



Javier Pemán
Unidad de Micología
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario La Fe
Valencia



Diagnóstico microbiológico de la IFI

Palma de Mallorca, 11 febrero 2010



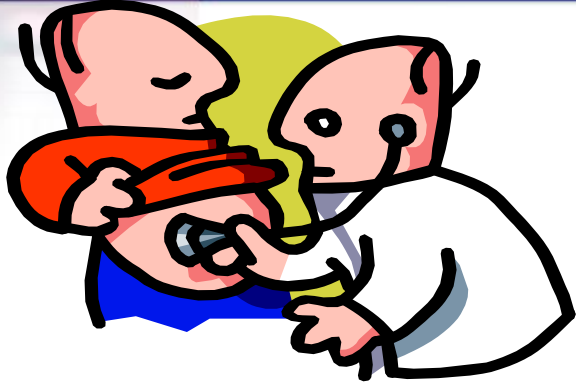
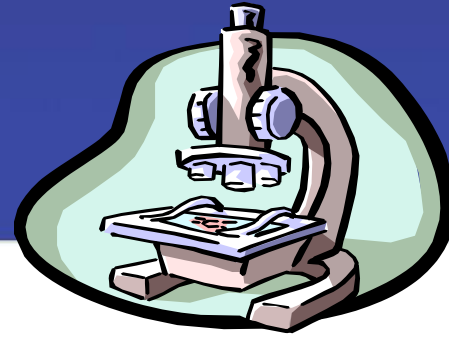
Agenda

- 1. Examen microscópico directo**
- 2. Cultivo de hongos:**
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
- 3. Detección de Ag**
- 4. Dtico serológico**
- 5. Técnicas moleculares**





Diagnóstico micológico



Sospecha clínica

**Procedimientos
laboratorio**

**Detección del
organismo en el
tejido**

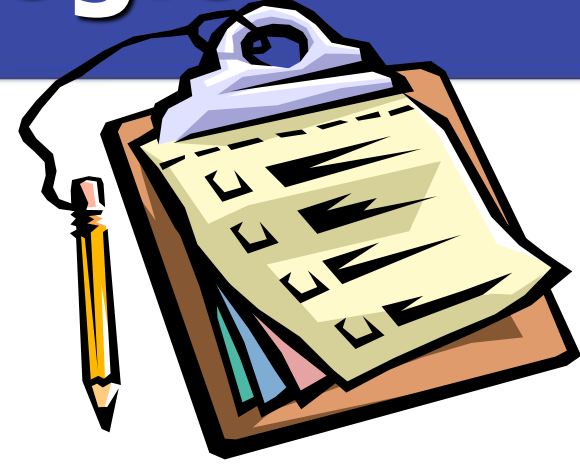
**Cultivo de la
muestra**

**Aislamiento
Identificación**

**Confirmación sospecha clínica
Elección tratamiento específico**



Diagnóstico micológico



■ **Requerimientos clínicos:**

■ **Datos clínicos** de interés:

- Comienzo, Evolución, Tratamientos, ...

■ **Datos epidemiológicos:**

- Trabajo, Contacto con animales, Viajes, etc.

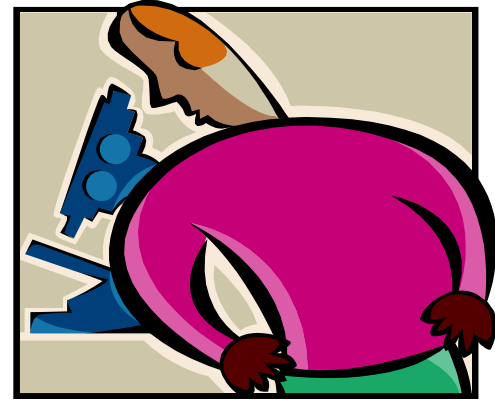
- **Envío de muestras** correctamente identificadas y en el contenedor adecuado





Agenda

- 1. Examen microscópico directo**
- 2. Cultivo de hongos:**
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
- 3. Detección de Ag**
- 4. Dtico serológico**
- 5. Técnicas moleculares**





Examen microscópico directo

■ **Ventajas:**

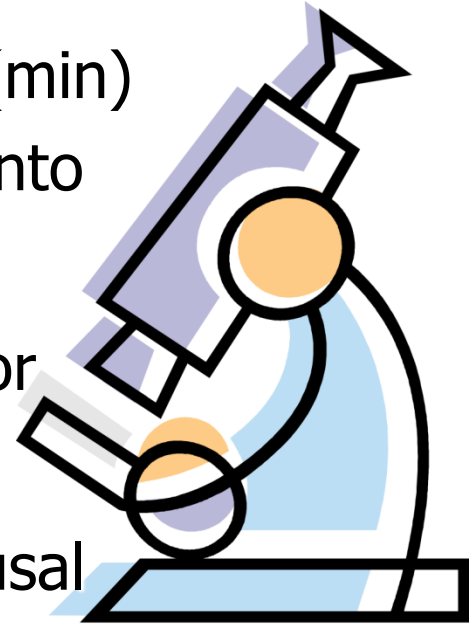
- Permite un diagnóstico presuntivo rápido (min)
- Facilita la instauración precoz del tratamiento

■ **Rentabilidad:**

- En función de la experiencia del observador

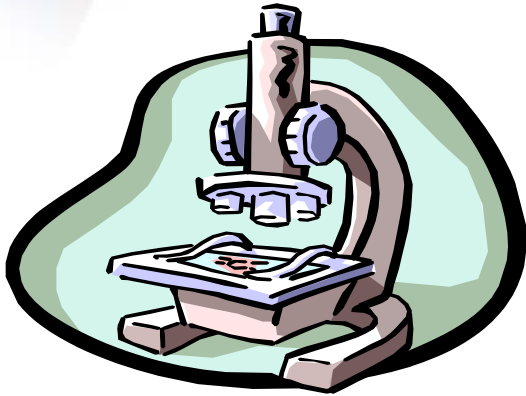
■ **Inconvenientes:**

- No permite la identificación del agente causal





Microscopía y Cultivo



Sensibilidad diagnóstica:

15 - 20% > Cultivo sólo

Denning, CID 1998

Microscopía “directa”

■ Muestras válidas:

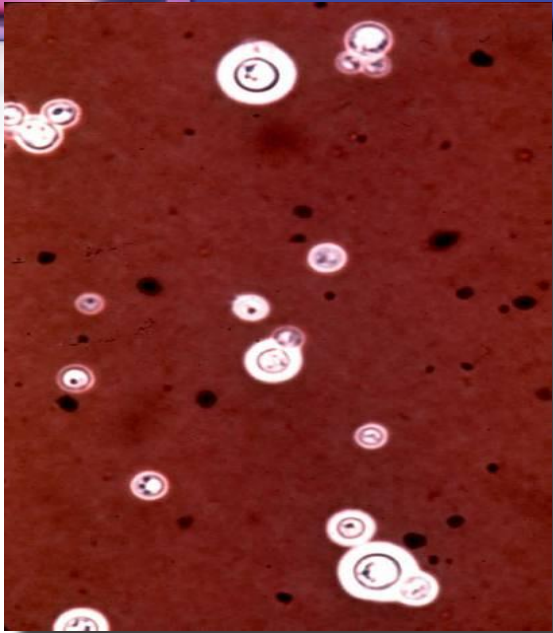
- Líquidos estériles, biopsias
- Respiratorias (LBA, AT, BAS)
- Abscesos, heridas
- ...

● Técnicas microscópicas:

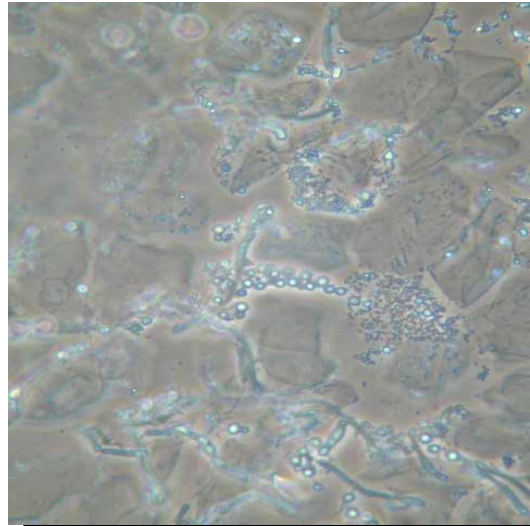
- KOH
- Contraste de fases
- Tinciones específicas:
 - Calcoflúor ←
 - Plata metenamina, PAS



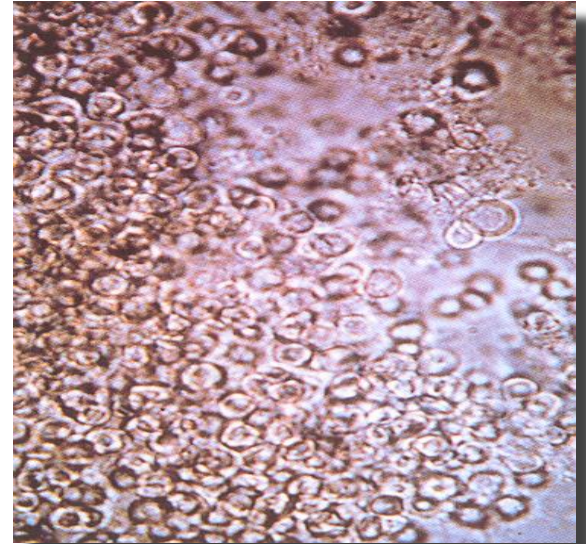
Examen microscópico directo



C. neoformans



Malassezia spp.



Scopulariopsis spp.

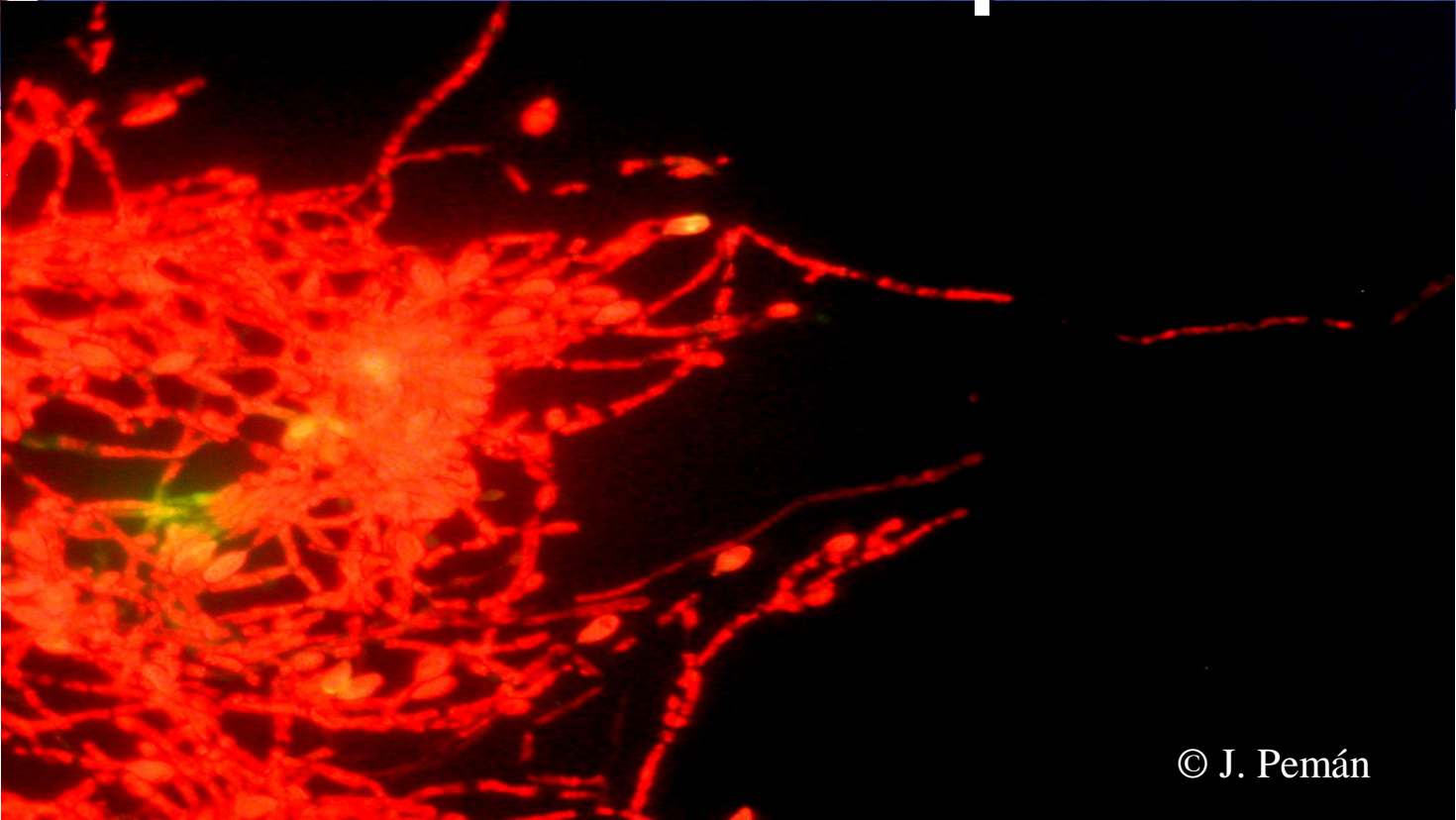
Examen microscópico directo



© J. Pontón

Blanco de Calcoflúor

Examen microscópico directo



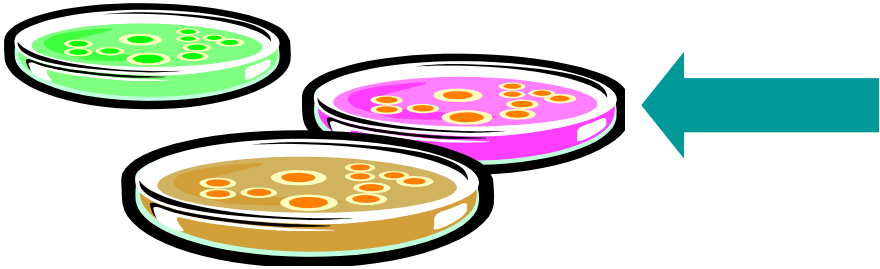
© J. Pemán

Naranja de Acridina



Examen microscópico directo

- **Valor de la Microscopía:**
 - **Sensibilidad: ~ 50%**
 - **Especificidad: > 90%**
 - **No discrimina entre géneros**



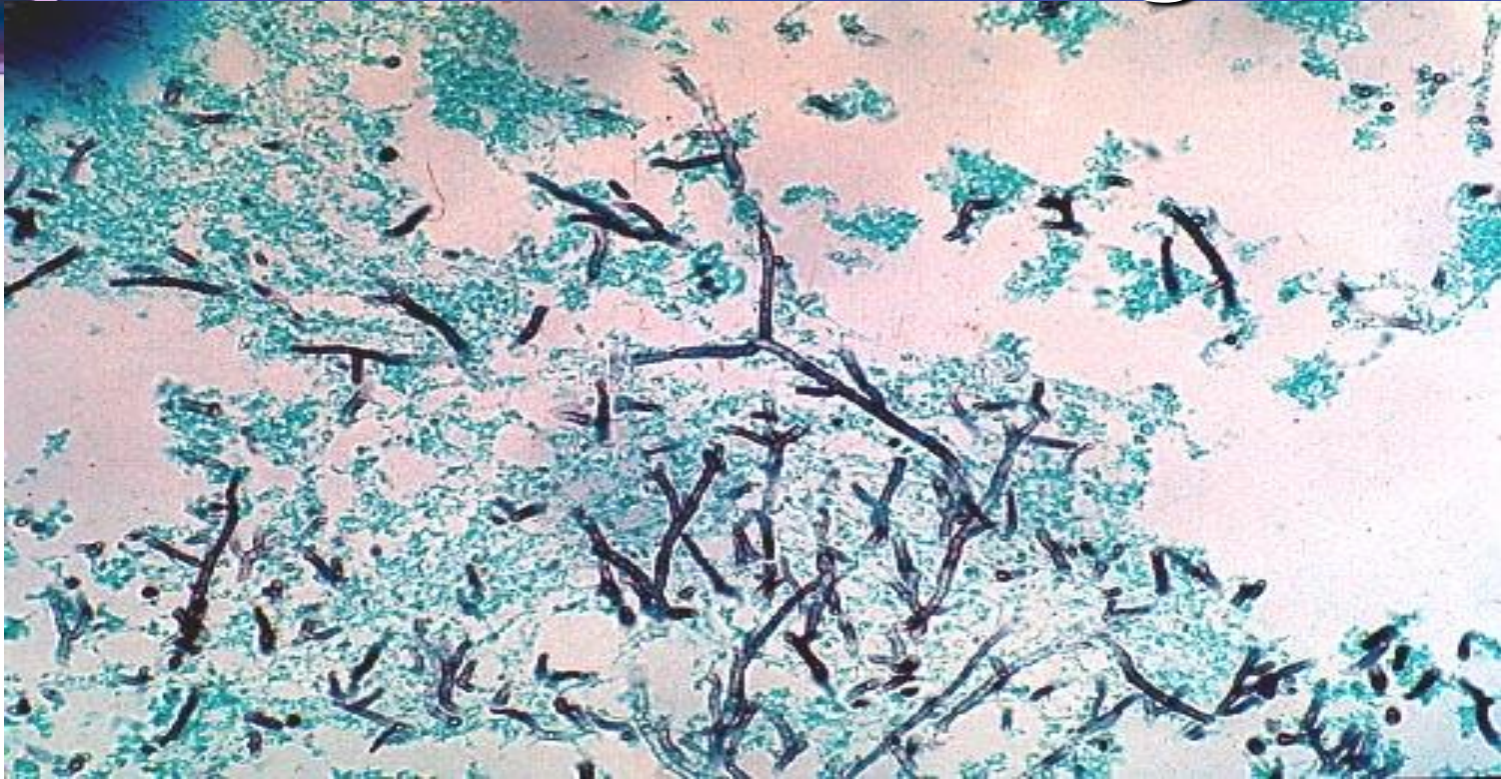


Tinciones “micológicas”



- **Giemsa:** histoplasmosis
- **PAS:** IFI, micetoma, coccidioidomicosis, onicomicosis
- **Grocott:** IFI, pneumocistosis

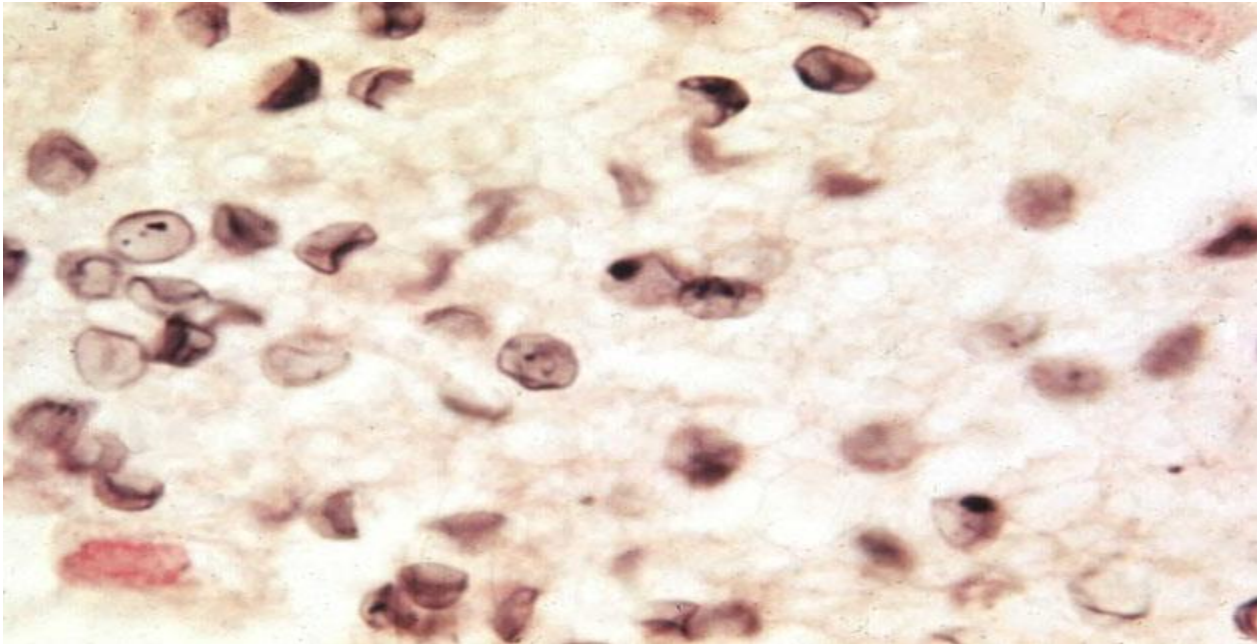
Tinciones "micológicas"



Aspergillus (Grocott)



Tinciones "micológicas"



***Pneumocystis jirovecii* (Grocott)**



Agenda

1. Examen microscópico directo
2. **Cultivo de hongos:**
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
3. Detección de Ag
4. Dtico serológico
5. Técnicas moleculares





Cultivo micológico

■ **Objetivo:**

- **Aislamiento e identificación agente causal:**
 - Diagnóstico etiológico de la infección fúngica
 - Estudio de sensibilidad antifúngica

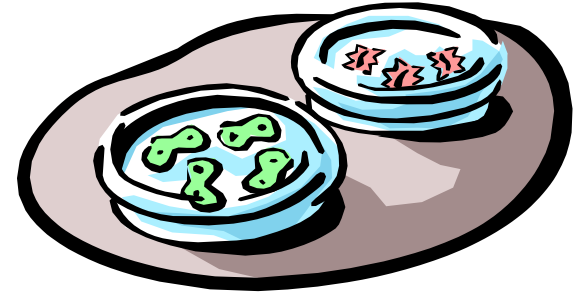
■ **Medios:**

■ **Aislamiento:**

- Agar Sabouraud glucosado (+ cloranfenicol)
- Agar Mycosel (dermatofitos)
- Agar infusión cerebro corazón (BHIA)
- Agar Leeming o Dixon (*Malassezia* spp)
- Agar Staib (*Cryptococcus* spp)

■ **Identificación:**

- H filamentosos: SDA, PDA, MEA, Czapek
- Dermatofitos: PDA, Agar trichophyton
- Levaduras: CHROMagar Candida, Corn Meal, ...





Condiciones de Incubación

■ Soporte:

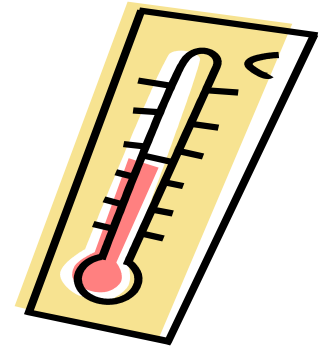
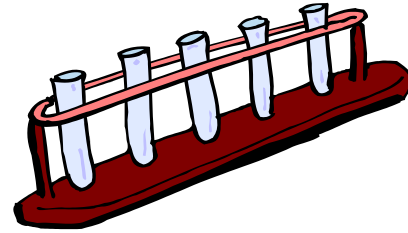
- Tubo (!!)
- Placa Petri 90 mm

■ Temperatura:

- 30° C (humedad)
- No:
 - T^a ambiente
 - Dos temperaturas (30° y 37° C)

■ Tiempo:

- Muestras estériles y LBA: 4 semanas
- Otras muestras: 2 semanas





Cultivo micológico

Muestras válidas IFI

■ Líquidos orgánicos:

- LCR
- L pleural
- L peritoneal
- L articular
- Humor vítreo
- Orina

■ Hemocultivo

■ Biopsia:

- Abscesos
- Mucosas
- Viscerales

■ Respiratorias:

- LBA



Cultivo

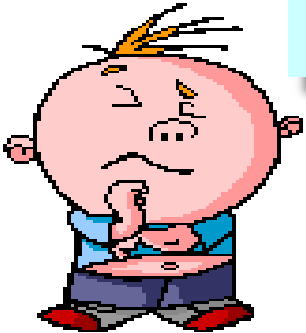
Muestras NO estériles
(respiratorias)

¿ Contaminación ?



¿ Colonización ?

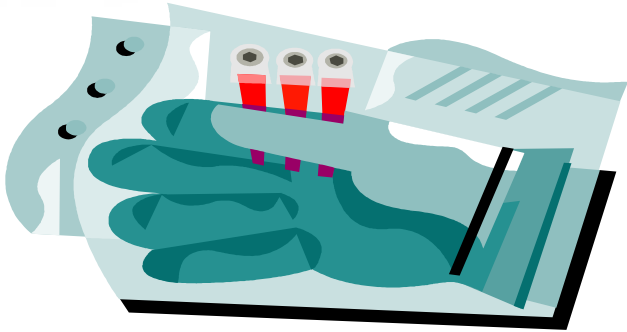
¿ Infección ?





Hemocultivo

Técnicas:

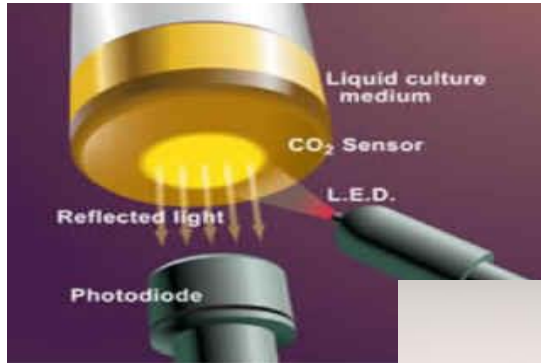


- **Manuales:**
 - Medios líquidos, bifásicos
- **Semiautomáticas:**
 - Radiométricos
- **Automatizadas:**
 - CO₂, pH, redox, enzimas,...
- **Lisis-centrifugación**

Sensibilidad global: \approx 50%

Sistemas automatizados hemocultivo

BacT/Alert 3D[®]



(bioMérieux)



Sistemas automatizados hemocultivo



Tipos de botellas

■ Botellas convencionales para bacterias

Infecciones sistémicas por H filamentosos (*Fusarium*)

Sepsis mixtas (**bacterias + levaduras**)

■ Botellas específicas para hongos:

■ Mycosis-IC F[®] (Bactec-Becton Dickinson)

■ MYCO/F LYTIC[®] (Bactec-Becton Dickinson)

Infecciones sistémicas por *H. capsulatum*

Sistemas automatizados hemocultivo



Nº de botellas y volumen inoculación



■ Dos frascos en cada extracción (aeróbico y anaeróbico): **10 ml/frasco**



■ En niños, frasco pediátrico (un sólo frasco por extracción): **5 ml/frasco**

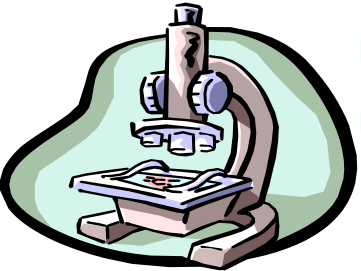


Sistemas automatizados hemocultivo

Detección crecimiento

Tinción:

- Gram
- Naranja acridina



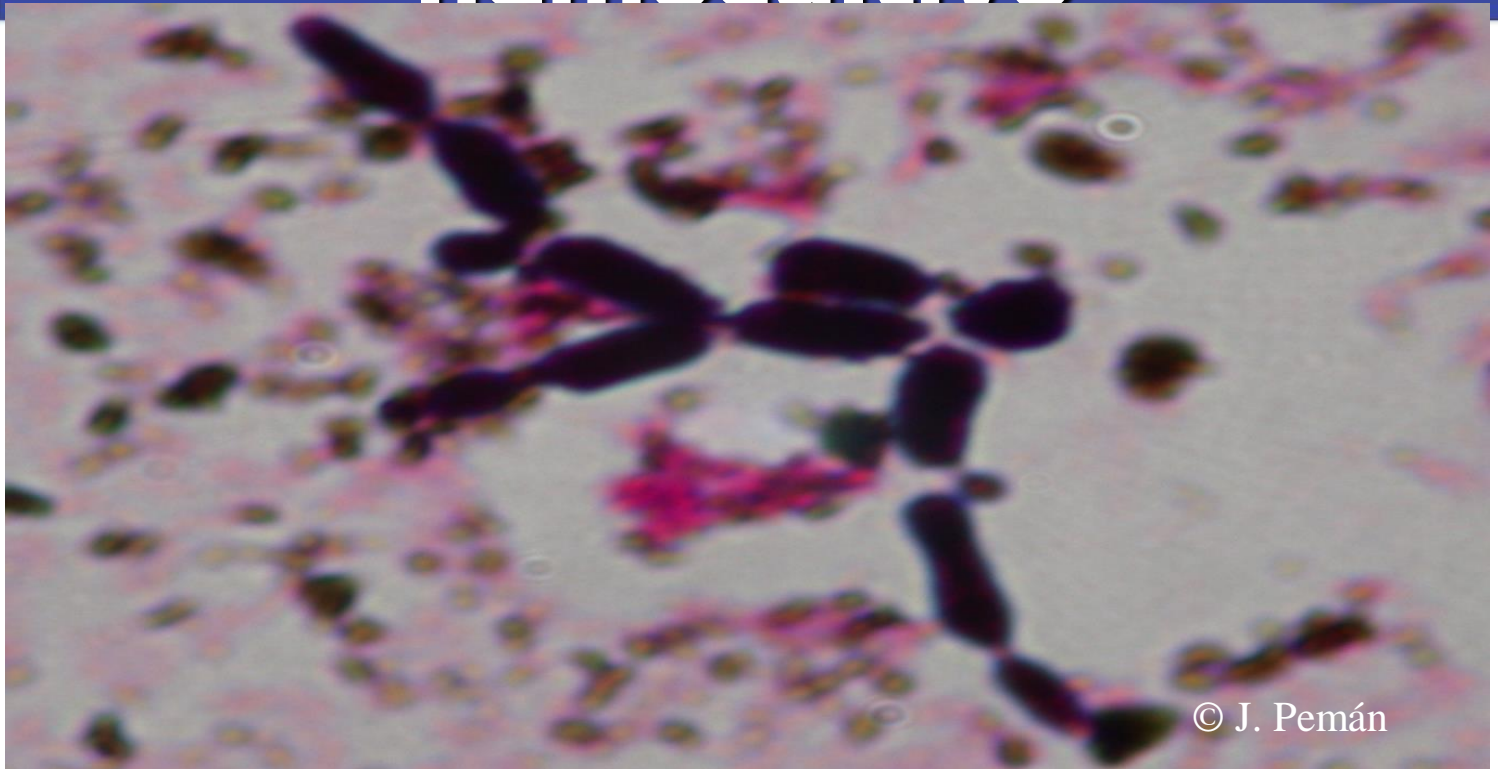
Si estructuras fúngicas:

- Subcultivo en SDAC y CHROMagar Candida® (levaduras)





Sistemas automatizados hemocultivo

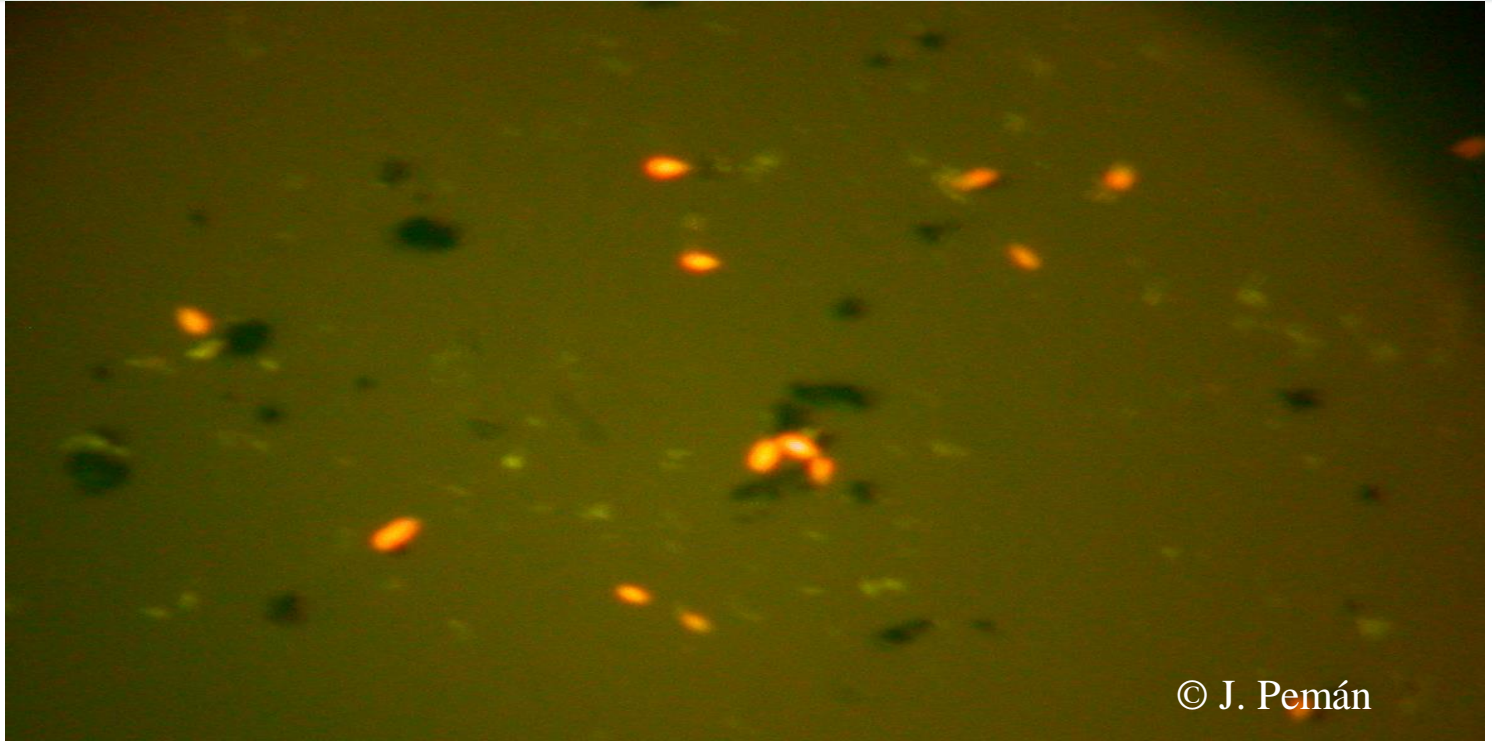


© J. Pemán

Tinción de Gram



Sistemas automatizados hemocultivo

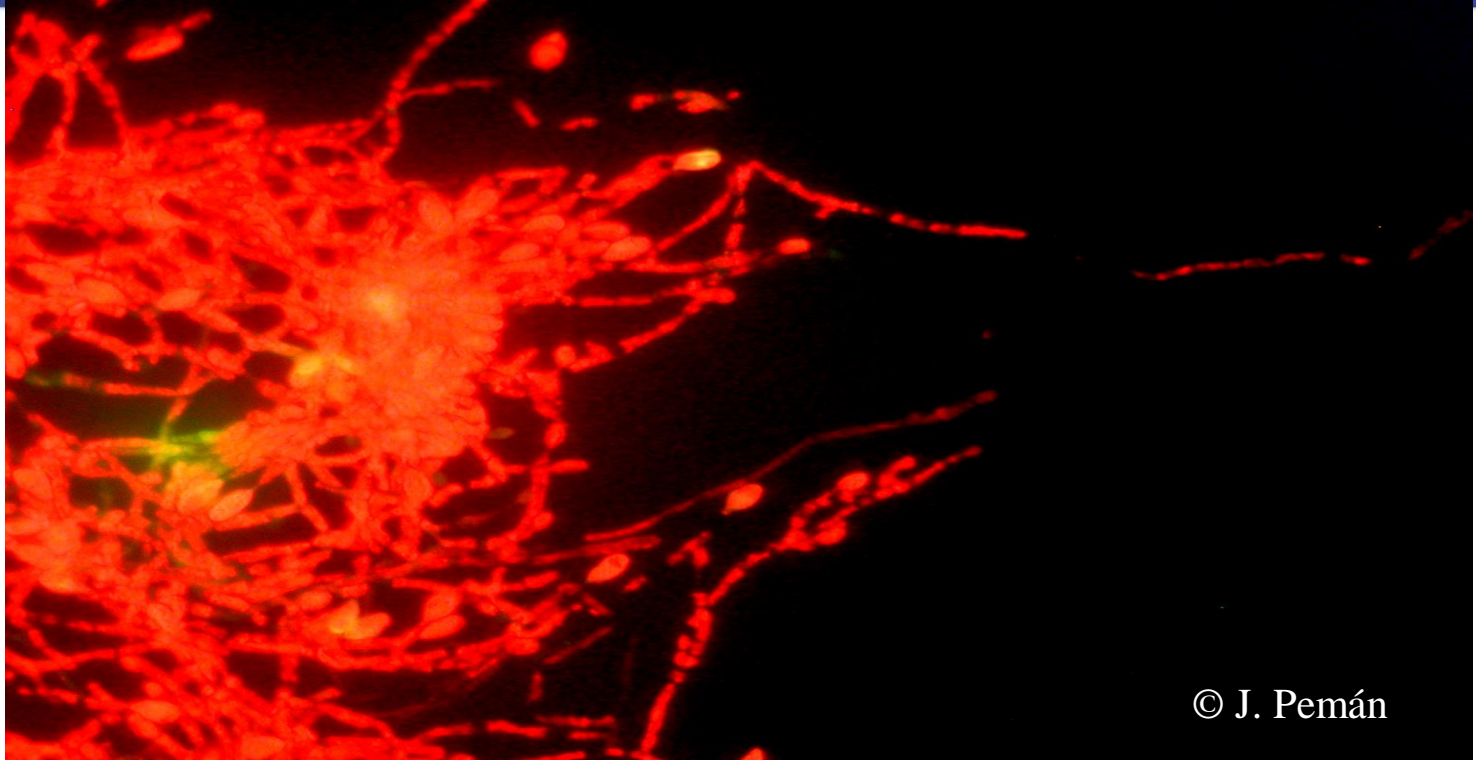


© J. Pemán

Naranja de Acridina



Sistemas automatizados hemocultivo



© J. Pemán

Naranja de Acridina

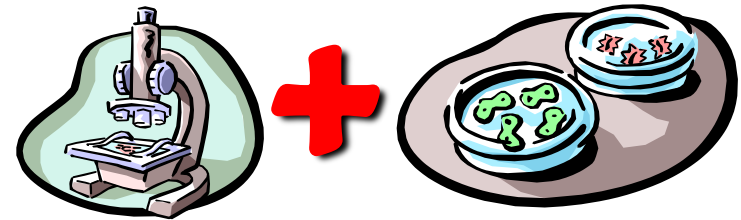


Sistemas automatizados hemocultivo

Tiempo incubación

NO crecimiento

- 7 días → 21 días
- Final incubación:
 - Subcultivo ciego + examen microscópico





Hemocultivo

Velocidad de crecimiento



■ 284 candidemias H Univ La Fe (2004-2008):

- Media: 36,8 h (2,2 h - 7,5 d)
- Mediana: 31,5 h

- *C. albicans*: 33,7 h (8,7 h - 5,6 d)
- *C. parapsilosis*: 30,7 h (2,2 h - 5 d)
- *C. glabrata*: 35,5 h (7,5 h - 5,1 d)
- *C. tropicalis*: 18,1 h



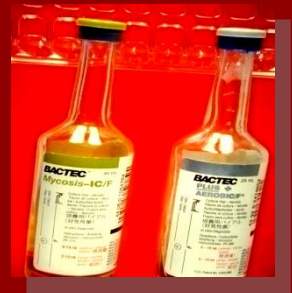
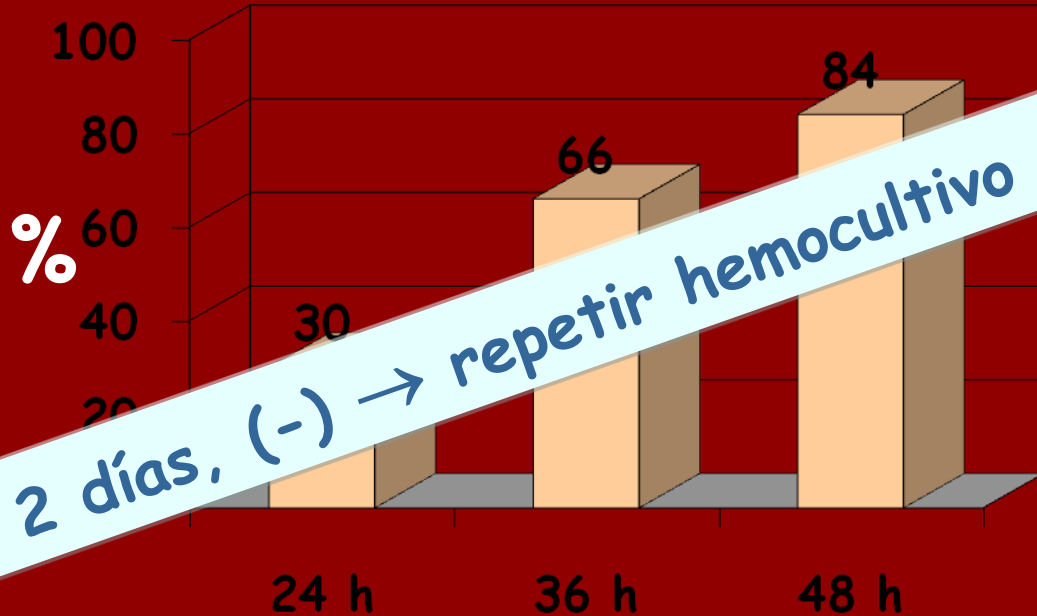


Hemocultivo

Velocidad de crecimiento



- 284 candidemias (H Univ La Fe):





Hemocultivo

Baja sensibilidad

■ Hongos:

- Presencia transitoria en sangre eriférica:

- Intracelular (fagocitos)
- Atrapamiento en capilares

- “Lenta” velocidad de crecimiento y multiplicación:

- Sepsis mixtas (levad + bacteria)





Hemocultivo

Aumentar sensibilidad

- Si firme **sospecha** clínica de **candidemia** y sólo se aíslan bacterias contaminantes G+...
- **Subcultivar 10 ml** del hemocultivo positivo en un frasco de Mycosis-IC/F suplementado **con 5 mg/l de vancomicina** (0,1 ml de Diatracín® 500 en 10 ml de solución salina e inocular 0,5 ml en el frasco) y procesar de forma habitual en el arcón incubador.





Identificación de la especie

- **¿Cuándo?:**

- Siempre
- Como mínimo:
 - Muestras estériles (líq orgánicos, biopsias)
 - Punta catéter IV

- **¿Por qué?:**

- Interés epidemiológico
- Interpretación clínica
- Repercusiones terapéuticas





PNA FISH

Peptide Nucleic Acid Fluorescent In-situ Hybridization

Positive
Blood Culture



Gram Stain



GPCC



Yeast



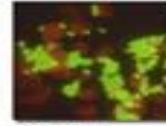
GPCPC

S. aureus
→
PNA FISH™

C. albicans
→
PNA FISH™

E. faecalis
→
PNA FISH™

Results (2.5 Hrs.)



S. aureus



non-*S. aureus* GPCC



C. albicans



non-*C. albicans* Yeast



E. faecalis - Green



other enterococci - Red



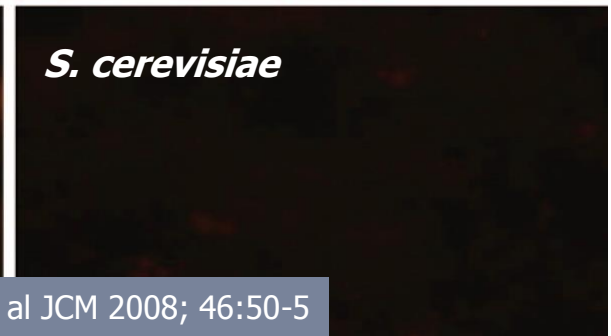
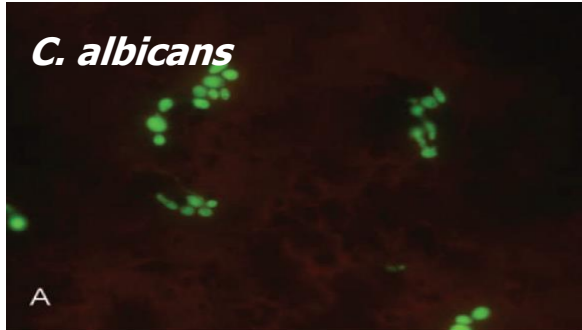
AdvanDX; Woburn, MA



PNA FISH

Peptide Nucleic Acid Fluorescent In-situ Hybridization

- Sencilla
- Poco equipamiento
- Rápida (150 → 85 min*)
- CE y FDA (2003)
- "Económica": \$ 30-80 (~PCR)
- ↓ Costo asistencia* (\$ 1800)



Shepard JR, et al JCM 2008; 46:50-5

*Ghera M et al; JCM 2008, Nov
 † Alexander BD, et al. DMID 2006; 54:277-82
 † Forrest GN, et al JCM 2006; 44:3381-3



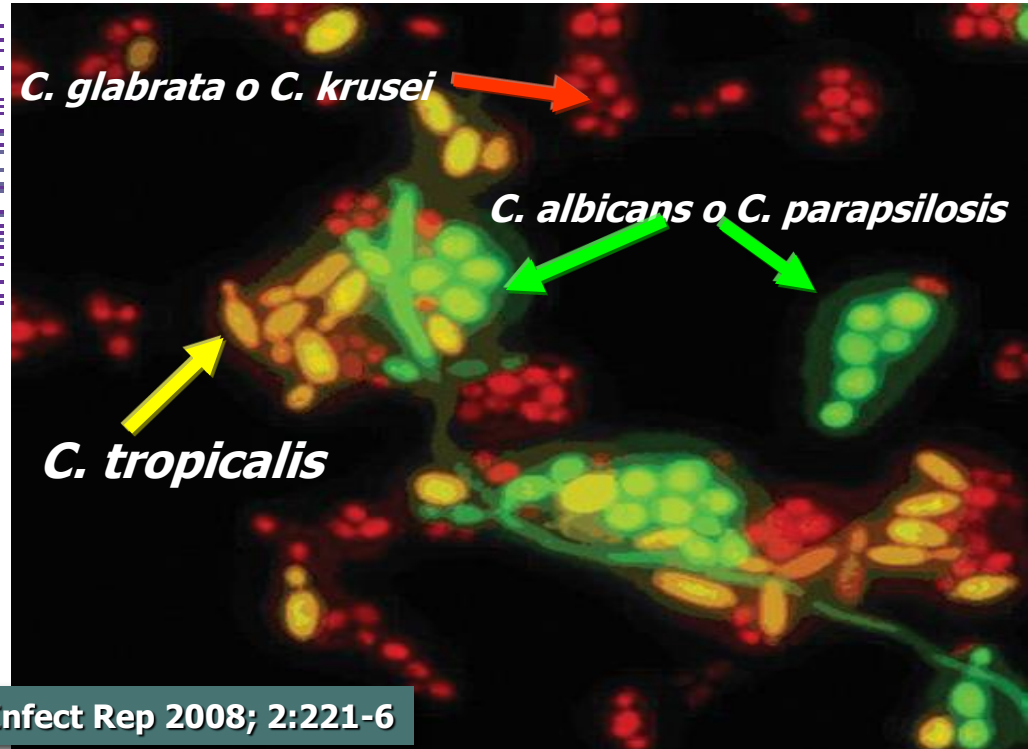
C. albicans PNA FISH™

C. albicans/C. glabrata PNA FISH™



PNA FISH

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

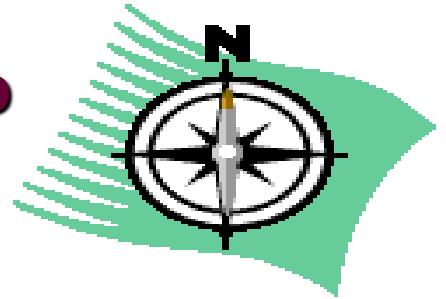


Forrest GN, Curr Fun Infect Rep 2008; 2:221-6



Agenda

1. Examen microscópico directo
2. Cultivo de hongos:
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
3. **Detección de Ag y moléculas no antigénicas**
4. Detección de Ac
5. Técnicas moleculares





Detección de antígenos micosis invasoras

- ***Cryptococcus neoformans***
 - Ag capsular

- ***Aspergillus spp.***
 - Galactomanano



GM en Suero Sensibilidad/Especificidad

Platelia-Aspergillus®

S (%)

E (%)

VERWEIJ

1995

Meta-análisis 27 estudios (66-05):

- 71% S y 89% E en AI probada
- 65% S en AI probada o probable

Pfeiffer CD, CID 2006, 42;1417-27

MAERTENS

1999

MAERTENS

PINEL

HU

200

200

62.5

72.5

100

92.6

50

84

89

99

95.4

98.1

99.6

Útil en enfermos ne

criterio microbiológico
crupénicos a riesgo

EORTC

↓ Sensibilidad en TOS:

- 56% (94% E) en Tx hepático*
- 30% (93% E) en Tx pulmonar**

*Fortun J, Transplantation 2001

**Husain S, AM J Transplant 2004



GM en LBA

Study	Year	Patient population	Study design	Definition of cases	Type of assay	Cutoff for pos	Sens.	Spec.	PPV	NPV
Caillot et al. [30]	1997	Hematologic malignancies	Retrospective case series	Proven or probable	Pastorex	N/A	83%	NR	NR	NR
Seyfarth et al. [31]	2001	Hematologic malignancies, solid tumors, CTD	Retrospective case series	Required 3 of 4 pre-set criteria	Pastorex	N/A	43% (65%)*	NR	NR	NR
Caillot et al. [10]	2001	<u>Hematologic malignancies</u>	Retrospective case series	Surgically/pathology-proven	Pastorex	N/A	76%	NR	NR	NR
Becker et al. [33]	2003	Hematologic malignancies	Prospective	Proven, probable + "suspected"	Platelia	1	90%	100%	100%	93%
Musher et al. [34]	2004	<u>HSCT recipient and candidates</u>	Retrospective case-control	EORTC/MSG	Platelia	1	61%	98%	NR	NR
Clancy et al. [38•]	2007	<u>SOT recipients</u>	Prospective	EORTC/MSG	Platelia	0.5	76%	94%	NR	NR
						0.5	100%	84.2%	29.4%	100%
						1	100%	90.8%	41.7%	100%
						1.5	100%	92.1%	45.4%	100%
Husain et al. [39•]	2007	<u>Lung transplant recipients</u>	Prospective	EORTC/MSG	Platelia	0.5	66.6%	96.7%	NR	NR
						1	66.6%	98.3%	NR	NR
Nguyen et al. [41]	2007	<u>Immunocompetent patients</u>	Prospective	Proven or presumed per investigators	Platelia	0.5	100%	77.6%	28.6%	100%
						1	100%	88.1%	42.9%	100%
						1.5	66.7%	91%	40%	96.8%
Meersseman et al. [35••]	2008	Immunocompromised <u>ICU patients</u>	Prospective	EORTC/MSG, proven	Platelia	0.5	88%	87%	NR	NR

9 estudios heterogéneos:

- Sen: 60 → 100%
- Esp: 77 → 100%



Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid

A Tool for Diagnosing Aspergillosis in Intensive Care Unit Patients

Punto Corte de 0,5 (BAL):

- Sensibilidad: 88%, (42% en suero y 58% cultivo BAL)
- Especificidad: 87%

	Neutropenic Patients (n = 10)	Nonneutropenic Patients (n = 16)	All Proven IA Cases (n = 26)
Sensitivity of test, n/N (%) [§]			
BAL culture or direct examination positive	5/10 (50)	10/16 (63)	15/26 (60)
<i>Aspergillus</i> GM BAL	9/10 (90)	14/16 (88)	23/26 (88)
<i>Aspergillus</i> GM serum	7/10 (70)	4/16 (25)	11/26 (42)
Median GM value in BAL Day 1 (range)	5.5 0.1–7.9	4.0 0.1–8.0	4.3 0.1–8.0
Median GM value in serum Day 1 (range)			3 0.0–7.5

A considerar:

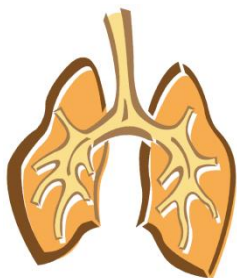
- Neutrópicos mayor rentabilidad suero
- Falsos positivos colonización (TxP)

GM en LBA

Use of Bronchoalveolar Lavage To Detect Galactomannan for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis among Nonimmunocompromised Hosts[▽]

M. Hong Nguyen,^{1,2} Reia Jaber,¹ Helen L. Leather,³ John R. Wingard,¹ Benjamin Staley,³ L. Joseph Wheat,⁴ Christina L. Cline,¹ Maher Baz,¹ Kenneth H. Rand,¹ and Cornelius J. Clancy^{1,2*}

- 73 ptes con infiltrados pulmonares
 - 6 con aspergilosis pulmonar
- GM en LBA:
 - S: 100%, E: 88%, VPN: 100%, VPP: 43%
- GM en LBA + Ex directo:
 - S: 100%, E: 92%, VPN: 100%, VPP: 55%



- There was **no conclusive benefit** of determining **BAL GM** levels in the diagnosis of pulmonary aspergillosis among **nonimmunocompromised hosts**.
- Given the likelihood of false-positive results, a **BAL GM test should not be ordered routinely** in this population.

(1-3)- β -D glucano (Fungitell®)

- Componente de la pared fúngica
- Alto nivel de detección (20 ϕ g/ml)
- Común a muchos géneros de hongos
 - *Aspergillus, Candida, Pneumocystis*

- **NO**: *Cryptococcus*, Zigomicetos
- Técnica laboriosa
- No distingue entre géneros
- Numerosos **falsos positivos**:
 - Ig, memb celulosa, gases y esponjas, hemólisis...
 - Albúmina, Fact coagulación, prot plasmáticas...
 - Bacteriemia, quimioterapia, coloniz GI *Candida*...
 - Amoxi-clav, piper-tazo...

Criterio IFI probable
EORTC





(1-3)- β -D glucano (Fungitell[®])

- Pocos estudios prospectivos
- Tasa de **falsos negativos** desconocida:
 - \uparrow Bilirrubina y triglicéridos
- **Colonización vs infección**
- **Contaminación** (manipulación, glucanos ambientales)

Muchas dudas por resolver...

- Influencia del tto AF previo
- Punto de corte óptimo: ¿60 pg/mL?
- Punto de corte ¿estático / dinámico?
- Cinética
- Frecuencia de muestreo ¿bisemanal?





(1-3)- β -D glucano (Fungitell[®])

- Uso en Laboratorios de Referencia
- Frecuencia: semanal durante mayor riesgo de EFI
- Los (+) deben complementarse con otras pruebas para identificar la especie
- Su uso conjunto con otro marcador | los FP y Γ Esp



- BG = GM: S (87%), E (89%), VPP (70%), VPN (96%), FP (10%)
- BG y GM > precoces que el diagnóstico clínico y TAC
- BG > precoz GM
- BG + GM: E (100%), VPP (100%), \approx S, \approx VPN



Agenda

1. Examen microscópico directo
2. Cultivo de hongos:
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
3. Detección de Ag
4. **Detección de Ac**
5. Técnicas moleculares





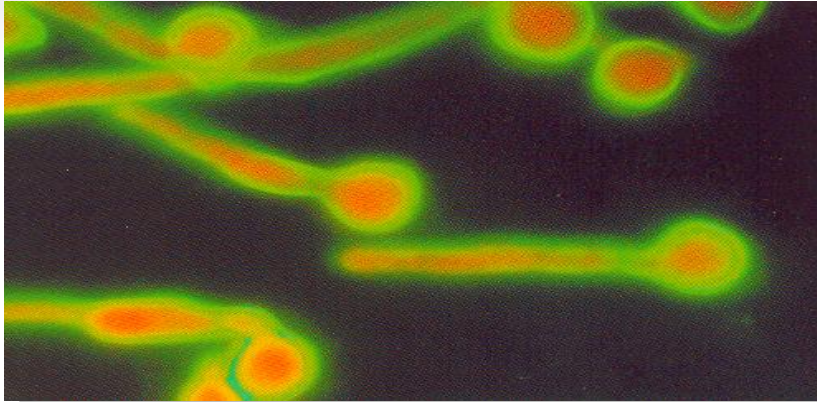
Detección Anticuerpos Candidiasis invasora



Candida albicans IFA IgG[®]



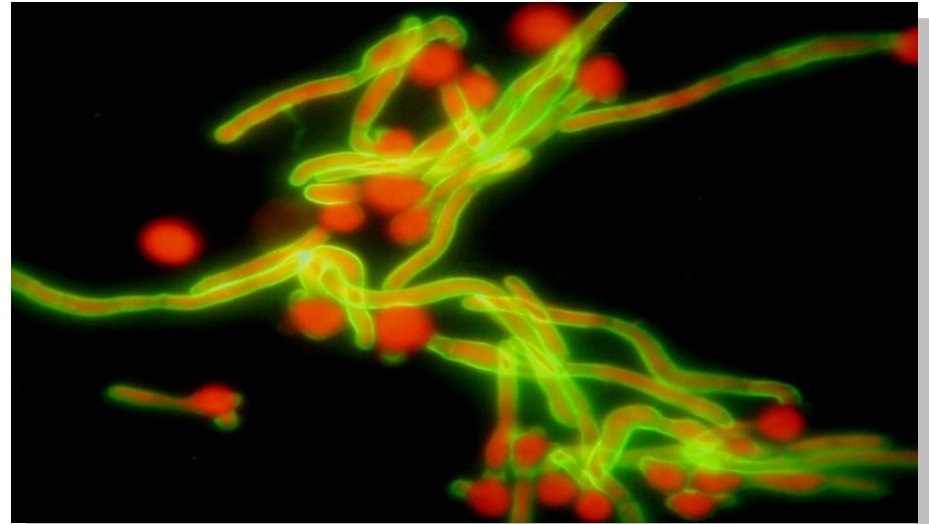
Detección Anticuerpos Candidiasis invasora



Ac antimanano



+ en colonización e infección



Ac antimicelio

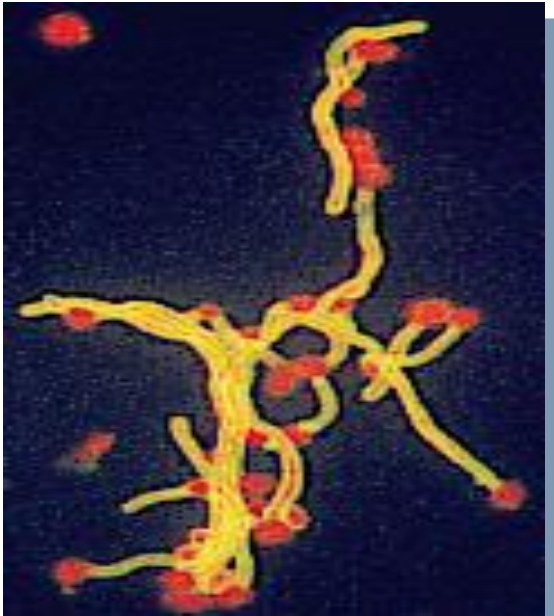


+ en infección



Ac antimicelio

Candida albicans IFA IgG



- *C. albicans*
- *C. tropicalis*
- *C. parapsilosis*
- *C. krusei*
- *C. glabrata*
- *C. guilliermondii*
- *C. dubliniensis*



Clinical Significance of *Candida albicans* Germ Tube Antibody Detection in Critically Ill Patients

Zaragoza R, Pemán J, et al.

- Estudio prospectivo (2 años)
- Multicéntrico (6 UCIs)
- 53 ptes no neutropénicos



- **El % de CAGTA+ en ptes críticos es alto (41,5%)**
- **Sobretudo en ptes quirúrgicos (54,5%)**
- **La presencia de este marcador se asocia con menor mortalidad**
- **Probablemente debida al tto AF recibido (¿"candidiasis serológica"?)**

Kinetic Patterns of *Candida albicans* Germ Tube Antibody in Critically Ill Patients: Influence on Mortality[▽]

Rafael Zaragoza,^{1*} Javier Pemán,³ Guillermo Quindós,⁵ Jose R. Iruretagoyena,⁶ María S. Cuétara,⁷ Paula Ramírez,⁴ María D. Gómez,³ Juan J. Camarena,² Angel Viudes,³ and José Pontón⁵
 on behalf of the *Candida albicans* Germ Tube Antibody Detection in Critically Ill Patients (CAGTAUCI) Study Group[†]

- Estudio prospectivo (2 años)
- Multicéntrico (6 UCIs)
- 53 ptes no neutropénicos

22/53 CAGTA +

- **31.8%** Títulos crecientes
- **36.4%** Títulos decrecientes
- **22.8%** Títulos invariables

Mortalidad

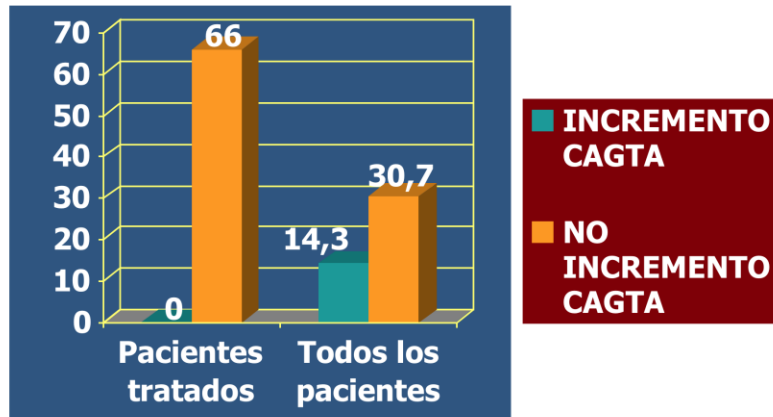


TABLE 1. Mortality of CAGTA-positive patients according to their dynamic patterns and the administration of antifungal treatment

Dynamic pattern	No. (%) of patients with indicated outcome			
	Total	Died	Treated with antifungals	Treated with antifungals and died
CAGTA positive	22 (100)	5 (22.7)	10 (45.4)	4 (40)
Not determinable	2 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Increasing titers	7 (31.8)	1 (14.2)	4 (57.1)	0 (0)
No change	5 (22.7)	1 (20)	2 (40)	1 (50)
Decreasing titers	8 (36.3)	3 (37.5)	4 (50)	3 (75)



Agenda

1. Examen microscópico directo
2. Cultivo de hongos:
 - Ventajas e inconvenientes
 - Utilidad
3. Detección de Ag
4. Dtico serológico
5. **Técnicas moleculares**

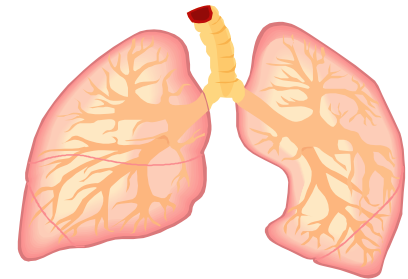




Diagnóstico molecular

Tipo de muestras válidas

- **Sangre y suero**
- **Fluidos estériles:**
 - líquido cefalorraquídeo
 - humor acuoso y vítreo
 - líquidos de derrames
- **Lavado broncoalveolar**
- **Tejidos**

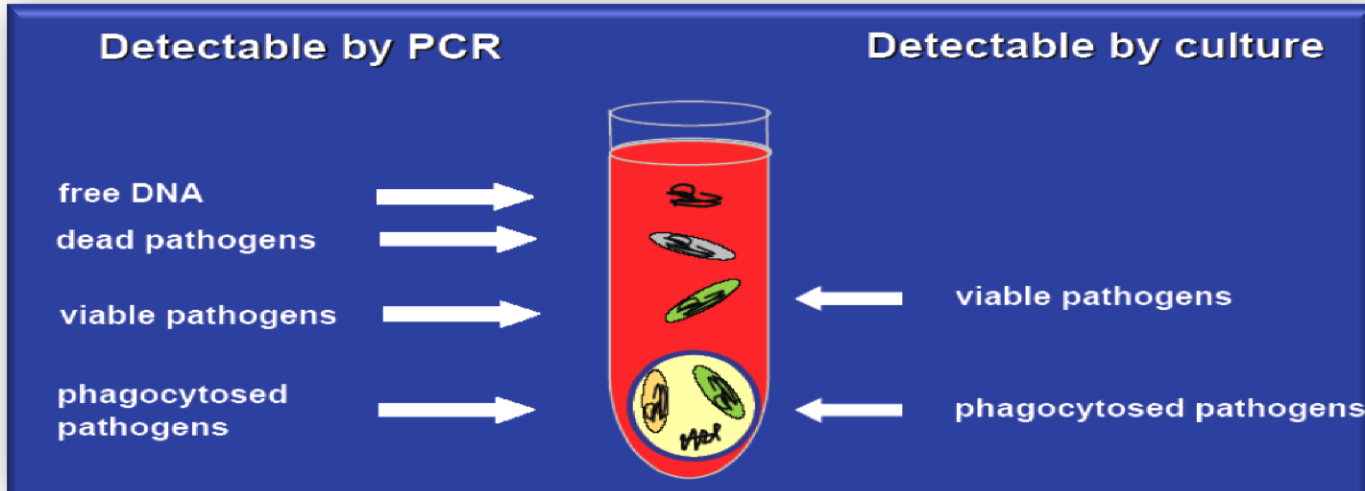




Diagnóstico molecular

¿Ventajas?

Elevada sensibilidad:

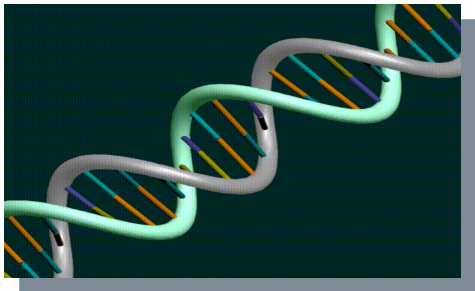




Diagnóstico molecular

Técnicas disponibles

- **Técnicas caseras (*in-house*)**
 - **Múltiplex, anidada, tiempo real...**
- **Técnicas comercializadas:**
 - **SeptiFast (Roche)**
 - **FXGTM-RESP (Asp+) (Myconostica Ltd, IZASA)**





Diagnóstico molecular

Técnicas caseras



Sistema de PCR	Tipo de pacientes	Comentarios	Referencias
PCR anidada y posterior secuenciación	Pacientes pediátricos con neutropenia	4/7 pacientes con hemocultivo negativo tenían candidiasis hepatoesplénica. Baja mortalidad de los pacientes (29%)	Lin MT, CID 2001
PCR tiempo real multiplex	Sospecha de infección fúngica	1650 muestras de 379 pacientes <u>Confirmada</u> por hemocultivo +: 60/72 (83.4%) PCR > S que HC	Klingspor L, CMI 2006
PCR tiempo real multiplex	Pacientes críticos	No falsos positivos en 491 muestras de 128 pacientes sin candidiasis invasora S: 91%, E: 100%	McMullan R, CID 2008

Diagnóstico molecular

LightCycler® SeptiFast Test

- Es la primera prueba basada en PCR para la detección múltiple de patógenos causantes de sepsis
- PCR en tiempo real (cualitativa)
- Detecta el 90% de los agentes causales de bacteriemia/fungemia
- Comercializada en Europa (CE Mark) enero 2006
- No en EE.UU.



Diagnóstico molecular

LightCycler® SeptiFast

Detecta e identifica DNA de 25 patógenos bacterianos y fúngicos directamente de sangre total (EDTA) en menos de 6 horas:

Gram (-)	Gram (+)	Hongos
<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i>• <i>Serratia marcescens</i>• <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i>• <i>Proteus mirabilis</i>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>• <i>Acinetobacter baumannii</i>• <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Staphylococcus aureus</i>• CoNS (Coagulase negative <i>Staphylococci</i>)*• <i>Streptococcus pneumoniae</i>• <i>Streptococcus spp.**</i>• <i>Enterococcus faecium</i>• <i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Candida albicans</i>• <i>Candida tropicalis</i>• <i>Candida parapsilosis</i>• <i>Candida krusei</i>• <i>Candida glabrata</i>• <i>Aspergillus fumigatus</i>

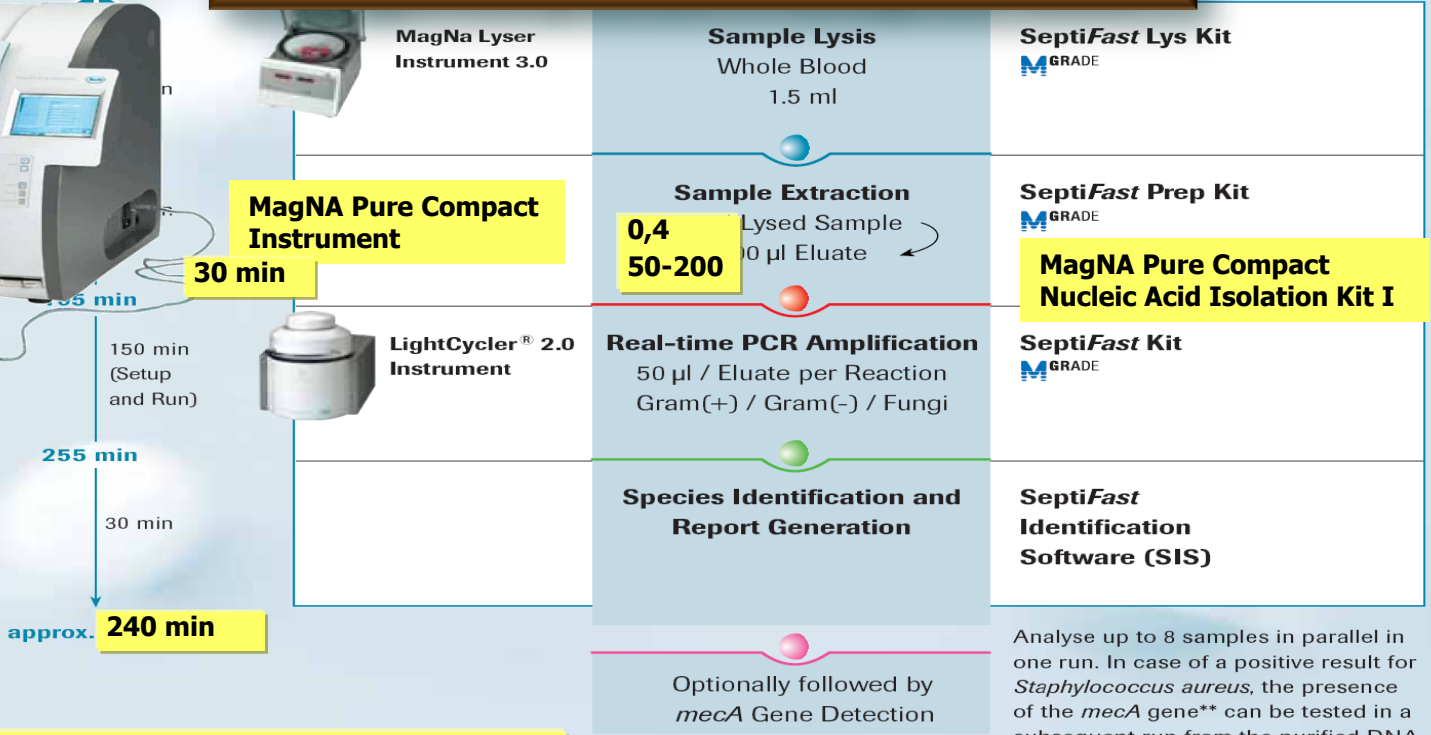
S. epidermidis, S. haemolyticus* *S. pyogenes, S. agalactiae, S. mitis*

Diagnóstico molecular

LightCycler® SeptiFast



Typical run with four patient



Actualización gentileza del Dr. J.C. Palomares

Diagnóstico molecular

LightCycler® SeptiFast



Tipo de pacientes	Comentarios	Referencias
359 pacientes con sospecha de sepsis	15/25 casos sólo se detectó la levadura por el SeptiFast	Westh H, CMI 2009
Pacientes con sospecha de sepsis	SeptiFast permitió diagnóstico de 2 casos no detectados por hemocultivo.	Dierkes C, BMC Infect Dis 2009
Pacientes adultos con neutropenia febril	119 episodios en 70 pacientes. Dos episodios de candidemia por <i>C. albicans</i> (sólo detectado por SeptiFast y <i>C. glabrata</i> (sólo detectado por hemocultivo)	Von Lilienfeld-Toal M, JCM 2009

Diagnóstico molecular

FXG™: RESP (Asp+)

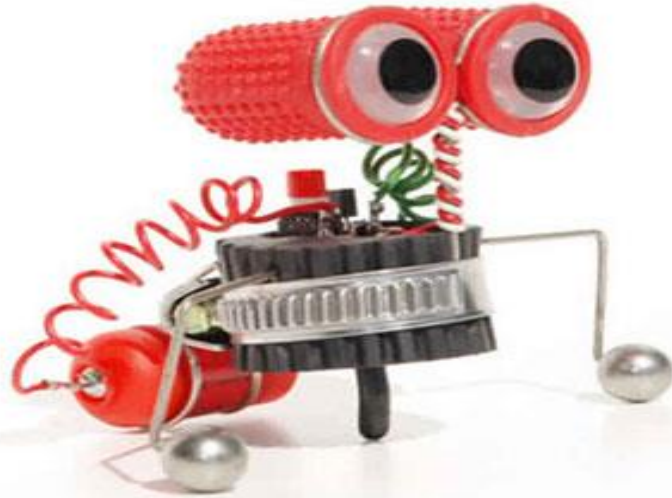
CE Mark 2008

FDA approval 2008

DetECCIÓN RÁPIDA DE ADN
de *Aspergillus* y
Pneumocystis en muestras
respiratorias mediante
PCR en tiempo real



Myconostica Ltd



Muchas gracias...