGroup)	Quantitative real-time PCR	18 S rDNA	<i>Aspergillus</i> spp. including: <i>A. niger, A. nidulans, A. terreus, A. flavus, A. versicolor, A. glaucus</i>	–	BAL, BA	NA	90–100% & 97–97.8%
MycoReal Aspergillus (Ingenetix)	Real-time PCR	ITS2 region	<i>A. fumigatus, A. flavus, A. nidulans, A. niger, A. terreus</i>	–	BAL, Blood CSF, Tissues	NA	NA
MycoGENIE® Aspergillus Species & MycoGENIE® Aspergillus fumigatus & resistance TR34/L98H (Ademtech)	Quadruplex real-time PCR	28 S rRNA	<i>Aspergillus</i> spp. including: <i>A. fumigatus</i>	TR34/L98H mutations	Serum, BAL, Biopsy	NA	71–100% & 84.6–100%
AspID (OlmDiagnostics)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>Aspergillus</i> spp. including: <i>A. terreus</i>	–	BAL	90 min**	94.1% & 76.5%

* including DNA extraction, ** excluding DNA extraction, ***after sample collection

Πολυπλεκτικές PCR (Multiplex PCR)



- Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων σε μία μόνο αντίδραση, με διαφορετικό ζεύγος εκκινητών για κάθε στόχο.
- Μείωση κόστους και εξοικονόμηση χρόνου και προσπαθειών χωρίς να διακυβεύεται η χρησιμότητα και η ποιότητα της εξέτασης
- **Multiplex PCR πραγματικού χρόνου:** ταυτόχρονη ανίχνευση 2 έως 5 παθογόνων ειδών, χρησιμοποιώντας ειδικούς για κάθε είδος εκκινητές και ανιχνευτές σημασμένους με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές για κάθε είδος-στόχο.
- Ικανότητα διάκρισης μεταξύ εξαιρετικά στενά συγγενών μικροοργανισμών

Product (Manufacturer)	Τεχνικά χαρακτηριστικά	Specimens	Assay Time	Sensitivity & Specificity
SeptiFast LightCycler (Roche)	α) όχι απαίτηση προηγούμενης καλλιέργειας μυκήτων β) <u>ενίσχυση του DNA απευθείας από τα κλινικά δείγματα</u> (εξοικονόμηση ενός επιπλέον βήματος)	WB	6–7 h	60–86% & 96.1–100%
MycAssay Aspergillus (Myconostica)		Serum, BAL	4 h***	80–100% & 82.4–98.6%
AsperGenius® (PathoNostics)	Διο Multiplex real-time PCR: I: ταυτοποίηση <i>Aspergillus spp.</i> II: ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο CYP51A του <i>A. fumigatus</i> που προκαλούν αντοχή στις αζόλες	BAL, Serum Plasma, Biopsy CSF	<3 h***	65.5–88.9% & 77.8–93.3%

PCR και διάγνωση διεισδυτικής ασπεργίλλωσης (IA)

2020 EORTC/MSG definitions for probable invasive pulmonary mold diseases

Table 10
PCR on bronchoalveolar lavage or cerebrospinal fluid

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Patients undergoing allogeneic stem cell transplantation recipients not on mould-active prophylaxis	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	
Patients with pulmonary infiltrates and haematological malignancies and prolonged neutropenia	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Methodically different in-house assays, better performance in patients without antifungal treatment, PCR and galactomannan: increases specificity
ICU patients, mixed populations	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Commercially available <i>Aspergillus</i> PCR assays with good performance data
Patients with haematological malignancies	To diagnose CNS aspergillosis or meningitis	CSF PCR	B	II	113 CSF samples from 55 immunocompromised patients sensitivity 100%, specificity 93% (retrospective)

Table 11
PCR on whole blood, serum or plasma
Ullmann et al. Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) e1ee38

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	

Μυκητολογικά κριτήρια

- ♦ Άμεση δοκιμή
 - Ανάπτυξη μυκήτων (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* ή *Mucorales*) σε καλλιέργεια από πτύελα, BAL, βρογχικές εκκρίσεις.
 - Μικροσκοπική ανίχνευση μυκητιακών στοιχείων σε πτύελα, BAL, βρογχικές εκκρίσεις
- ♦ Έμμεση δοκιμασία
 - Αντιγόνο GM
 - Οποιοδήποτε 1 από τα ακόλουθα:
 - ✓ Ορός ή πλάσμα: $\geq 1,0$
 - ✓ BAL: $\geq 1,0$
 - ✓ Ορός ή πλάσμα: $\geq 0,7$ και BAL: $\geq 0,8$
 - ✓ ENY: $\geq 1,0$
 - **PCR *Aspergillus***
 - Οποιοδήποτε 1 από τα ακόλουθα:
 - ✓ Θετική PCR σε 2 ή περισσότερα διαδοχικά δείγματα **πλάσματος, ορού ή ολικού αίματος**.
 - ✓ Θετική **PCR** σε 2 ή περισσότερα δείγματα **BAL**
 - ✓ Τουλάχιστον 1 θετική PCR σε πλάσμα, ορό ή ολικό αίμα και 1 θετική **PCR** σε **BAL**

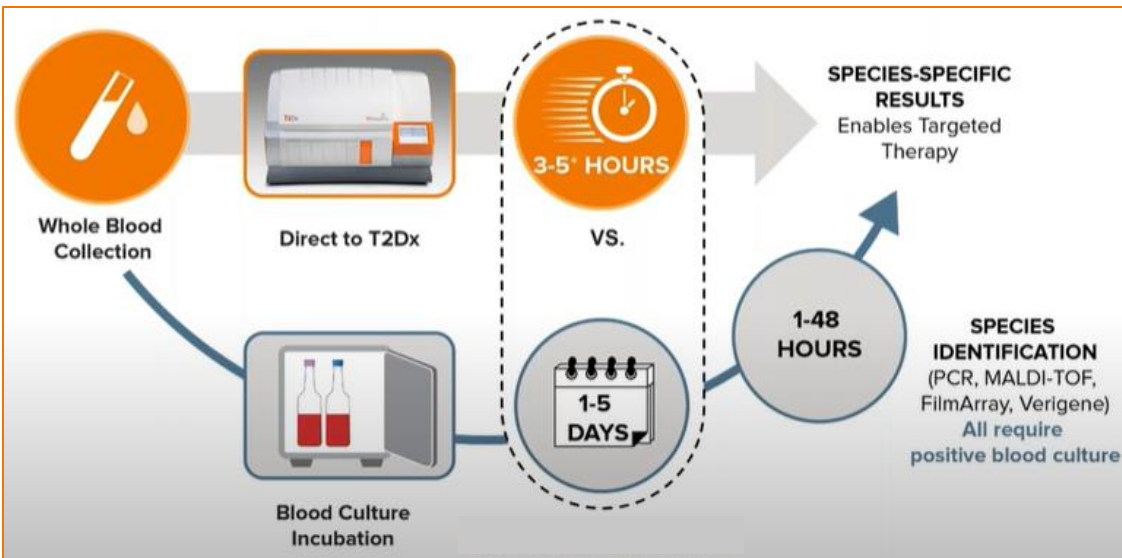
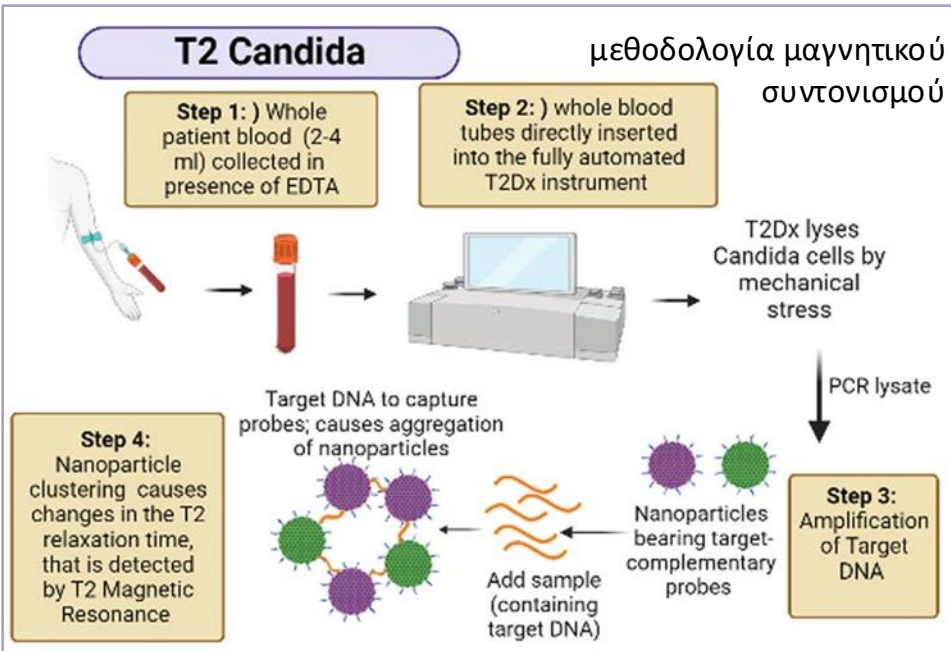
Grades (A: Societies strongly support a recommendation for use, B: Societies moderately support a recommendation for use, C: Societies marginally support a recommendation for use, D: Societies support a recommendation against use)

Quality of evidence (Level I: Evidence from at least one properly designed randomized, controlled trial, Level II: Evidence from at least one well-designed clinical trial, without randomization; from cohort or case controlled analytic studies (preferably from more than one centre); from multiple time series; or from dramatic results of uncontrolled experiments, Level III: Evidence from opinions of respected authorities, based on clinical experience, descriptive case studies, or reports of expert committees.

Εμπορικά διαθέσιμες μοριακές μέθοδοι για ανίχνευση *Candida* spp.

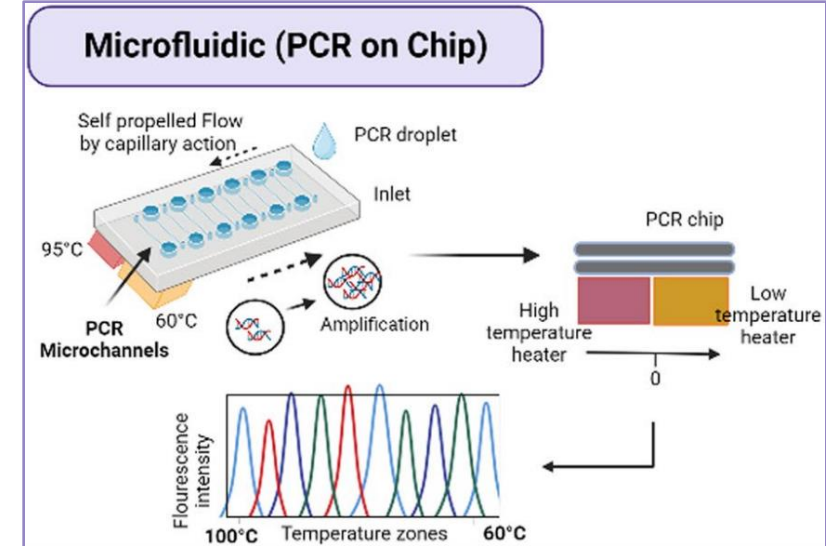
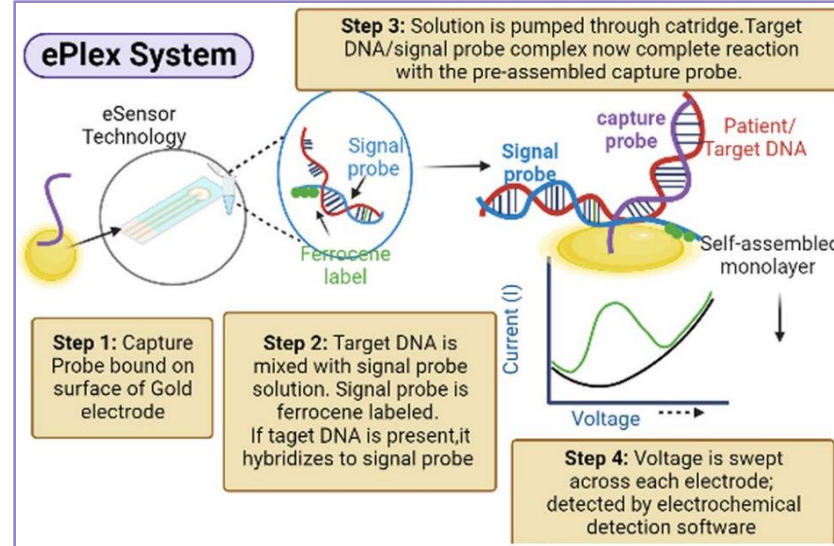
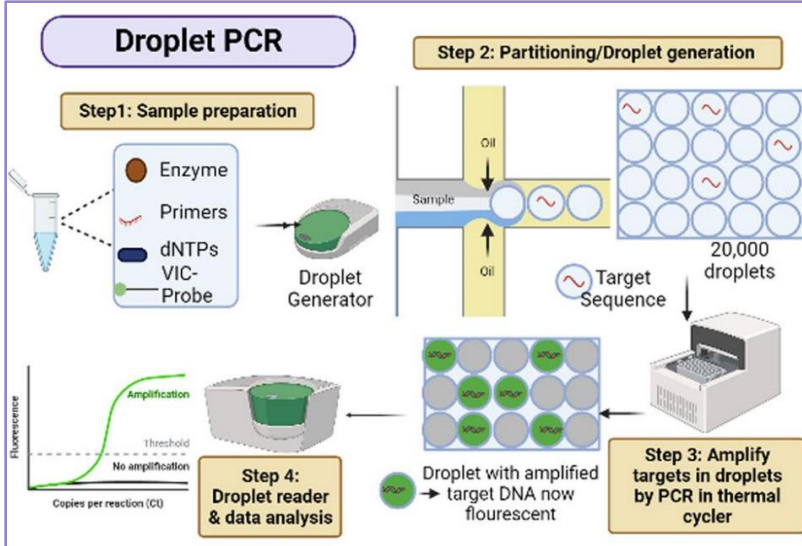
Product (Manufacturer)	Assay method	PCR targets	Detected species	Specimens
CandID® and AurisID® (OlmDiagnostics)	Multiplex Real-time PCR	Unknown	• CandID: <i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> • AurisID: <i>C. auris</i>	CandID: Plasma, Synthetic BAL AurisID: Blood
FungiPlex® Candida & FungiPlex® Candida auris (Bruker)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	WB
T2Candida® (T2 Biosystems)	Integrated extraction & T2 magnetic resonance	ITS2	<i>C. albicans</i> / <i>C. tropicalis</i> , <i>N. glabratus</i> complex / <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> complex	WB
AusDiagnostics Sepsis panel (AusDiagnostics)	Multiplex tandem PCR	ITS1 or ITS2	<i>C. albicans</i> , <i>N. glabratus</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	Unknown
BioFire® FilmArray® Blood Culture Identification (BCID) Panel (bioMérieux)	Integrated extraction & amplification with multiplex PCR & high-resolution melt analysis	Unknown	<i>C. albicans</i> , <i>N. glabratus</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	Positive blood culture
MagicPlex Sepsis Real-Time test (Seegene)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>C. albicans</i> , <i>N. glabratus</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>A. fumigatus</i>	WB
Mycoreal Candida & A. fumigatus (Ingenetix)	Real-time PCR with melt curve analysis	ITS2	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>N. glabratus</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>A. fumigatus</i>	WB, aspirates, punctates, CSF, BAL, tissue and FFPE
SeptiFast Real-time PCR (Roche)	Multiplex real-time PCR	Unknown	<i>C. albicans</i> , <i>N. glabratus</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	WB
SepsiTest-UMD (Molzym Molecular Diagnostics)	PCR and Sanger sequencing	18S rDNA	All fungal species	WB, blood cultures, CSF, BALF, fluids, tissue, swabs, ultrasonic fluids (prostheses)
Sepsis Flow Chip (Master Diagnostica)	Multiplex PCR & hybridisation with DNA microarray	ITS2	<i>C. albicans</i> / <i>C. tropicalis</i> , <i>N. glabratus</i> complex / <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. parapsilosis</i> complex	Blood cultures, rectal exudates, colonies

T2Candida® (T2 Biosystems)



- **FDA USA 2014:** T2Candida® (δεν απαιτείται η πραγματοποίηση καλλιέργειας για τη διάγνωση της καντιντίασης)
- Ταχεία ταυτοποίηση 5 Candida spp. (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* & *C. Glabrata*: > 95% καντινταιμιών) (~ 5 h)
- 2-4 mL ολικού αίματος (και παιδιατρικοί ασθενείς)
- Όριο ανίχνευσης: 1-3 CFU/mL ολικού αίματος vs 100-1000 CFU/mL (συμβατικές PCR μεθόδους)
- Ευαισθησία (91,1%), ειδικότητα (99,4%)
- ↑ NPV (99,4%): διακοπή ή αποκλιμάκωση της αντιμυκητιακής αγωγής → έγκαιρη έναρξη άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων
- Συνιστάται η ενσωμάτωση σε διαγνωστικούς αλγόριθμους σε συνδυασμό με αιμοκαλλιέργειες για αποτελεσματική διαχείριση ασθενών με υποψία διηθητικής καντιντίασης (ΜΕΘ ή άλλα περιβάλλοντα υψηλού επιπολασμού).
- Αντικατάσταση του μη διαθέσιμου πλέον SeptiFast (Roche) για τη διάγνωση της καντινταιμίας (σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους).
- **T2Cauris** vs καλλιέργειες: χρονικό πλεονέκτημα (5h vs 14 d)
- **T2Cauris** vs μοριακές διαγνωστικές δοκιμασίες: >100 φορές ↑ ευαισθησία & ικανότητα ανίχνευσης 5 CFU/mL.

Μοριακές μέθοδοι



- Σε αντίθεση με την qPCR, η ddPCR **δεν απαιτεί πρότυπες καμπύλες ή δείγματα αναφοράς**.
- Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται στο τέλος της αντίδρασης.
- **↓ όγκοι των αντιδράσεων (νανό- και πικόλιτρα)** → μείωση συνολικού κόστους εκτέλεσης & κατάλληλη για **νεογνικούς ασθενείς**
- Ανίχνευση ***A. fumigatus* & *A. terreus*** σε **αναπνευστικά δείγματα**.
- Ανίχνευση DNA ***Candida*** σε **ολικό αίμα** (ευαισθησία: 94% έναντι 69% καλλιέργεια, 79% qPCR)
- **Νεογνικές διεισδυτικές μυκητιακές λοιμώξεις** (υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία: 3,2 αντίγραφα/μL αίματος)

- Τεχνικές μικρορευστοποίησης, PCR & ηλεκτροχημικής ανίχνευσης για **ανίχνευση παθογόνων σε (+) αιμοκαλλιέργειες**
- **16 είδη/γένη μυκήτων** ταυτόχρονα (BCID-FP panel), εκτός από βακτηριακά παθογόνα και σχετικούς δείκτες αντοχής: *C. albicans*, *C. auris*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Fusarium spp* και *Rhodotorula spp*.
- ↑ ειδικότητα (100%) & και ευαισθησία (99,8-100%) για μυκητιακά παθογόνα
- **Συνδυασμός αιμοκαλλιέργειας και ePlex** → συντόμευση του χρόνου αναμονής για ανίχνευση μυκήτων που προκαλούν σήψη (από 72-96 σε 10 h)

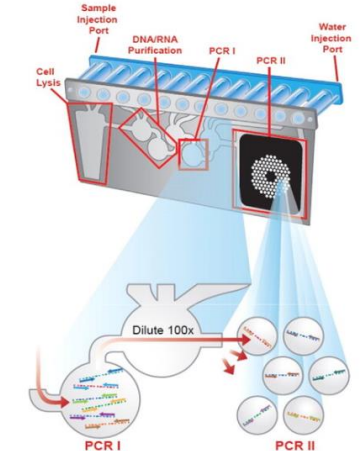
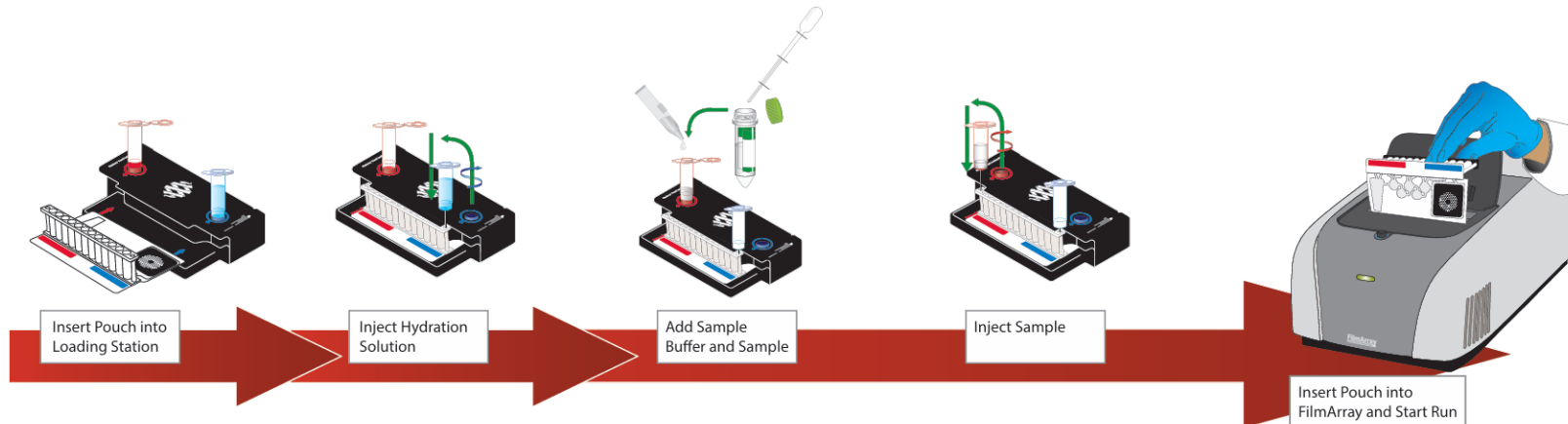
- Ανίχνευση επικρατέστερων παθογόνων μικροοργανισμών σε συστηματικές λοιμώξεις από **(+) αιμοκαλλιέργειες (40 παθογόνα** μεταξύ των οποίων και *Candida spp.*)
- Συνδυασμός multiplex PCR και υβριδισμού-αντίστροφου τυπώματος κηλίδας (Reverse Dot Blot Hybridization).
- Τα ενισχυμένα τμήματα DNA των παθογόνων μικροοργανισμών δεσμεύονται σε ειδικούς ιχνηθέτες προσαρτημένους σε φίλτρο (Flow Chip)
- Απευθείας από (+) αιμοκαλλιέργειες σε **~ 3h**.
- ↑ ευαισθησία (93%) & ειδικότητα (100%) για *Candida spp.*

Εμπορικά διαθέσιμες μοριακές μέθοδοι για ανίχνευση *Pneumocystis jirovecii*

Product (Manufacturer)	Assay method	PCR targets	Specimens
RealStar® <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Altona Diagnostics)	Real-time PCR	mtLSU	Unspecified
PneumoGenius® (PathoNostics)	Multiplex Real-time PCR	mtLSU, DHPS, mutations	BALF
AusDiagnostics Respiratory panel, pneumonia panel, atypical pneumonia panel (AusDiagnostics)	Multiplex Real-time PCR	Unknown	Swabs, sputum, BALF, tissue, nasopharyngeal aspirate
Bio-Evolution <i>Pneumocystis</i> (Bio-Evolution)	Real-time PCR	mtLSU	BALF
<i>Pneumocystis</i> ELITe MGB (ELITechGroup)	Quantitative real-time PCR	mtLSU	Bronchial aspirate, sputum
PneumID (OlmDiagnostics)	Real-time PCR	mtLSU	BALF, washings
Fungiplex® <i>Pneumocystis</i> IVD (Bruker)	Multiplex real-time PCR	Unknown	BALF, throat swabs
MycoReal® <i>Pneumocystis</i> (Ingene9tix)	Real-time PCR	mtLSU	BALF
MycoGENIE® <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Ademtech)	Real-time PCR	mtLSU	Respiratory tract samples
AmpliSens® <i>Pneumocystis jirovecii</i>-FRT (Ecoli Dx)	Real-time PCR	mtLSU	ALF, sputum, oropharyngeal and tracheal aspirates, lung biopsy, oropharyngeal washes, swabs
RIDA® GENE <i>Pneumocystis jirovecii</i> (R-Biopharm)	Multiplex real-time PCR	mtLSU	BALF
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (carinii) (Real-TMSacace)	Real-time PCR	mtLSU	Sputum, BALF, tissue, swabs
LightMix Modular <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Roche)	Real-time PCR	MSG	Unspecified
RealCycler PJIR (Progenie-molecular)	Real-time PCR	mtLSU	BALF

Εμπορικά διαθέσιμες μοριακές μέθοδοι για ανίχνευση *Cryptococcus spp.*

Product (Manufacturer)	Assay method	PCR targets	Specimens
<i>Cryptococcus neoformans</i> real-TM (Sacace)	Real-time PCR	Unknown	CSF, BALF, sputum, WB, skin lesions aspirate, viscera biopsy and autopsy material
BioFire® FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel	Integrated extraction and amplification with multiplex PCR and high-resolution melt analysis	Unknown	CSF, WB
Multiplex Tandem PCR (MT-PCR) CSF and Atypical Pneumonia panels (AusDiagnostics)	Multiplex PCR	Unknown	CSF, swabs, sputum, BALF, tissue, nasopharyngeal aspirate

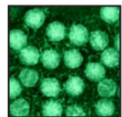


BIOFIRE® FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel



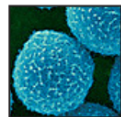
Bacteria

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae



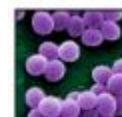
Viruses

Cytomegalovirus (CMV)
 Enterovirus
 Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
 Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
 Human herpesvirus 6 (HHV-6)
 Human parechovirus
 Varicella zoster virus (VZV)



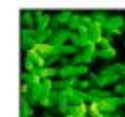
Fungi

* *Cryptococcus neoformans/gattii*



Gram-Positive Bacteria

Enterococcus
Listeria monocytogenes
Staphylococcus
Staphylococcus aureus
Streptococcus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pyogenes
Streptococcus pneumoniae



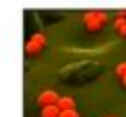
Gram-Negative Bacteria

Acinetobacter baumannii
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacteriaceae
Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae
Proteus
Serratia marcescens



Yeast

Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis



Antibiotic Resistance Genes

mecA - methicillin resistant
vanA/B - vancomycin resistant
KPC - carbapenem resistant

BIOFIRE® Blood Culture Identification 2 (BCID2) Panel

Εμπορικά διαθέσιμες μοριακές μέθοδοι για ανίχνευση Mucorales

Product (Manufacturer)	Assay method	PCR targets	Specimens
MucorGenius® (PathoNostics)	Multiplex Real-Time PCR	28S rDNA <i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Lichtheimia</i> spp., <i>Cunninghamella</i> sp p., <i>Rhizomucor</i> spp.	BALF, biopsies, paraffin-embedded tissue, serum
MycoGenie® Aspergillus spp./Mucorales spp. (Ademtech)	Duplex Real-Time PCR	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizomucor pusillus</i> , <i>Mucor indicus</i> , <i>M. circinelloides</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>R. stolonifera</i> , <i>Lichtheimia corymbifera</i> , <i>L. glauca</i> , <i>Cunninghamella bertholletiae</i> and <i>Mycotypha</i> spp.	Serum, biopsies, lower respiratory tract samples
FungiPlex® Mucorales (Bruker)	Real-Time PCR	<i>Rhizopus</i> spp., <i>Lichtheimia</i> spp., <i>Cunninghamella</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Actinomucor</i> spp., <i>Apophysomyces</i> spp., <i>Saksenaea</i> spp., <i>Syncephalastrum</i> spp.	Serum, plasma, whole blood

- **MucorGenius (Patho-Nostics):**

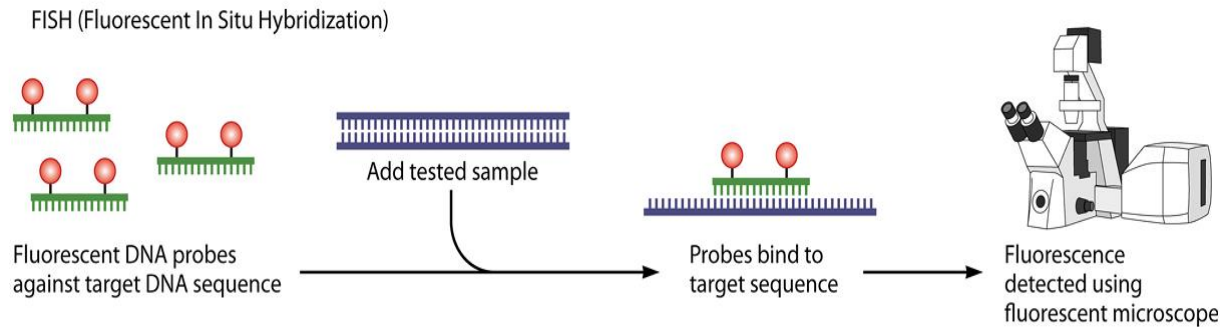
- Διάγνωση διεισδυτικής μουκορμύκωσης (IMM) σε ορό ή δείγματα ιστών (91% ευαισθησία σε δείγματα ιστών)
- Ανίχνευση DNA μουκορμυκήτων σε ορό ασθενών με πιθανή/αποδεδειγμένη IMM (100%).
- 106 δείγματα αίματος από 16 ασθενείς (+) καλλιέργεια για IMM (ευαισθησία 75%). **Τα (+) αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου προηγήθηκαν αυτών της (+) καλλιέργειας κατά μέσο όρο 81 ημέρες** (DNA Mucorales μπορεί να ανιχνευθεί σε ασθενείς με υποψία IMM πολύ νωρίτερα και στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές δοκιμασίες, δίνοντας αρκετό χρόνο για καλύτερο έλεγχο της εξάλειψης της μυκητιακής λοίμωξης από τον ξενιστή).
- **Παράλληλη εκτέλεση με το AsperGenius®** σε ένα δείγμα BAL ⇨ ανίχνευση **συνλοιμώξεων** (βέλτιστη θεραπευτική αγωγή)

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης αντοχής στα αντιμυκητιακά φάρμακα

Fungal Pathogen	Antifungal	New Commercial Platforms
<i>Aspergillus</i> spp.	Triazoles	<p>AsperGenius® Resistance TR Multiplex real-time PCR (PathoNostics)</p> <p>Aspergillus fumigatus TR34</p> <p>Aspergillus fumigatus TR46</p> <p>Aspergillus fumigatus cyp51A (WT): melt curve analysis allows detection of mixed infections</p> <p>AsperGenius® G54/M220 RUO PCR detects G54 and M220 RUO in cyp51A of A. fumigatus</p> <p>MycoGENIE® Aspergillus fumigatus and TR34/L98H (Adamtech)</p> <p>Fungiplex® Aspergillus Azole-R IVD PCR (Bruker Daltonik GmbH)</p> <p>Aspergillus fumigatus TR34</p> <p>Aspergillus fumigatus TR46</p>
Dermatophytes	Terbinafine	<p>DermaGenius® Resistance Multiplex real-time PCR (PathoNostics)</p> <p>T. rubrum/soudanense</p> <p>T. interdigitale/mentagrophytes, T. mentagrophytes (ITS type IV)</p> <p>T. tonsurans</p> <p>T. violaceum</p> <p>Trichophyton quinckeanum/Trichophyton schoenleinii</p> <p>SQLE alterations: Detected via melt curve analysis</p> <p>Leu393Phe, Phe397Leu (predominant mutations)</p> <p>Leu393Ser, Phe397Ile, Phe397Va</p>
<i>P. jirovecii</i>	Trimethoprim/sulfamethoxazole	<p>PneumoGenius® (PathoNostics)</p> <p>Dihydropteroate synthase (DPHS) mutations (codon 55,57)</p>

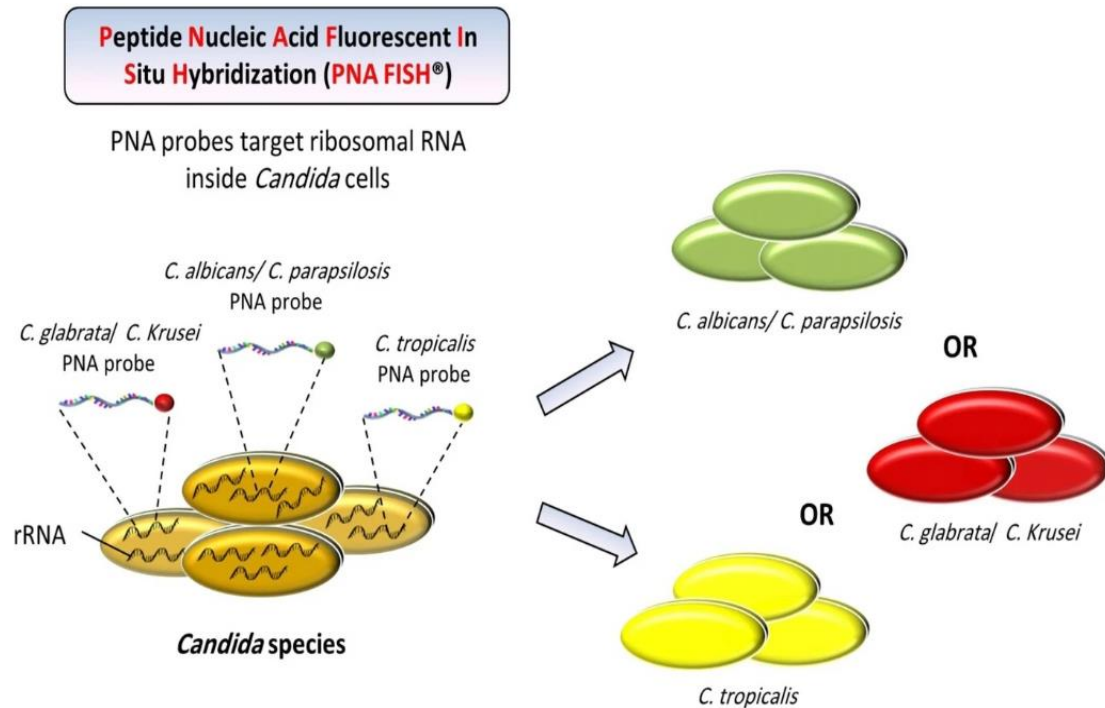
Καθοδήγηση αντιμυκητιακής θεραπείας και επιτήρηση της απόκτησης αντοχής σε αντιμυκητιακά φάρμακα

Νεότερες μοριακές μέθοδοι – PNA-FISH®



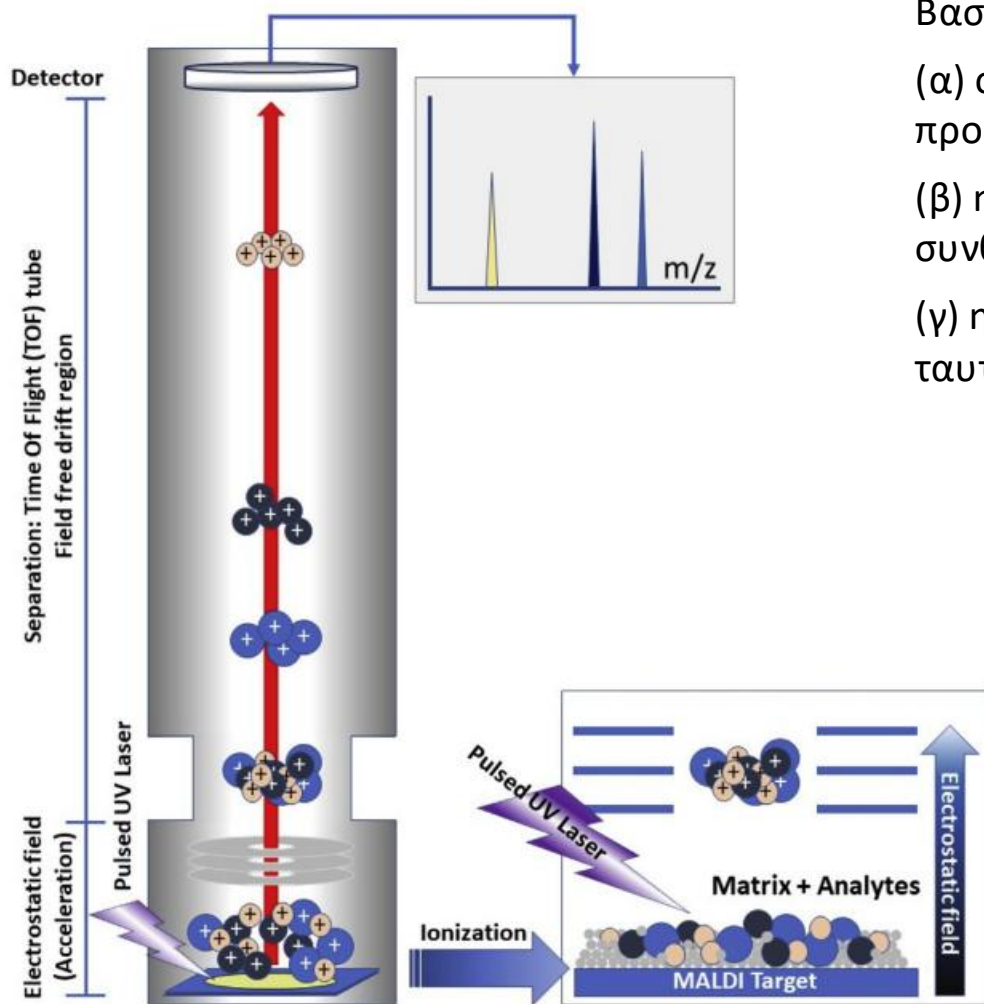
Χρήση ειδικού ανιχνευτή PNA για την άμεση απεικόνιση του *A. fumigatus sensu stricto* (~ 6 h από καλλιέργεια και 24 h σε ποικίλα κλινικά δείγματα ⇒ ↓ χρόνου από την έναρξη καλλιέργειας έως τη λήψη αποτελέσματος (~5 d νωρίτερα). Αν και πρέπει να γίνουν περισσότερες δοκιμές σε κλινικά δείγματα, τα αποτελέσματα της εξέτασης έδειξαν ότι μέθοδος PNA-FISH® μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική λύση στις μη ειδικές και απαιτητικές συμβατικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα στη διάγνωση του *A. fumigatus*.

Cerqueira et al. Microorganisms, 2020;8(12):1950.



Οι φθορίζοντες ανιχνευτές έναντι μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στόχου αναμειγνύονται με το εξεταζόμενο δείγμα και αφήνονται να συνδεθούν με τη συμπληρωματική DNA αλληλουχία τους, εάν υπάρχει στο δείγμα. Στη συνέχεια, η περίσσεια των ανιχνευτών ξεπλένεται, ενώ οι συνδεδεμένοι ανιχνευτές ανιχνεύονται μέσω του φθορισμού τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Νεότερες μοριακές μέθοδοι – MALDI-TOF MS

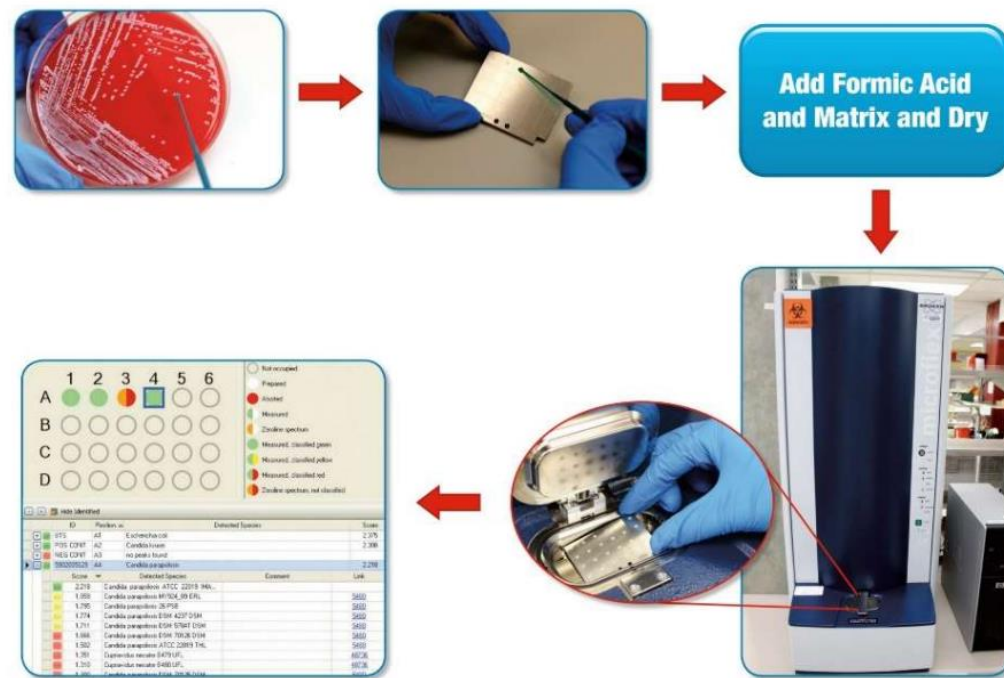


Βασικά στάδια της μεθόδου MALDI-TOF-MS

(α) ο **ιονισμός μακρομορίων**, κυρίως πρωτεϊνών, ενός εύκολα και γρήγορα προετοιμαζόμενου μικροβιολογικού δείγματος

(β) η **επιτάχυνση των ιόντων** προς την περιοχή του ανιχνευτή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιβάλλον κενού και

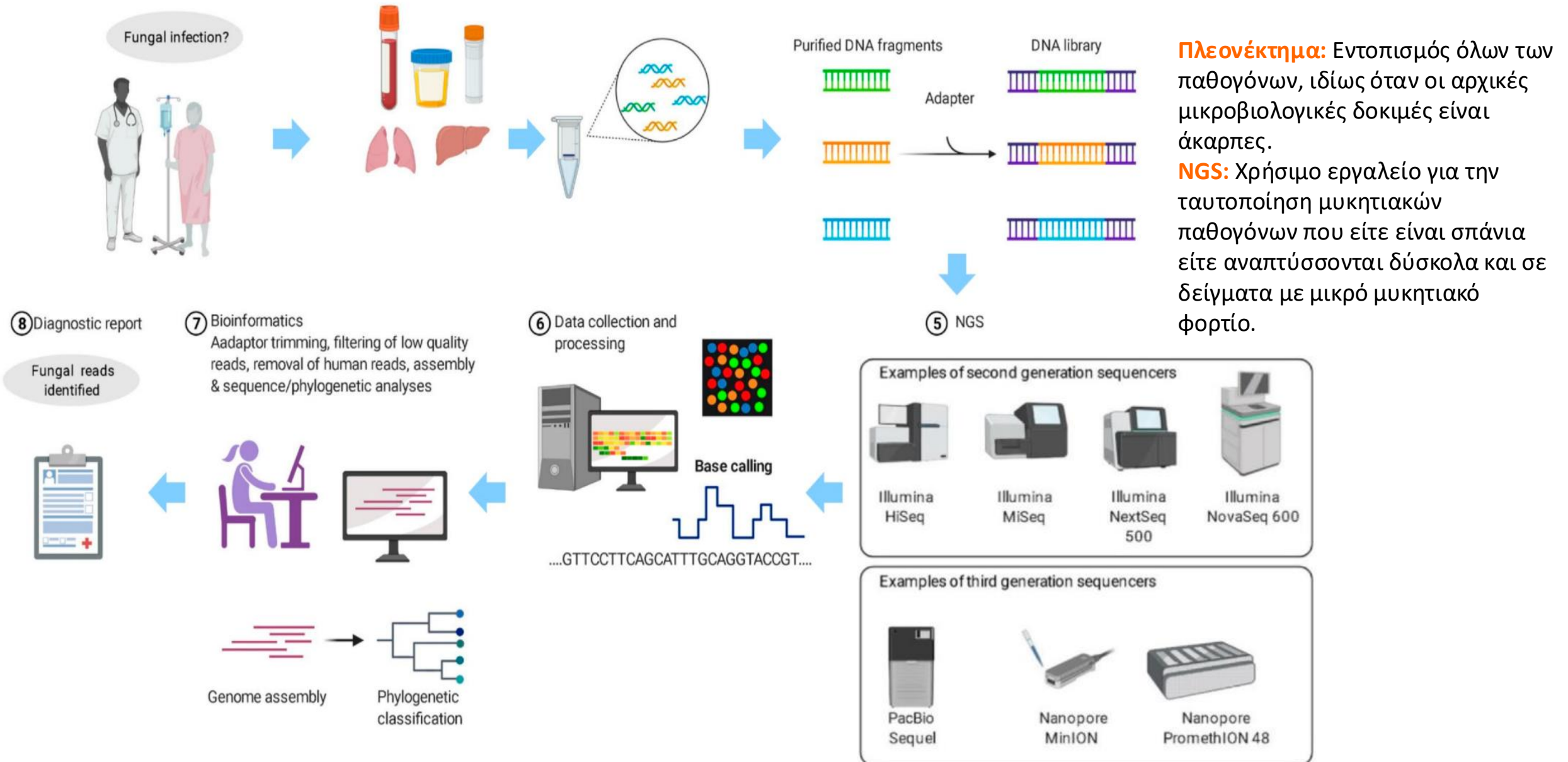
(γ) η ανίχνευση και η ανάλυση των **φασμάτων μάζας** που προκύπτουν και οδηγεί στην ταυτοποίηση των μακρομορίων μέσω του προσδιορισμού του λόγου μάζας προς φορτίο.



Hou et al., J Food Drug Anal., 2019; 27(2):404-414.

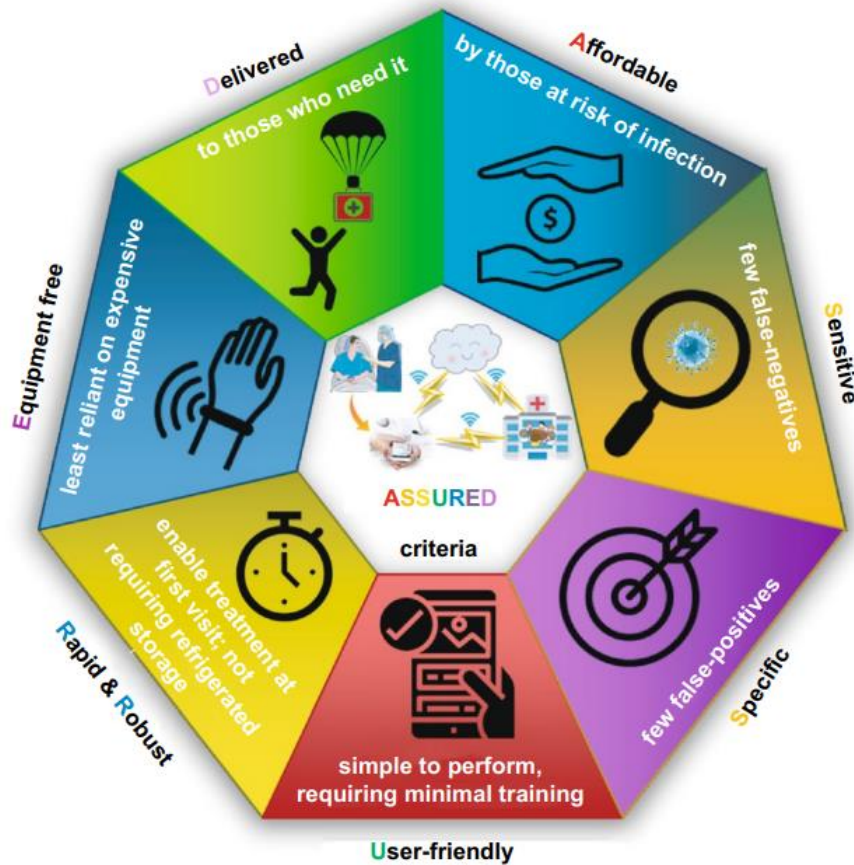
Patel, J Fungi (Basel), 2019;5(1):4

Workflow of using next-generation sequencing (NGS) for diagnosis of suspected fungal infection



POC testing / ASSURED criteria

Point-of-care testing (POCT): το σύνολο των διαγνωστικών εξετάσεων που πραγματοποιούνται **δίπλα ή κοντά στο σημείο παροχής φροντίδας στον ασθενή**. Κύριος στόχος τους είναι **η ταχεία και άμεση έναρξη κατάλληλης θεραπείας** για τους ασθενείς, η λήψη σαφούς και ξεκάθαρης απόφασης διαχείρισης (π.χ. έναρξη θεραπείας ή παραπομπή σε δομές υγείας) το συντομότερο δυνατό (ακόμα και την ίδια ημέρα) και η εφαρμογή της λογικής “test-and-treat”. Τα POCT μπορεί να χρησιμοποιηθούν από επαγγελματίες υγείας, πολίτες, ή ακόμη και από τον ίδιο τον ασθενή (ανάλογα με την συσκευή).



Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO): περιγραφή του ιδανικού POCT με το ακρωνύμιο **ASSURED**.

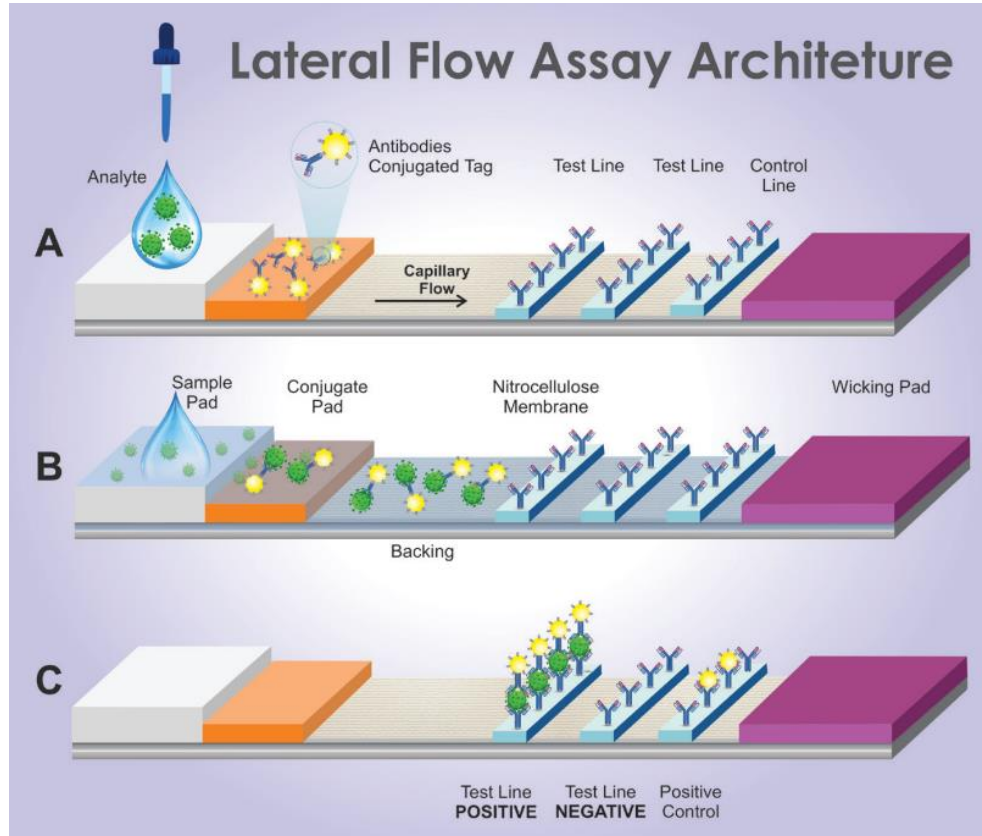
Στη συνέχεια, προτάθηκαν δύο ακόμη κριτήρια για την επέκταση αυτού του ακρωνυμίου: **R** για τη συνδεσιμότητα σε πραγματικό χρόνο και **E** για την ευκολία συλλογής δειγμάτων, εξελίσσοντας το ακρωνύμιο σε **REASSURED**.

ASSURED Κριτήρια - WHO

Affordable	προσιτό στον τελικό χρήστη και στα συστήματα υγείας
Sensitive	ευαίσθητο, αποφυγή ψευδών (-)
Specific	ειδικό, αποφυγή ψευδών (+)
User-friendly	φιλικό προς τον χρήστη
Rapid & robust	γρήγορο & ανθεκτικό
Equipment-free, environment-friendly	χωρίς συνοδό εξοπλισμό, φιλικό προς το περιβάλλον
Delivered	εύκολα παραδοτέο σε όσους το χρειάζονται

Δοκιμασίες πλευρικής ροής (Lateral flow assay, LFA)

Οι δοκιμασίες πλευρικής ροής (LFA) γνωστές και ως ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες πλευρικής ροής, είναι απλές συσκευές με βάση το χαρτί που υποστηρίζουν την ανίχνευση της παρουσίας (ή απουσίας) μιας αναλυόμενης ουσίας στόχου σε υγρό δείγμα χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου και δαπανηρού εξοπλισμού, αν και αρκετές εφαρμογές βασίζονται στο εργαστήριο και υποστηρίζονται από εξοπλισμό ανάγνωσης.



Αρχιτεκτονική ανάλυσης πλευρικής ροής


Τα δείγματα που περιέχουν τον **αναλύτη** ρέουν μέσω της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τριχοειδή ροή (A), μεταφέροντας **αντισώματα αναφοράς** (σημασμένα με χρυσό, λάτεξ ή φθοριόχρωμα) έως ότου το μείγμα αλληλεπιδράσει με τη **γραμμή δοκιμής** (που περιέχει αντισώματα που δεσμεύουν τον αναλύτη που μας ενδιαφέρει) και τη **γραμμή ελέγχου** (που περιέχει αντισώματα anti-IgG που δεσμεύουν μόρια ανθρώπινης IgG) (B). Εάν η γραμμή ελέγχου παρουσιάζει θετική αντίδραση, πρόκειται για έγκυρη δοκιμή. Εάν η γραμμή δοκιμής παρουσιάζει θετική αντίδραση, πρόκειται για θετικό δείγμα για το συγκεκριμένο αναλυτή (Γ).

POCT για κρυπτοκόκκωση

Name of assay	Manufacturer	Assay Type	Specimen	FDA approval	CE approval
IMMY CrAg LFA	Immy, Norman, OK, USA	Qualitative and semi-quantitative	Serum, CSF (FDA), serum, plasma, whole blood, CSF (CE)	✓	✓
BIOSYNEX CryptoPS/Bio-Rad CryptoPS	Biosynex, Strasbourg, France/Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Semi-quantitative	Serum, plasma, whole blood, CSF	None	✓
Dynamiker CrAg LFA	Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin, China	Qualitative	Serum, plasma, CSF	None	✓
FungiXpert Cryptococcal Capsular Polysaccharide Detection K-Set LFA	Genobio Pharmaceutical, Tianjin, China	Qualitative or semi-quantitative	Serum, CSF	None	✓
IMMY CrAgSQ LFA	Immy, Norman, OK, USA	Semi-quantitative	Serum, plasma, whole blood, and CSF	None	None
StrongStep CrAg monoclonal antibody	Liming Bio, Nanjing, Jiangsu, China	Qualitative	Serum, plasma, whole blood, CSF	None	None

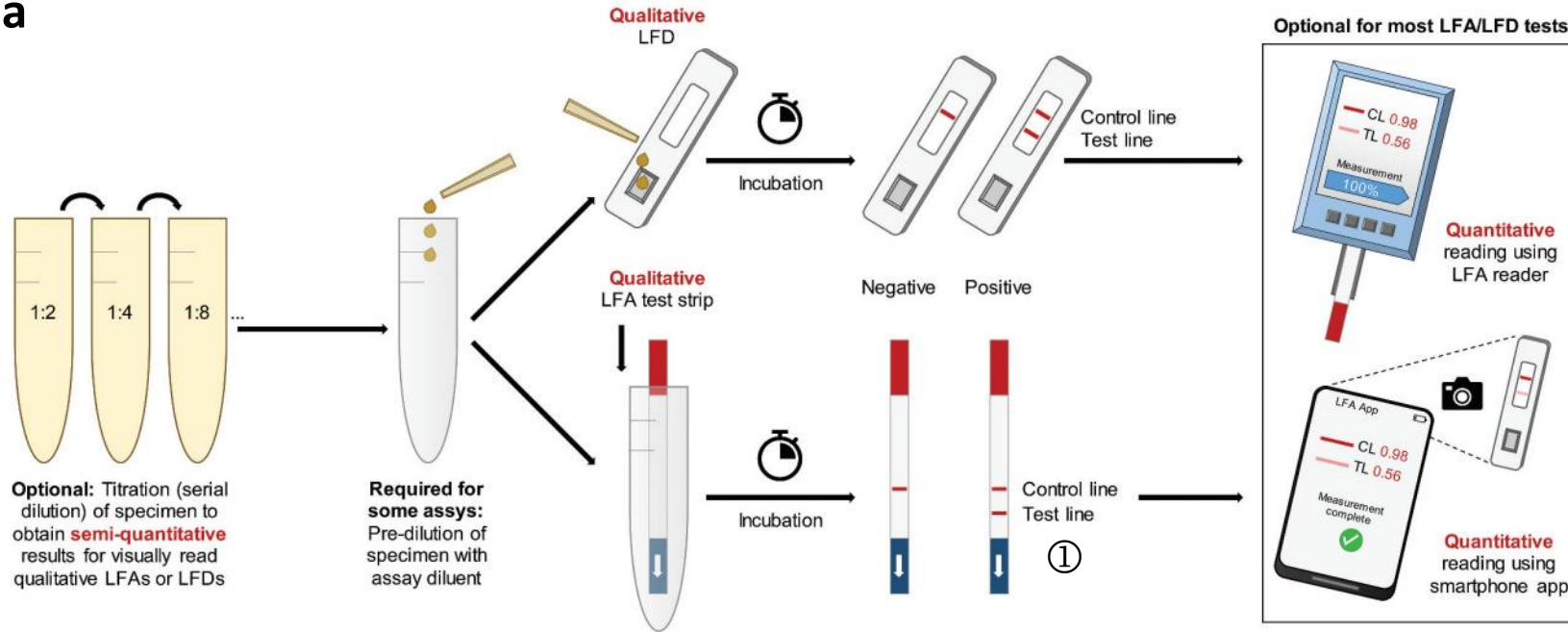
Matsuo et al., Expert Rev Mol Diagn., 2024;24(9):841-858

- **2011, FDA USA, CrAg LFA (IMMY, Norman, OK, USA):** επανάσταση στη διάγνωση της κρυπτοκόκκωσης με μια οικονομικά αποδοτική (2,5 \$/εξέταση) και ταχεία (10 min για λήψη αποτελεσμάτων) ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία
- Τελευταία δεκαετία: **διάγνωση κρυπτοκοκκικής μηνιγγίτιδας (CM) σε HIV ασθενείς** (Μετάβαση από **καλλιέργεια & χρώση με σινική μελάνι** στην **ανίχνευση CrAg με POCT**).
- Ανίχνευση CrAg σε αίμα HIV ασθενών στην Αφρική ⇒ έγκαιρη διάγνωση και προληπτική θεραπεία κρυπτοκόκκωσης
- **Τίτλος CrAg στο αίμα:** εξαιρετικός προγνωστικός δείκτης κινδύνου ανάπτυξης CM και θνησιμότητας
- **Σύσταση WHO:** Χρήση CrAg POCT για έλεγχο ρουτίνας της κρυπτοκόκκωσης σε πλάσμα, ορό ή ολικό αίμα ασυμπτωματικών HIV ασθενών με αριθμό CD4+ κυττάρων < 100 κύτταρα/mm³ πριν από την έναρξη αντιρετροϊκής θεραπείας.

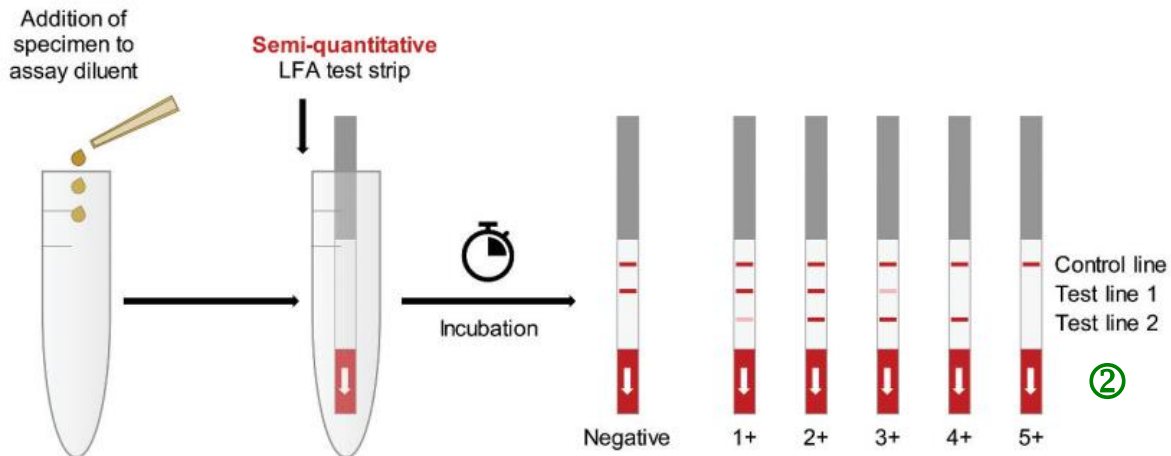
Method	Studies
<p>IMMY CrAg LFA (IMMY)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> 832 HIV ασθενείς, Νότια Αφρική & Ουγκάντα: ENY (SN & SP: >99%), ορός (SN: 99.6% & SP: 92%) ↑ (≥1:160) επίπεδα CrAg LFA σε αίμα: υψηλή προγνωστική αξία για κίνδυνο CM. ↑↑ baseline CrAg τίτλοι (≥1:1,280) σε ENY: συσχέτιση με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας στις 2 και 10 εβδομάδες κατά τη διάρκεια του αρχικού επεισοδίου CM παρά την αντιμυκητιακή θεραπεία. Συστηματική ανασκόπηση(UK), HIV (-) ασθενείς: ↑ ακρίβειας του IMMY CrAg LFA σε ENY (SN: 96%, SP: 96%) & ορό (SN 99%, SP 99%) Ενώ η CrAg LFA χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, μπορεί να εμφανίσει ψευδή (-) αποτελέσματα λόγω φαινομένου προζώνης Έχουν επίσης αναφερθεί ψευδή (+) αποτελέσματα για το CrAg LFA Μεταξύ ασθενών που εξετάστηκαν με CrAg LFA για αρχική διάγνωση κρυπτοκοκκικών λοιμώξεων, περίπου το ένα τρίτο όλων των (+) αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ψευδώς (+), με πολύ χαμηλούς τίτλους (1:2 -1:5). Επομένως, εάν η LFA υποδεικνύει χαμηλό τίτλο, απαιτείται προσεκτική κλινική συσχέτιση κατά τη διάγνωση κρυπτοκοκκικών λοιμώξεων. Νεοδιαγνωσθέντες ενήλικες με HIV στη Νότια Αφρική: Η εξέταση CrAg LFA έχει περιορισμένη SN στο φλεβικό και δακτυλικό αίμα (SN: 46% & 38%, SP: 97%) λόγω μικρότερων κυκλοφορούντων τίτλων CrAg. Κατά την εξέταση σε δείγματα ορού, το CrAg LFA είχε SN 93% & SP 100%. Βραζιλία, έλεγχος αποτελεσματικότητας CrAg LFA με χρήση δακτυλικού αίματος για διάγνωση της κρυπτοκοκκίασης σε 30 HIV(-) ασθενείς (ασθενείς με ανοσοκαταστολή, ασθενείς με άλλες συννοσηρότητες και ασθενείς που ήταν ανοσοκατασταλμένοι και χωρίς συννοσηρότητες) ⇒ SN 97%. Παρόλο που η χρήση ολικού αίματος για την εν λόγω δοκιμασία δεν έχει εγκριθεί από τον FDA USA, το CrAg LFA, σύμφωνα με τον κατασκευαστή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ολικό αίμα (φλεβικό και δακτυλικό).
<p>IMMY CrAgSQ (IMMY)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ημιοσοτική ανίχνευση του CrAg σε διάφορα δείγματα (ορός, πλάσμα, ολικό αίμα, ENY) Ταινία εξέτασης: 3 γραμμές, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε 1 από τις 5 πιθανές διαβαθμίσεις που αντιστοιχούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CrAg

Workflow for lateral flow assays (LFAs) and lateral flow devices (LFDs) used in medical mycology

a



b



(α) Για ορισμένες αναλύσεις, η (ημι)ποσοτική ανάλυση μπορεί να επιτευχθεί με σειριακή προ-αραίωση των δειγμάτων ασθενών ή με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης LFA/LFD ή λύσεων που βασίζονται σε εφαρμογές για την ερμηνεία της έντασης των ζωνών της εξέτασης.

(β) IMMY CrAgSQ LFA (ημιποσοτική LFA κρυπτοκοκκικού αντιγόνου) ως παράδειγμα τροποποιημένης LFA που χρησιμοποιεί **2 γραμμές εξέτασης** για ημιποσοτική αναπαράσταση των τίτλων αντιγόνου.

Method	Studies
CryptoPS BIOSYNEX & CryptoPS CryptoPS BIOSYNEX (Biosynex) CryptoPS (Bio-Rad)	<ul style="list-style-type: none"> BIOSYNEX CryptoPS και IMMY CrAg έχουν παρόμοια ειδικότητα, το BIOSYNEX CryptoPS έχει αναφέρει μεγαλύτερο εύρος ευαισθησίας σε σύγκριση με το IMMY CrAg. 870 οροθετικά άτομα με αριθμό κυττάρων CD4 <200 κύτταρα/mm³ στην Μποτσουάνα: ολικό αίμα, CryptoPS (SN: 61,0%, SP: 96,6%) σε σύγκριση με IMMY CrAg LFA. Η ↓ SN της CryptoPS εξηγείται από ψευδή (-) αποτελέσματα σε δείγματα αίματος με χαμηλούς τίτλους CrAg. LFA Biosynex: αποτυχία ταυτοποίησης ορισμένων ειδών (<i>C. bacillisporus</i> & <i>C. tetragattii</i>).
Dynamiker CrAg LFA (Dynamiker)	<ul style="list-style-type: none"> 365 δείγματα οροθετικών (Ουγκάντα): SN 98-100% (συμπτωματικοί ασθενείς) και SN 96% (ασυμπτωματικοί ασθενείς). SP 66% (ορός), 61% (πλάσμα) και 91% (ENY) για ασθενείς με CM και 86% (ορός) για ασυμπτωματικούς ασθενείς. LFAs Dynamiker: αποτυχία ταυτοποίησης ορισμένων ειδών (<i>C. bacillisporus</i> & <i>C. tetragattii</i>). QuicGXM LFA assay: προηγμένη έκδοση, ημιποσοτική ανάλυση, <u>ανίχνευση φθορισμού</u> (ανάγνωση και ερμηνεία σε ανοσοαναλυτή)
LFA FungiXpert Cryptococcal Capsular Polysaccharide Detection K-Set LFA (Genobio)	<ul style="list-style-type: none"> FungiXpert LFA: SN 99,1% και SP 98,9% σε σύγκριση με το IMMY CrAg LFA. Και οι δύο δοκιμασίες ενδέχεται να παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με <i>Trichosporon asahii</i>.
CrAg monoclonal antibody StrongStep (Liming Bio)	<ul style="list-style-type: none"> 310 δείγματα από HIV (+) ασθενείς με υποψία μηνιγγίτιδας (Ουγκάντα): SN 98% & SP 90% σε πλάσμα, και SN 100%, & SP 98% σε ENY

POCT για ασπεργίλλωση

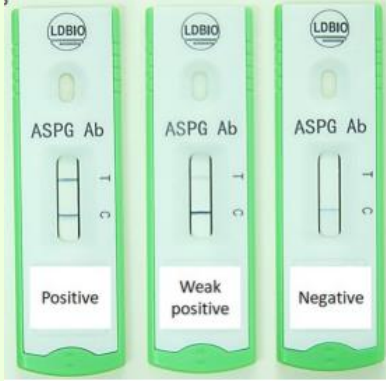
Name of assay	Manufacturer	Assay Type	Specimen	FDA approval	CE marked
IMMY sōna <i>Aspergillus</i> Galactomannan LFA	Immy, Norman, OK, USA	Qualitative or quantitative *	Serum, BAL	None	✓
OLM Diagnostics <i>Aspergillus</i> specific LFD	OLM Diagnostics, Newcastle upon Tyne, UK	Qualitative	Serum, BAL	✓	✓
QuicGM <i>Aspergillus</i> galactomannan Ag LFA	Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin, China	Qualitative	Serum, BAL	None	✓
FungiXpert <i>Aspergillus</i> Galactomannan Detection K-set LFA	Genobio (Era Biology Technology), Tianjin, China	Qualitative	Serum, BAL	None	✓
TECOFast <i>Aspergillus</i> galactomannan Ag LFA	TECOmedical Group, Sissach, Switzerland; Dynamiker, Tianjin, China	Qualitative	Serum, BAL	None	✓
FungiXpert <i>Aspergillus</i> IgG Antibody Detection K-Set LFA	Genobio (Era Biology Technology), Tianjin, China	Qualitative	Serum	None	✓
LDBio <i>Aspergillus</i> ICT IgG – IgM <i>Aspergillus</i> Lateral-Flow Dipstick	LDBio Diagnostics, Lyons, France NA	Qualitative Qualitative	Serum Urine	None None	✓ None



2 lines = positive | 1 line = negative

- ▷ Διάγνωση IA σε ορό & BAL
- ▷ Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση (reader)
- ▷ Αξιολόγηση σε μικτούς πληθυσμούς ανοσοκατεσταλμένων και μη ουδετεροπενικούς ασθενείς.
- ▷ Ψηφιακή ανάγνωση ⇒ βελτίωση δεδομένων

Method	Studies
<p>IMMY sōna Aspergillus GM LFA (IMMY) Ανίχνευση GM 30 min</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sandwich ανοσοχρωματογραφική εξέταση για ποιοτική ανίχνευση της Aspergillus GM από ορό και BAL. ▪ Μικτός πληθυσμός: SN 77% & SP 81% σε BAL, SN 70% & SP 96% σε αίμα ▪ LFA με cut-off 1.5: SN 74% & SP 83% ▪ Η απόδοση της δοκιμής διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του δείγματος και τον πληθυσμό των ασθενών. <ul style="list-style-type: none"> • Ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) με πνευμονική ασπεργίλλωση σχετιζόμενη με ιό: BAL (SN: 76%, SP: 80%), ορός (SN: 55%). • Ουδετεροπενικοί ασθενείς με υποκείμενες αιματολογικές κακοήθειες: αύξηση της SN σε ορό ▪ Sōna LFA Cube Reader (IMMY, ΗΠΑ): αυτοματοποιημένος ψηφιακός αναλυτής (cube reader), συμβολή στην ερμηνεία αποτελεσμάτων ▪ Απαραίτητη προεπεξεργασία του δείγματος ▪ Διασταυρούμενη αντίδραση σε BAL και θετική καλλιέργεια με <i>Scedosporium sp.</i>, <i>Fusarium sp.</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Geotrichum sp</i> ‣ BAL LFD: SN 56% που δεν λαμβάνουν αντιμυκητιακή αγωγή ενώ SN: 86% σε αιματολογικούς ασθενείς ‣ LFD και LFA σε BAL είχαν συγκρίσιμα αποτελέσματα: SN 58%-69% & SP 68%-75%. ‣ Η ανίχνευση μαννοπρωτεϊνών σε BAL από ασθενείς με μεταμόσχευση οργάνων παρουσιάζει χαμηλή απόδοση
<p>Aspergillus-Specific LFD test (OLM Diagnostics) 15 min</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ποιοτική ανίχνευση Aspergillus Ag (μαννοπρωτεΐνη) σε ορό και BAL (Ag απελευθέρωση από τα είδη Aspergillus κατά την ανάπτυξη των υφών) ▪ 104 ασθενείς (56 με αιματολογικές κακοήθειες και 35 υπό κορτικοστεροειδή): Η δοκιμασία GM υψηλότερη SN (90% έναντι 69%) και SP (99% έναντι 79%) από τη δοκιμασία LFD. Διαπιστώθηκε συμφωνία 80% μεταξύ των μεθόδων GM και LFD. ▪ Σύγκριση LFD με GM LFA: ελαφρώς ↓ SN αλλά ελαφρώς ↑ SP της LFD ▪ Η συνολική SN σε όλες τις μελέτες ήταν 64% και η SP 87% κατά την εξέταση δειγμάτων BAL.
<p>QuicGM Aspergillus galactomannan LFA (Dynamiker)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ημιποσοτική δοκιμασία για ανίχνευση GM σε ορό και BAL ▪ Μέτρηση φθορισμού σε αναλυτή ▪ Μικτή ομάδα ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες, διαβήτη, ΧΑΠ και διάμεση πνευμονοπάθεια: ορός (SN 83% & SP 91%), BAL (SN 89% & SP 92%)

Method	Studies
<p>FungiXpert <i>Aspergillus</i> IgG Antibody Detection K-Set LFA (Genobio)</p> <p>LDBio <i>Aspergillus</i> immunochromatography (ICT) IgG – IgM (LDBIO)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Διάγνωση χρόνιας πνευμονικής ασπεργίλλωσης (CPA) ▪ FungiXpert: IgG Abs έναντι <i>Aspergillus</i> σε ορό ▪ LDBio: IgG & IgM έναντι <i>Aspergillus</i> σε ορό ▪ FungiXpert: στερείται μελετών επικύρωσης ▪ LDBio: SN 90%, SP 91% (συστηματική ανασκόπηση, 4 μελέτες) 
<p>FungiXpert <i>Aspergillus</i> Galactomannan Detection K-set LFA (Genobio)</p> <p>TECO®Fast <i>Aspergillus</i> GM Ag LFA (TECOmedical Group)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CE marking, ▪ Μόνο δεδομένα εσωτερικής επικύρωσης, χωρίς μελέτες κλινικών επιδόσεων.
<p><i>Aspergillus</i> lateral-flow dipstick from urine</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Καμία δοκιμασία για τη δοκιμή αντιγόνου <i>Aspergillus</i> σε δείγματα ούρων δεν έχει λάβει έγκριση από τον FDA ή σήμανση CE ▪ Ανίχνευση αντιγόνου GM σε ούρα (χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της γαλακτοφουρανόζης, mAb476) ▪ Διάγνωση IA χωρίς επεμβατική δειγματοληψία ή εργαστηριακή εμπειρία. ▪ Οπτική ερμηνεία αποτελεσμάτων χωρίς πρόσθετο εξοπλισμό. ▪ 78 ασθενείς με ύποπτη ή επιβεβαιωμένη διεισδυτική μυκητιακή λοίμωξη: συνολικά SN & SP για τη διάγνωση αποδεδειγμένης ή πιθανής IA (80% & 92%). Στην υποομάδα με αιματολογικές κακοήθειες, η δοκιμασία είχε ελαφρώς καλύτερη απόδοση (SN 89,5% & SP 90,9%). Ορισμένα από τα ψευδή (+) αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με λοίμωξη από <i>Histoplasma</i>.

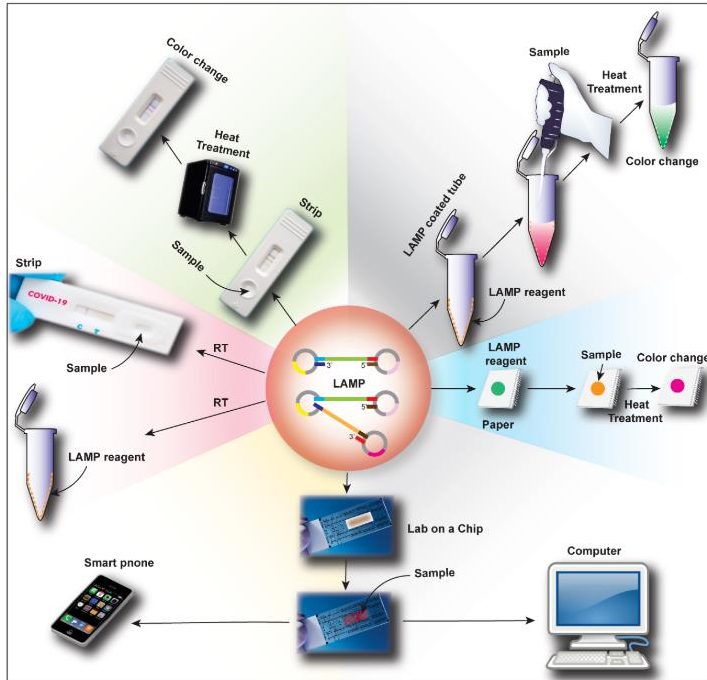
POCT για ενδημικές μυκητιασικές λοιμώξεις

Name of assay	Manufacturer	Assay type	Specimen type	FDA approval	CE approval
MiraVista <i>Histoplasma</i> Urine Antigen LFA	MiraVista Diagnostics, Indianapolis, IN, USA	Qualitative or quantitative	Urine	None	✓
Optimum Imaging Diagnostics (OIDx) <i>Histoplasma</i> LFA	OIDx, Scarborough, ME, USA	Qualitative	Urine	None	✓
IMMY sōna <i>Coccidioides</i> Antibody LFA	IMMY, Norman, OK, USA	Qualitative	Serum, CSF	✓(Serum)	None
Chitinase 1 (CTS1) <i>Coccidioides</i> Antibody LFA	NA	Semi-quantitative	Serum	None	None
<i>T. marneffe</i> i specific monoclonal antibody 4D1-based LFA	NA	Qualitative	Urine	None	None

Method	Studies
<p>MiraVista Histoplasma Urine Antigen LFA (MiraVista Diagnostics)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LFA (ανοσοχρωματογραφία) για οπτική ανίχνευση του αντιγόνου Histoplasma GM σε ούρα ▪ Ασθενείς με HIV και διάχυτη ιστοπλάσμωση: SN & SP >90% ▪ Ανοσοεπαρκείς & ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς σε διάχυτη ιστοπλάσμωση: SP >99%, SP 91% ▪ Ασθενείς με πνευμονική ιστοπλάσμωση: SN 50%, SP 99% ▪ Ασθενείς με εντοπισμένη (π.χ. μόνο πνευμονική) ιστοπλάσμωση: ελάχιστα δεδομένα ▪ Διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες ενδημικές μυκητιακές λοιμώξεις: βλαστομυκητίαση (82%), παρακοκκιδιομυκητίαση (86%), ταλαρομυκητίαση (75%), βλαστομυκητίαση (30%)
<p>Optimum Imaging Diagnostics (OIDx) histoplasma LFA (OIDx)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ EIA (χρήση μονοκλωνικού Ab κουνελιού) για ανίχνευση του αντιγόνου Histoplasma GM σε ούρα ▪ Ασθενείς με υψηλό φορτίο ιστοπλάσμωσης (AIDS και διάχυτη ιστοπλάσμωση): SN 96%, SP 89% ▪ Γκάνα: SP 98% στα ούρα, 98% συμφωνία με IMMY Histoplasma EIA. ▪ 78 HIV (+) ασθενείς με διάχυτη ιστοπλάσμωση) SN 92% & SP 32% ▪ Χρόνια ιστοπλάσμωση: ανεπάρκεια δεδομένων
<p>IMMY sōna Coccidioides LFA assay (IMMY)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ανοσοχρωματογραφική ταινία (dipstick) ανίχνευση Abs έναντι Coccidioides σε ορό ▪ Μείγμα τροποποιημένων και εγγενών αντιγόνων Coccidioides απορροφημένων σε νιτροκυτταρίνη ▪ SN: 31% & SP: 92% σε σύγκριση με την παραδοσιακή EIA ▪ Διάγνωση κοκκιδιοειδούς μηνιγγίτιδας: SN 92-95% & SP 100% σε ENY
<p>Chitinase 1 (CTS1) Coccidioides antibody LFA</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Μέτρηση επιπέδων αντισωμάτων έναντι Coccidioides σε ορό ▪ SN 100% σε σχέση με 71% με IMMY sōna LFA ▪ δεν απαιτεί προαραίωση του ορού ▪ Συσκευή ανάγνωσης LFA (reader) για ημιποσοτικές αναγνώσεις (πυκνότητα γραμμής δοκιμής) ⇒ πιο αντικειμενικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την LFA IMMY (υποκειμενική οπτική ερμηνεία)

POCT μοριακές μέθοδοι

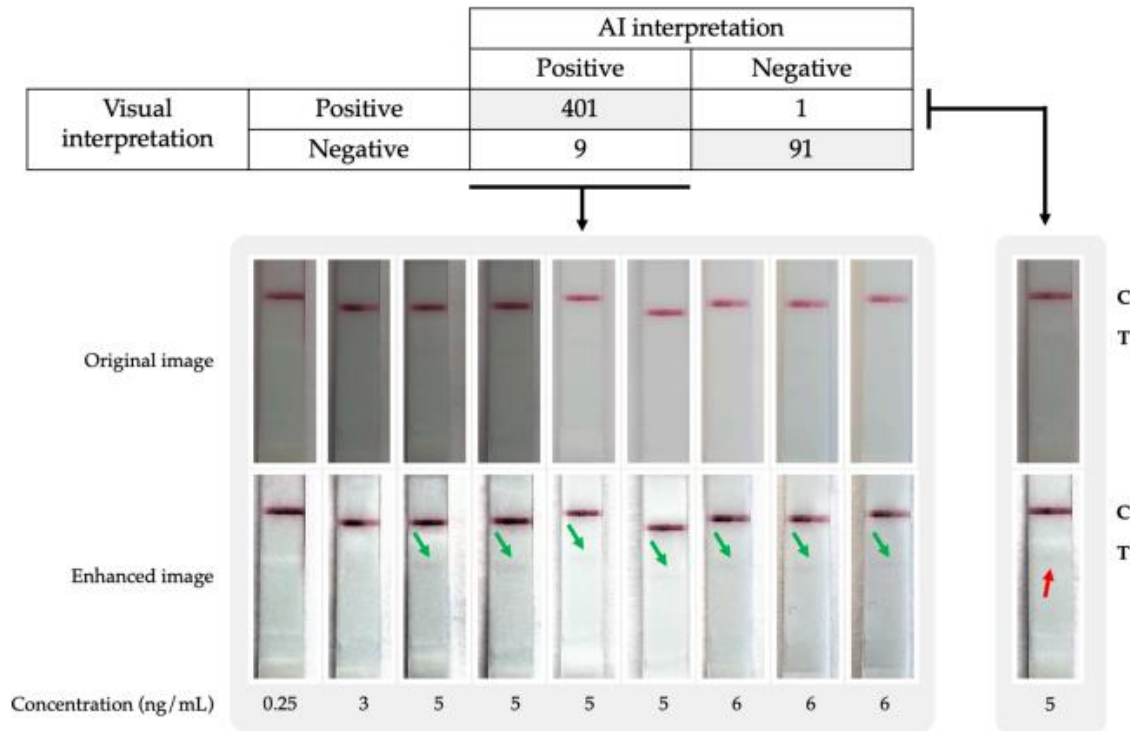
Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)



- Καινοτόμος και οικονομικά αποδοτική τεχνική ενίσχυσης DNA που είναι εύκολη στη χρήση χωρίς εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.
- Κατάλληλη για επιτόπιες εξετάσεις POCD και για άμεση χρήση από κλινικούς ιατρούς.
- **LAMP: ενίσχυση DNA σε ένα μόνο σωληνάριο σε σταθερή θερμοκρασία 60-65°C.** Χρήση 2 ή 3 σετ εκκινητών μαζί με ένζυμο πολυμεράσης (υψηλής δυναμότητας μετατόπισης και αντιγραφής κλώνων). Η ανίχνευση των προϊόντων διευκολύνεται με χρωματομετρικές ή φθορίζουσες χρωστικές.
- Παρόλο που οι περισσότερες τρέχουσες εφαρμογές της LAMP δεν πληρούν πλήρως τα κριτήρια για POCD (απαιτήσεις για ηλεκτρική ενέργεια, όργανα πάγκου και εκπαιδευμένους τεχνικούς), έχει σημειωθεί πρόοδος προς την κατεύθυνση να καταστεί η LAMP περισσότερο φορητή και προσιτή.

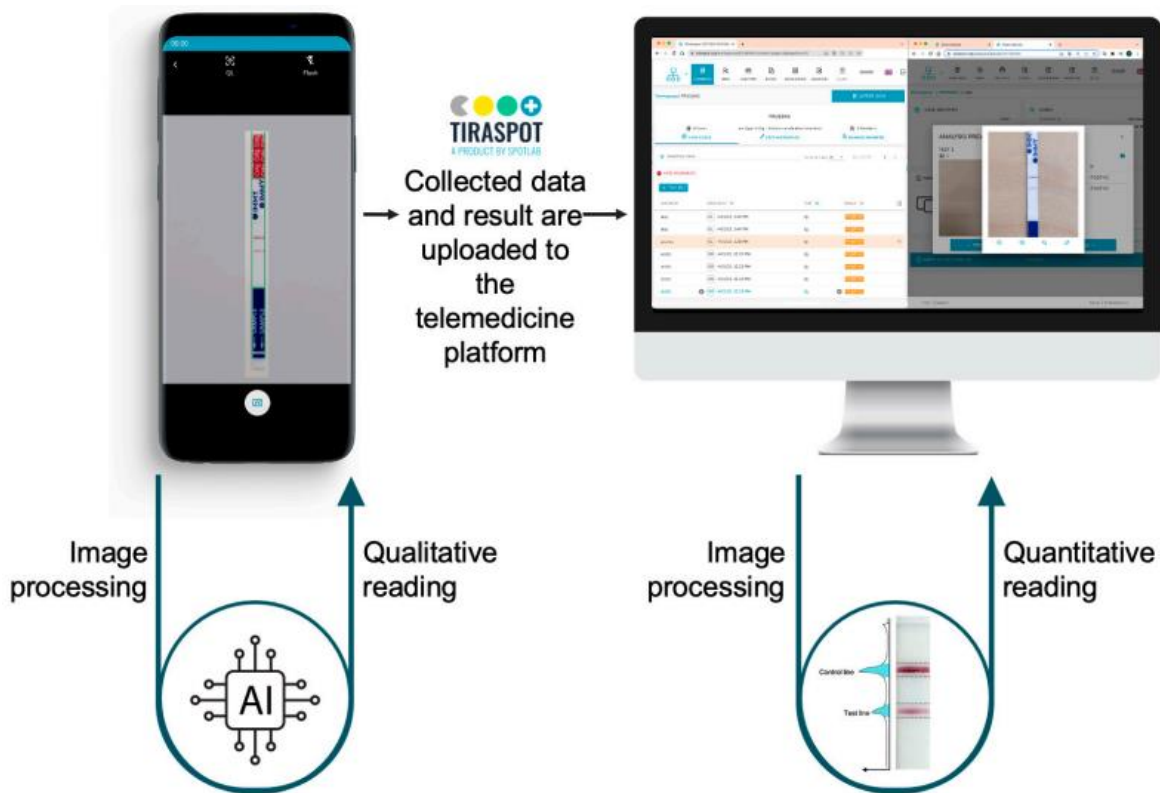
- ♦ *A. fumigatus*: ασθενείς με πιθανή/αποδεδειγμένη ΙΑ, σύγκριση με συμβατική qPCR ⇒ SN: 89%, ποσοστό συμφωνίας 72%.
- ♦ *C. albicans* (βιοαισθητήρας πλευρικής ροής με βάση νανοσωματίδια, 6 εκκινητές, γονίδιο στόχος ITS2)
- ♦ Mucorales (μαγνητικά νανοσωματίδια, γονίδιο στόχος CotH)
- ♦ *Candida auris* (Eazyplex® *Candida auris* kit: 100% συμφωνία με καλλιέργεια, SN 91,8%, SP 98,8%, PPV 98,2%, NPV 94,5%)
 - Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση 9 μελετών: διάγνωση με LAMP για διαδεδομένα παθογόνα μυκήτων στον άνθρωπο (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Histoplasma*, *Trichophyton*) (SN 71-100%, SP 13-100%). Ανάλογα με το δείγμα: SP 87-100% σε πτύελα, 53-100% σε αίμα και BAL)
- ♦ Ανίχνευση αντοχής σε αντιμυκητικά φάρμακα.

Digital Platform for Automatic Qualitative and Quantitative Reading of a CrAg POCT Leveraging Smartphones and Artificial Intelligence



- Η χρήση μιας **εφαρμογής AI** που έχει σχεδιαστεί ειδικά για την **ανάγνωση και ερμηνεία των POCT** συνεπάγεται μια **αυτόματη, αντικειμενική και τυποποιημένη διαδικασία** που **μειώνει την υποκειμενική ερμηνεία** και καλύπτει τους εγγενείς περιορισμούς που σχετίζονται με την οπτική ανάγνωση της εξέτασης (διαφορετικοί εργαζόμενοι, με διαφορετική εκπαίδευση και με διαφορετική οπτική οξύτητα).

Digital Platform for Automatic Qualitative and Quantitative Reading of a CrAg POCT Leveraging Smartphones and Artificial Intelligence



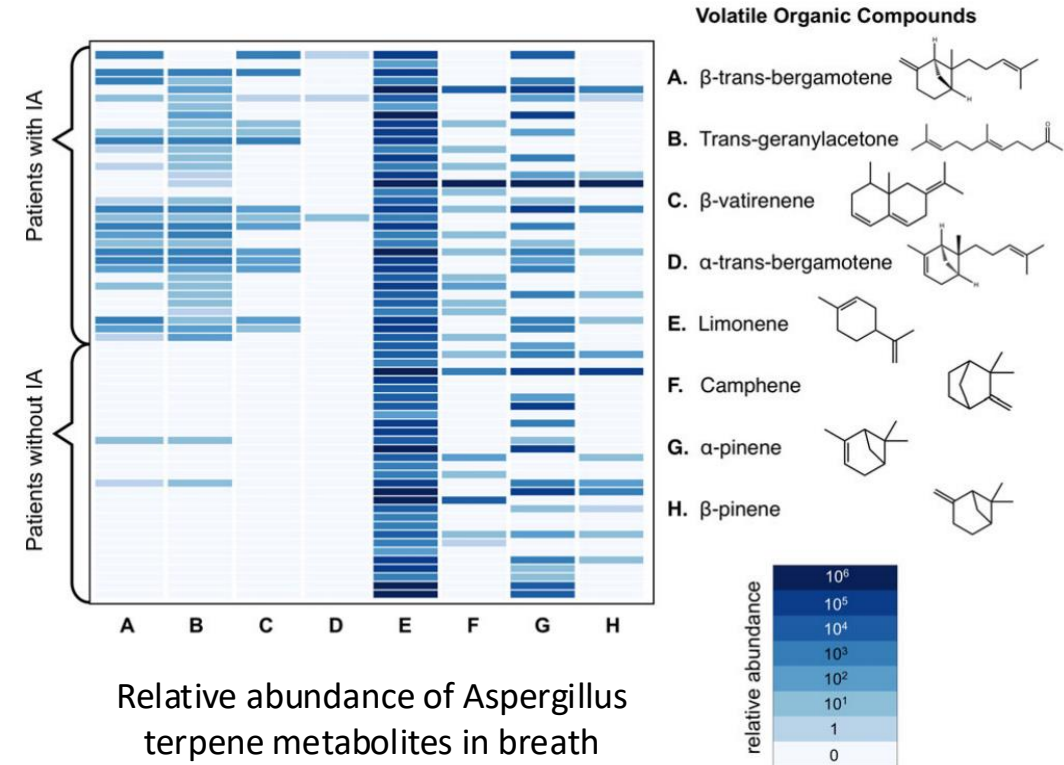
- Η χρήση μιας **εφαρμογής AI** που έχει σχεδιαστεί ειδικά για την **ανάγνωση και ερμηνεία των POCT** συνεπάγεται μια **αυτόματη, αντικειμενική και τυποποιημένη διαδικασία** που **μειώνει την υποκειμενική ερμηνεία** και καλύπτει τους εγγενείς περιορισμούς που σχετίζονται με την οπτική ανάγνωση της εξέτασης (διαφορετικοί εργαζόμενοι, με διαφορετική εκπαίδευση και με διαφορετική οπτική οξύτητα).
- Τα **smartphones** αποτελούν ένα παγκόσμιο εργαλείο που έχει δείξει **μεγάλη ικανότητα συλλογής και μετάδοσης δεδομένων**. Οι αλγόριθμοι τεχνητής νοημοσύνης που ενσωματώνονται σε κινητά τηλέφωνα μπορούν να συμβάλλουν στη διάγνωση ασθενειών, ιδίως όταν υπάρχουν POCTs υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, όπως είναι η περίπτωση του CrAg LFA.

➤ Η **ψηφιοποίηση του LFA** επιτρέπει τη **γρήγορη επικοινωνία** με τους θεράποντες ιατρούς, την **ταχεία έναρξη θεραπείας** αυξάνοντας τις πιθανότητες επιβίωσης, τη **λήψη δεύτερης γνώμης** καθώς και την **αποθήκευση των αποτελεσμάτων και των δεδομένων** του ασθενούς σε μια βάση δεδομένων στο cloud, η οποία διευκολύνει, μεταξύ άλλων, την εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου που διερευνάται.

Πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile organic compounds, VOC) στην αναπνοή

- Η ανάπτυξη διαφόρων τεχνολογιών ανίχνευσης VOC (gas chromatography, 'electronic nose' sensors, and nanomaterial gas sensors) έχει βελτιώσει σημαντικά τη συλλογή VOC που σχετίζονται με παθογόνα.
- Επί του παρόντος, δεν είναι έτοιμες για κλινικές εφαρμογές POCT, αλλά εξελίσσονται με ταχείς ρυθμούς.
- Στην κλινική μυκητολογία, αυτές οι αναδυόμενες τεχνολογίες προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες για τη βελτίωση της διάγνωσης μυκητιακών λοιμώξεων όπως η IA.
- Ένα συγκεκριμένο μοτίβο ενώσεων (α -trans-bergamotene, β -trans-bergamotene, a β -vatirenene – like sesquiterpene, and transgeranylacetone) μπορεί να διακρίνει άτομα με πνευμονική IA από εκείνα που διαγνώστηκαν με πνευμονία διαφορετικής αιτιολογίας (συμπεριλαμβανομένων άλλων διεισδυτικών μυκητιάσεων) (SN 94%, SP 93%).
- Η άμεση ανίχνευση εξωγενών μυκητιακών μεταβολιτών στην αναπνοή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια νέα, μη επεμβατική προσέγγιση για ταυτοποίηση της ακριβούς μικροβιακής αιτίας της πνευμονίας.

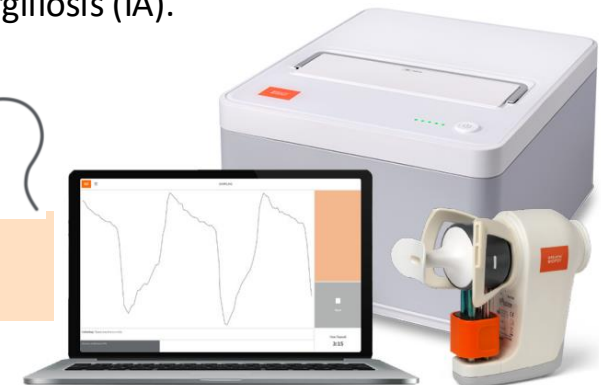
Koo et al., Clin Infect Dis., 2014; 59(12): 1733-1740).

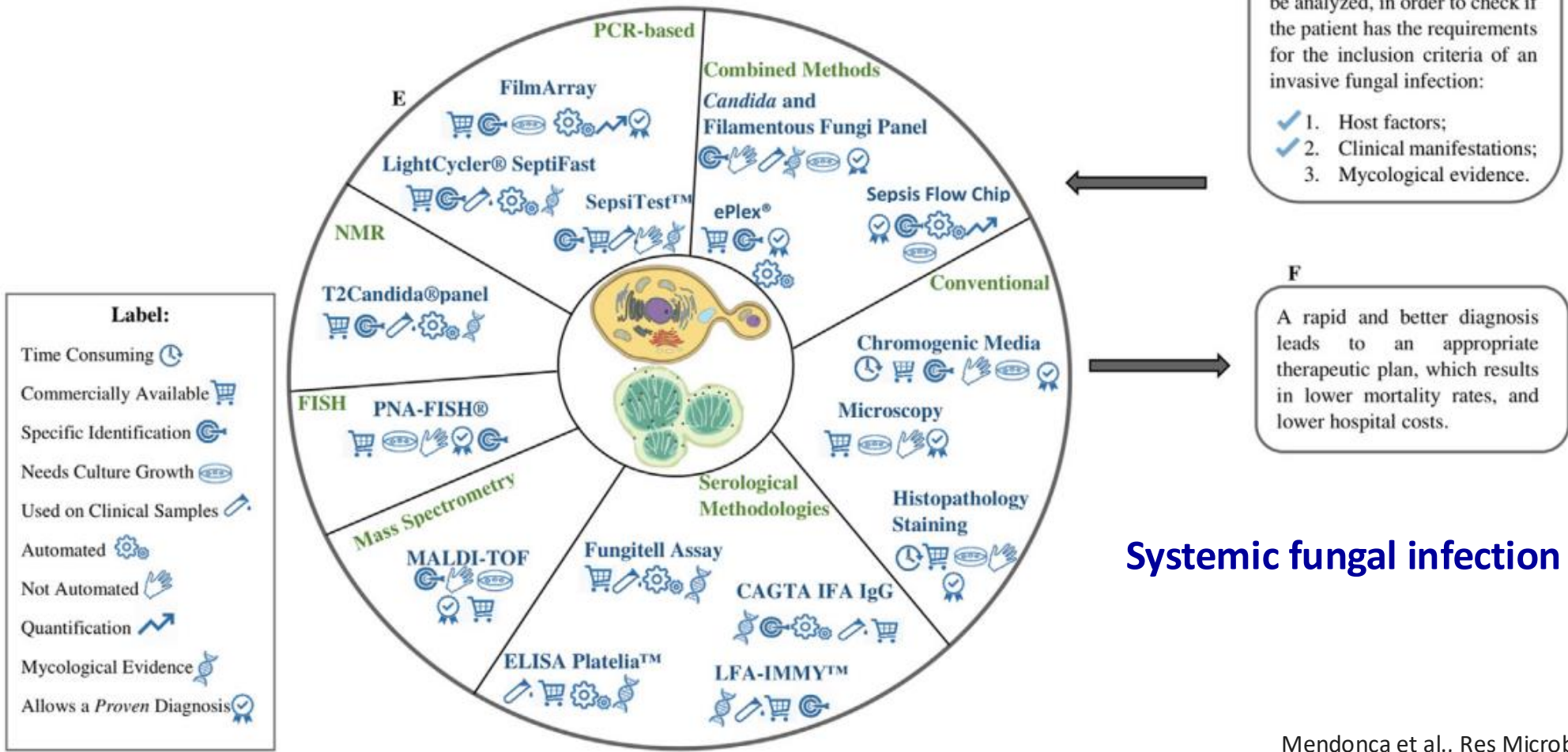
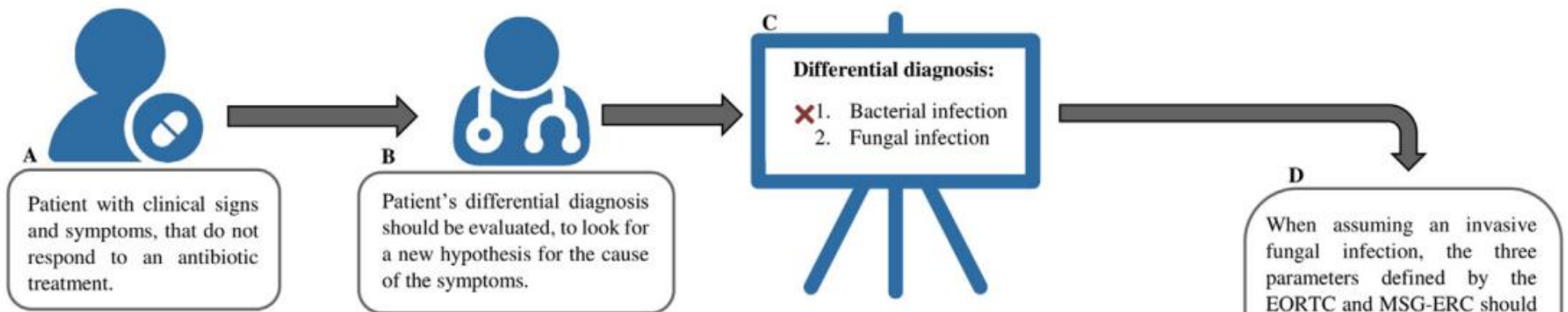


Relative abundance of *Aspergillus* terpene metabolites in breath samples of 64 patients with and without invasive aspergillosis (IA).



Breath Biopsy
Collection Station





Systemic fungal infection diagnosis workflow

Συμπεράσματα

- Ο θετικός αντίκτυπος των ορολογικών δοκιμασιών στη διάγνωση της μυκητιακής νόσου είναι προφανής καθώς το 65% των κατευθυντήριων οδηγιών διάγνωσης των μυκητιακών λοιμώξεων και επιτήρησης της αντιμυκητιακής αγωγής, περιλαμβάνουν τη χρήση GM και BDG.
- Η διαθεσιμότητα αυτοματοποιημένων συστημάτων για ανίχνευση ορολογικών διαγνωστικών δεικτών (κυκλοφορούντα μυκητιακά αντιγόνα και αντισώματα) αντιπροσωπεύει μια σημαντική τεχνολογική εξέλιξη, αλλά χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της κλινικής τους εγκυρότητας.
- Οι δοκιμασίες ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής (Point-of-care tests, POCT), που χρησιμοποιούνται για τη ανίχνευση των μυκητιακών Ag και Abs, αντιπροσωπεύουν επίσης μια σημαντική εξέλιξη τόσο σε περιοχές με περιορισμένους πόρους για τη διάγνωση των μυκητιακών λοιμώξεων, όσο και σε διαγνωστικά κέντρα όπου η ανάγκη γρήγορου αποτελέσματος υπονομεύει τη χρήση δοκιμασιών υψηλής απόδοσης.

Συμπεράσματα

- Ο συνδυασμός διαφορετικών διαγνωστικών μεθόδων (συνδυασμός διαφορετικών Ag, Ag με Ab, Ag/Ab με μοριακή μέθοδο) και η χρήση διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων (ορός, BAL) συμβάλλει στη βελτίωση της διαγνωστικής απόδοσης.
- Μη καλλιεργητικές μέθοδοι: δοκιμές για μυκητιακά Ags, DNA ή Abs σε κλινικά δείγματα (π.χ. CrAg σε ορό & ENY, GM σε ορό, BAL & ENY, BDG σε ορό και μοριακές δοκιμές).
- GM σε ορό: υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για διάγνωση IA σε ουδετεροπενικούς ασθενείς (σε μη ουδετεροπενικούς προτείνεται η GM σε BAL).
- LFD (συσκευή πλευρικής ροής) για διάγνωση IA (παρόμοια απόδοση με GM).
- BDG: παρούσα σε όλες τις διεισδυτικές μυκητιασικές νόσους, με εξαίρεση την μουκορμύκωση και την κρυπτοκόκκωση (2 διαδοχικά θετικά αποτελέσματα έχουν υψηλή ειδικότητα σε αιματολογικούς ασθενείς).
- POCT για IPA: LFA και LFD για διεισδυτική ασπεργίλλωση είναι ce-marked (BAL και ορός)
- POCT για κρυπτοκόκκωση: LFA CrAg είναι gold standard (ορός και ENY)



Σας ευχαριστώ πολύ για
την προσοχή σας