

Interpretace mykologických nálezů

MUDr. Nad'a Mallátová
Nemocnice Č. Budějovice, a.s.

A. nidulans v optickém mikroskopu

MYKOLOGICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY

Mikroskopie

Kultivace

Detekce biologických markerů

- galactomannan *Aspergillus* sp. (ELISA)
- beta – D – glukán, panfungální ag. (Limulus test)
- mannan *Candida* sp./antimannan (ELISA)
- glukuronoxylomannan *C. neoformans*
(latexová aglutinace, imunochromatografie, ELISA)
- detekce protilátek proti *Candida* sp. a *Aspergillus* sp.
(ELISA, precipitace, hemaglutinace)

MYKOLOGICKÉ NÁLEZY

- *Candida* sp. – 90 % *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*,
C. glabrata, *C. krusei*
- *Aspergillus* sp. – *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*
- *Trichosporon* sp. – *T. asahii*, *T. mucoides*
- *Geotrichum* sp. – *G. candidum*
- *Pneumocystis jirovecii*
- **Mukormycety** – *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*
- *Cryptococcus* sp. - *C. neoformans*
- *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Scedosporium* sp.,
Paecilomyces sp., *Penicillium* sp.,

INTERPRETACE MYKOLOGICKÝCH NÁLEZŮ

- mikromycety jsou běžnou součástí naší mikroflory, kolonizují GIT, urogenitál, dýchací cesty, pokožku
- v lidském mikrobiomu bylo identifikováno přes 30 různých rodů mikromycet (Cuil. Genome Med 2013.)
- při interpretaci mykologického nálezu je vždy nutné zohlednit vyšetřovaný materiál, použitý diagnostický test, predispoziční faktory a klinické symptomy pacienta!
- rozvoj mykotické infekce je závislý na imunitním stavu pacienta!

Candida colonizing the gut

Peritonitis or candidemia

Table 1. Risk Factors for Invasive Candidiasis.*

Critical illness, with particular risk among patients with long-term ICU stay

Abdominal surgery, with particular risk among patients who have anastomotic leakage or have had repeat laparotomies

Acute necrotizing pancreatitis

Hematologic malignant disease

Solid-organ transplantation

Solid-organ tumors

Neonates, particularly those with low birth weight, and preterm infants

Use of broad-spectrum antibiotics

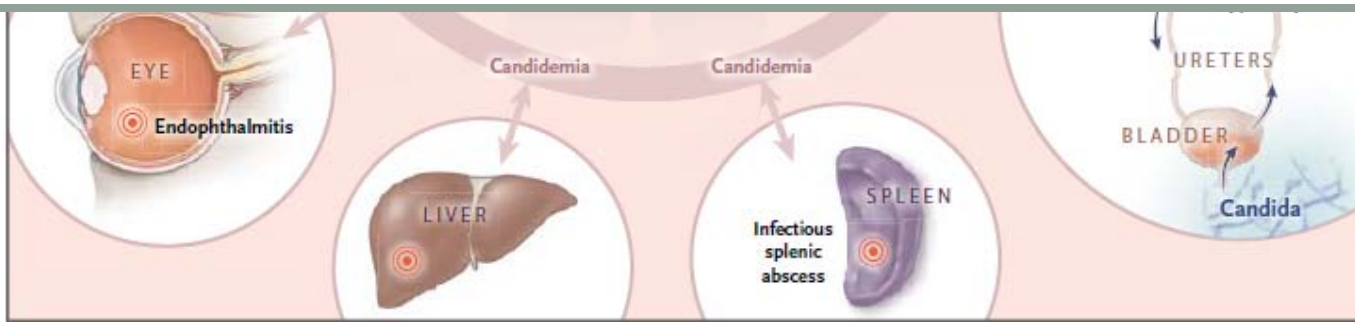
Presence of central vascular catheter, total parenteral nutrition

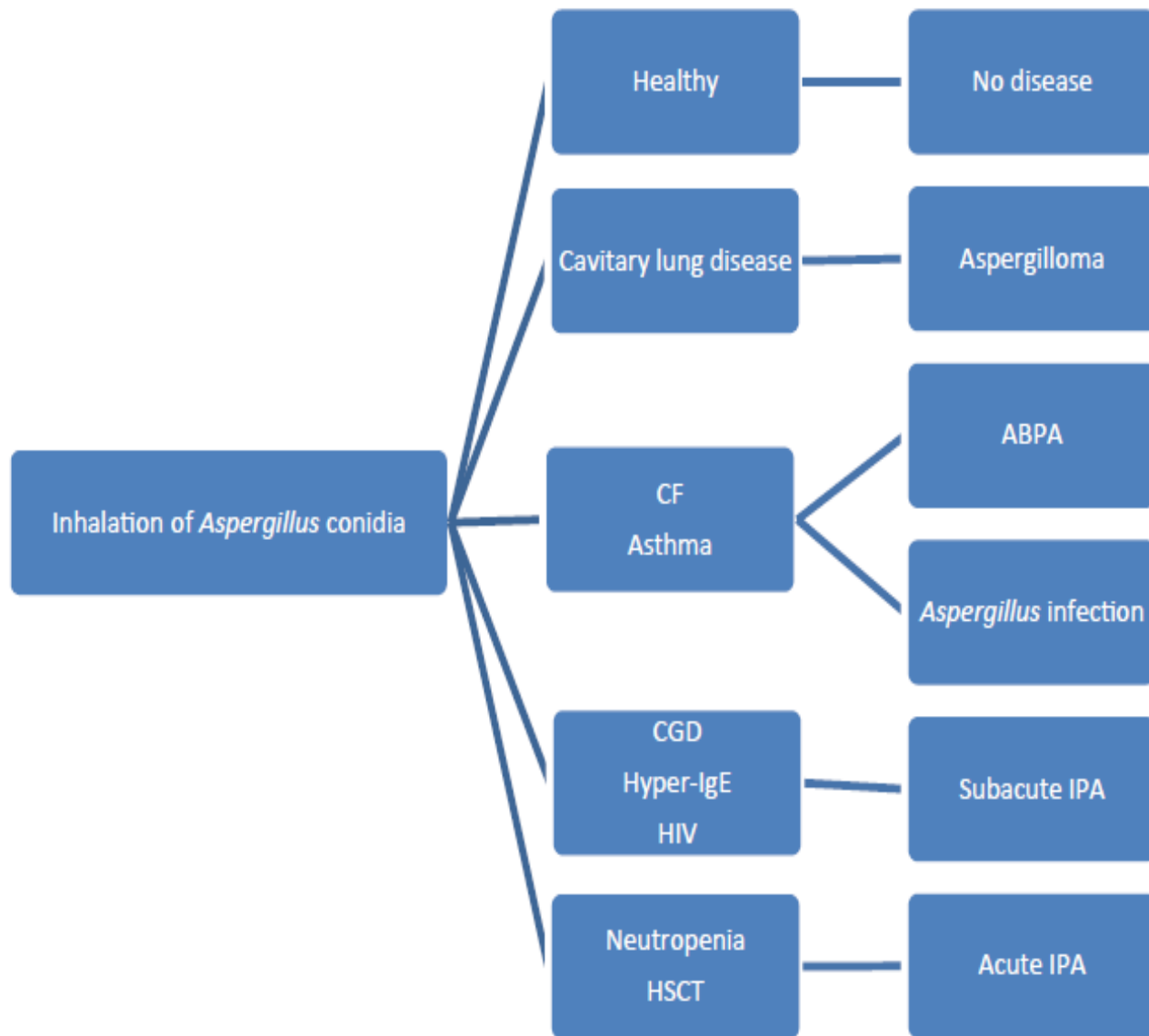
Hemodialysis

Glucocorticoid use or chemotherapy for cancer

Candida colonization, particularly if multifocal (colonization index >0.5 or corrected colonization index >0.4)

* ICU denotes intensive care unit. For further information see Cleveland et al.,² Arendrup et al.,⁶ and Lortholary et al.⁷

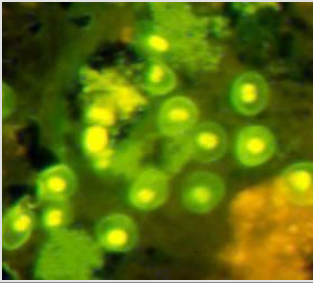




CF, cystic fibrosis; ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; CGD, chronic granulomatous disease; HIV, human immunodeficiency virus; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; HSCT, hematopoietic stem cell transplant.

Figure 1 Clinical syndromes of pulmonary aspergillosis related to the underlying condition and the immune status of the patient.

MIKROSKOPIE



P. jirovecii

Výhody

- rychlost
- nízké náklady
- vysoká specifická
- prokáže původce
- prokáže zánět
- podá informaci o validitě vzorku
- pomůže odlišit kolonizaci od infekce



Aspergillus ?

Nevýhody

- nízká senzitivita
- nejednoznačná identifikace agens
- nevyloučí kolonizaci



BAL - *Aspergillus ?*



KULTIVACE



A. fumigatus

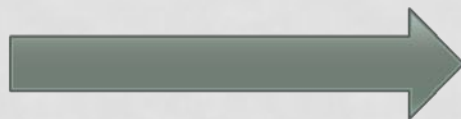
C. albicans

Výhody

Nevýhody

- možnost průkazu infekce v závislosti na druhu klinického materiálu
- vysoká specifita
- možnost jednoznačné identifikace agens
růstové vlastnosti
mikromorfologie
MALDI-TOF
molekulární metody
- možnost stanovení citlivosti

- nízká senzitivita
- nevyloučí kolonizaci
- možná kontaminace



Aspergillus fumigatus

HEMOKULTURA

➤ rychlost u hemotecní kandidézy je 21-71%

Terapii nasazujeme ihned po nahlášení pozitivního nálezu kandid v HMK!!

Včasná a adekvátně nasazená terapie snižuje zásadně mortalitu!!

(Morrell.AAC 2005, Pfaller. JCM 2007, Kollef 2012, Tabah 2012.)

- **kandidy rostou pomaleji než bakterie**, základní druhy do 5-7 dnů v závislosti na množství a druhu kandidy (nejpomaleji *C. glabrata*), **riziko u smíšených infekcí!**
- **kvantifikace nálezu z katétru u kandid je nevýznamná**, katétr se má vyjmout i při ojedinělém nálezu

CITLIVOST MIKROMYCET K ATM

- v současné době máme standardizované techniky i interpretační kritéria umožňující stanovit MIC všech systémových ATM
- *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* jsou dobře citlivé ke všem ATM
- *C. glabrata* je často sekundárně rezistentní k flukonazolu a zkříženě i ke všem dalším azolům
- *C. krusei* je primárně rezistentní k flukonazolu

- lékem volby u invazivní kandidózy jsou echinokandiny, flukonazol je vhodný u nonneutropenických pacientů, stabilizovaných, s citlivou kandidou, bez azolů v profylaxi (step down terapie)
- lékem volby u aspergilózy a fusariozy je vorikonazol, mukormykóza, kryptokokóza, non- *Candida* – lip. AmB, pneumocystóza - cotrimoxazol



INTRAABDOMINÁLNÍ KANDIDÓZA (IAC)

BASSETTI ET AL. INTENSIVE CARE MED 2015.

Bassetti. Intensive Care Med 2013:

prokázaná IAC:

- mikroskopický (AII) nebo kulturační (AII) průkaz kandid z peroperačně získaných materiálů (peritoneální tekutina, seškrab z peritonea, infikovaná tkáň) nebo perkutánní aspirací (AII)
- minimální množství vzorku je 1 ml nebo 1 g, rychlý transport!
- hemokultivace (AII) – pozitivita však pouze okolo 20 % !!!
- průkaz mikromycet z postoperačně získaných materiálů (výplach peritonea, drenáž) je třeba hodnotit rezervovaně, suspektní je masivní nález kandid z drenáže do 24 hod. po operaci
- materiály z ostatních lokalit - sledování kolonizace pacienta



KANDIDY V MOČI



- **nález kandid moči je nejčastěji projevem kolonizace**

Drogari-Apiranthitou. TIMM 2015:

- **2006-2010 sledovali kandidurie u pacientů na ICU**
- **molekulárně identifikovali všechny izoláty kandid z moče u pacientů, kteří měli zároveň pozitivní kandidu z HMK**
- **zaznamenali 141 epizod kandidémie u 134 pacientů**
- **pouze v 8 % (12 epizod) se kandida shodovala**

u vrozených vad, po urologických zákrocích

- **odebírat cévkovanou moč, ne přes dlouhodobě zavedený katetr!**
- **mikroskopie pomůže zhodnotit závažnost nálezu!**

KANDIDY V BAL

Schnabel. OFID 2014:

- 10 let sledovali BAL u pacientů na JIP na přítomnost kandid
- 701 vzorků bylo kultivačně pozitivních
- pacienti museli splňovat i klinická kritéria
teplota, leukocytóza, leukocyty v BAL, nález na CT
- pouze 5 pacientů bylo uzavřeno jako kandidová pneumonie
- rizikové faktory: imunosuprese, sepse, diabetes, závislosti (drogy, alkohol, cigarety), malnutrice, aspirace z GIT, divertikulóza jícnu
- **závěr – doporučení autorů:**
máme-li respirační selhání, radiologické a laboratorní známky pneumonie, kultivačně z BAL pouze *Candida* sp. – léčit!!!!

MANNAN/ANTIMANNAN

antigen kandid/ protilátka

Mikukla et al. *Critical Care* 2010, 14(R2):22
<http://ccforum.com/content/14/R2/22>



RESEARCH

Open Access

The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia

Malgorzata Mikulska^{1*}, Thierry Calandra², Maurizio Sanguineti³, Daniel Poulain⁴, Claudio Viscoli⁵, the Third European Conference on Infections in Leukemia Group

- 14 studií, 453 pacientů (hematoonkologie, JIP, chirurgie)
- kontrolní soubor 767 pacientů

Doporučení:

- užitečné u orgánové kandidózy
- testovat vždy kombinaci mannan/antimannan
- potvrdit pozitivitu dalším odběrem
- hodnotit rezervovaně, vždy v kombinaci s dalšími výsledky

- kolonizovaní pacienti mají pozitivní antimannan (4 studie, pozitivita 6-44 %) i mannan (4 – 20 %)
- senzitivita je vyšší pro *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. glabrata* nízká pro *C. parapsilosis* a *C. krusei*

BETA GLUKAN

polysacharid buněčné stěny mikromycet

➤ **nespecifický houbový marker** ➡ **panfungální antigen**

Doporučení:

- vhodné pro vyvrácení mykotické etiologie
- pozor na falešné positivity
- vhodné u orgánové kandidózy, pneumocystózy
- hodnotit vždy v kombinaci s ostatními nálezy

vhodné pro monitoring léčby

➤ **nevýhody:**

nízká pozitivní prediktivní hodnota

falešná pozitivita - ATB, bakterie, dialýza, albumin, imunoglobuliny
pracná, nákladná metoda

KOLONIZACE KANDIDAMI – DIAGNOSTICKÝ ALGORITMUS

Klinický nález

Predispoziční faktory

Léčba ATB bez odezvy!!!

Kolonizační index, Candida score, klinické skóre (Ostrosky 2009)

Vysoké riziko

Nízké riziko

HMK, odběry ze sterilních lokali

Glukan, mannan/antimannan,
PCR

Prokázaná IA
Cílená léčba

Pravděpodobná IA
Preemptivní léčba

?

Kolonizace – bez léčby
Opakovat odběry!!!!

GALAKTOMANNAN

polysacharid buněčné stěny aspergilů

- **uvolňuje se hlavně během růstu aspergilů**
- **u silně imunosuprimovaných pacientů** (neutropenie, HSCT) prorůstá houba do cév a GM **detekujeme v séru**
- **u pacientů s mírnějším stupněm imunodeficitu** (CHOPN, fibrózy, kortikoterapie...) detekujeme GM **v místě růstu houby**
- **hodnotí se dle indexu positivity (IP)**, cut off v séru $\geq 0,5$
- metaanalýza GM v séru Pfeiffer 2006:
senzitivita 79 %, specificita 86 %
- metaanalýza GM v BAL Zou 2013:
GM v BAL IP 0,5: senzitivita 87 % a specificita 89 %
GM v BAL IP 1,0: senzitivita 86 % a specificita 95 %

GALACTOMANNAN

Doporučení:

- zásadní marker pro diagnostiku invazivní aspergilózy, zvláště u hematologických malignit
- pozor na falešné pozitivit
- hodnotit vždy v souvislosti s klinikou a imunitním stavem (predispozicí) pacienta

- skríníng rizikových pacientů
- monitoring léčby

TABLE 3. DIAGNOSTIC CRITERIA FOR INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS IN INTENSIVE CARE UNIT PATIENTS, CLASSIFIED ACCORDING TO THE RESULTS OF HISTOPATHOLOGY EXAMINATION AND CLINICAL ALGORITHM

	Pathology Positive (Proven IPA)		Pathology Negative (Proven Colonization)		Operating Characteristics for Distinct Criteria within the Algorithm			
	TP (n = 72)	FN (n = 7)	FP (n = 14)	TN (n = 22)	Sens (%)	Spec (%)	PPV (%)	NPV (%)
Criteria of the clinical algorithm for diagnosing probable IPA								
1. <i>Aspergillus</i> -positive endotracheal aspirate	72 (100)	7 (100)	14 (100)	22 (100)				
2. Compatible signs	72 (100)	7 (100)	14 (100)	13 (59.1)	100	25	47	100
Fever refractory to at least 3 d of appropriate antibiotic therapy	40 (55.6)	6 (85.7)	4 (28.6)	3 (13.6)				
Recrudescence fever after ≥48 h of defervescence while still on antibiotics and without other apparent cause	2 (2.8)	0	1 (7.1)	2 (9.1)				
Pleuritic chest pain	5 (6.9)	0	0	0				
Pleuritic rub	3 (4.2)	0	0	0				
Dyspnea	37 (51.4)	3 (42.9)	6 (42.9)	7 (31.8)				
Hemoptysis	13 (18.1)	0	3 (21.4)	0				
Worsening respiratory insufficiency despite appropriate antibiotic therapy and ventilatory support	51 (70.8)	4 (57.1)	8 (57.1)	4 (18.2)				
3. Abnormal thoracic medical imaging on CT scan or X-ray	72 (100)	7 (100)	14 (100)	20 (90.9)	100	6	41	100
Diffuse reticular or alveolar opacities	17 (23.6)	3 (42.9)	8 (57.1)	5 (22.7)				
Nonspecific infiltrates and consolidation	49 (68.1)	4 (57.1)	5 (35.7)	15 (68.2)				
Pleural fluid	28 (38.9)	3 (42.9)	6 (42.9)	5 (22.7)				
Wedge-shaped infiltrate	8 (11.1)	3 (42.9)	0	0				
Well-shaped nodule(s)	19 (26.4)	2 (28.6)	3 (21.4)	4 (18.2)				
Air-crescent sign	1 (1.4)	0	1 (7.1)	0				
Halo sign	5 (6.9)	0	0	1 (4.5)				
Cavitation	7 (9.7)	0	0	1 (4.5)				
4a. Host risk factors	67 (93.1)	0	14 (100)	5 (22.7)	84	47	51	81
Neutropenia (<500 neutrophils/mm ³)	6 (8.3)	0	2 (14.3)	0				
Malignancy treated with cytotoxic agents	16 (22.2)	0	4 (28.6)	0				
Glucocorticoid treatment	52 (72.2)	0	12 (85.7)	5 (22.7)				
Inherited severe immunodeficiency	3 (4.2)	0	0	0				
4b. Semiquantitative <i>Aspergillus</i> -positive culture of BAL fluid + positive direct microscopy	31 of 51 (60.8)	0 of 3 (0)	1 of 11 (9.1)	0 of 5 (0)	94	57	87	77
Criteria for proven IPA present								
Biopsy positive	34 of 34 (100)	3 of 3 (100)	0 of 9 (0)	0 of 15 (0)				
Autopsy positive	38 of 38 (100)	4 of 4 (100)	0 of 5 (0)	0 of 7 (0)				

Definition of abbreviations: BAL = bronchoalveolar lavage; FN = false negatives; FP = false positives; IPA = invasive pulmonary aspergillosis; NPV = negative predictive value; PPN = positive predictive value; Sens = sensitivity; Spec = specificity; TP = true positives.

EORTC KRITÉRIA

pro diagnostiku invazivních fungálních infekcí

De Pauw et al. 2008, návrh revize 2015

Dg. jistá

Histologie
Mikroskopie
Kultivace
Z primárně sterilních lokalit !!!!

Dg. pravděpodobná

Predispozice
Klinická kritéria
Mykologická kritéria

Dg. možná

Predispozice
Klinická kritéria
Bez laboratorních důkazů!!!

Léčba cílená!

Léčba preemptivní!

Léčba empirická!

Lichtheimia corimbifera v optickém mikroskopu



DĚKUJI ZA POZORNOST