



LIÈGE université

Center for Interdisciplinary
Research on Medicines



Fungiplus Candida et Aspergillus

MARIE-PIERRE HAYETTE RICA I 2018

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE CLINIQUE

CNR MYCOSES - CHU DE LIÈGE - BELGIQUE



Conflits d'intérêt

Aucun concernant la présentation de ce jour

Invitations à des congrès/Grants par Pfizer, MDS, Gilead

Rémunérations pour des symposiums organisés par Pfizer

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Fungiplex IVD Real-Time PCR Kits

Fungiplex IVD kits cible les pathogènes fongiques les plus fréquents



Fungiplex® Aspergillus IVD PCR Kit

- Détecte *Aspergillus* spp. and *A. terreus*
- Patients à risque d'aspergillose invasive



Fungiplex® Aspergillus Azole-R IVD PCR Kit

- Détecte *Cyp51* mutations, TR₃₄ and TR₄₆
- Patients à risque de développer des résistances aux azolés



Fungiplex® Candida IVD PCR Kit

- Détecte *Candida* spp., *C. glabrata* et *C. krusei*
- Patients à risque de candidose invasive

Fungiplex RUO PCR Kits

For Research Use Only. Not for use in clinical diagnostic procedures.

All Fungiplex kits use the same conditions to optimise workflow



Fungiplex® Universal RUO PCR Kit

- Détection pan-fongique incluant espèces non couvertes par marqueurs "pan-fongiques" cad β -D-glucan: (Zygomycetes, Cryptococcus, Trichosporon)

Réponse 'oui/non'



Fungiplex® *Candida auris* RUO PCR Kit

- Specific detection of *Candida auris* (does not cross-react with other *Candida* spp.)

Épidémiologie des candidoses invasives: en résumé

ESPECES /candidémies

- Espèce N°1 reste *C. albicans*
- N°2: **variations géographiques:**
 - Nord de l'Europe + USA: *C. glabrata*
 - Sud de l'Europe + Am. Sud: *C. parapsilosis*
- 5 espèces : 90% cas de candidémies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*

FACTEURS DE RISQUES MAJEURS

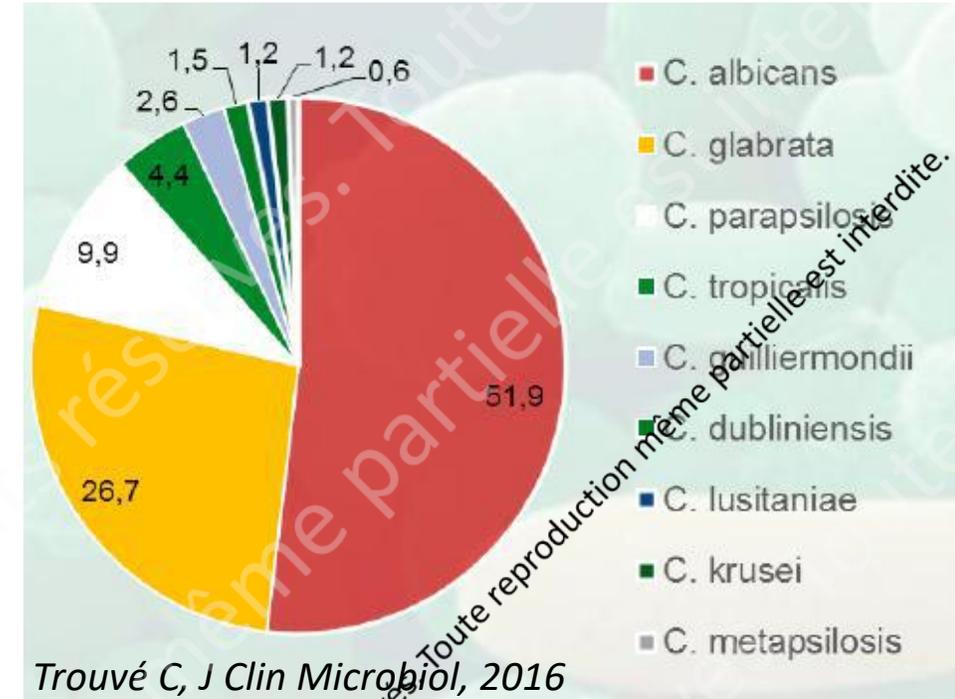
- réanimation+++ (ICU 30-55% candidémies)
- chirurgie digestive lourde
- hémato-oncologie

MORTALITE des patients avec candidémie

>70% globale et 15-62% dûe à la candidose: ↑ hospitalisation/coût
↑ si délai du traitement

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

- Hémocultures (50%+)
- Biomarqueurs sériques (mannanes-Ac antimannanes, β -D-glucan, Maldi-tof)
- Biologie moléculaire (PCR: in house, T2candida, Fungiplex candida)



Leon C, IntCareMed, 2014,
Trouvé C, Med Mycol 2016

Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, β -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis

M. Hong Nguyen,¹ Mark C. Wessel,² Ryan K. Shields,¹ Martin A. Salomoni,² Binghua Hao,¹ Ellen G. Press,¹ Ryan M. Shields,² Shaoji Cheng,¹ Dimitra Mitsani,¹ Aniket Vadnerkar,¹ Fernanda P. Silveira,¹ Steven B. Kleiboeker,² and Cornelius J. Clancy^{1,3}

¹Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pennsylvania; ²Viracor-IBT Laboratories, Lee's Summit, Missouri; and ³Department of Medicine, VA Pittsburgh Healthcare System, Pennsylvania

2 biomarqueurs

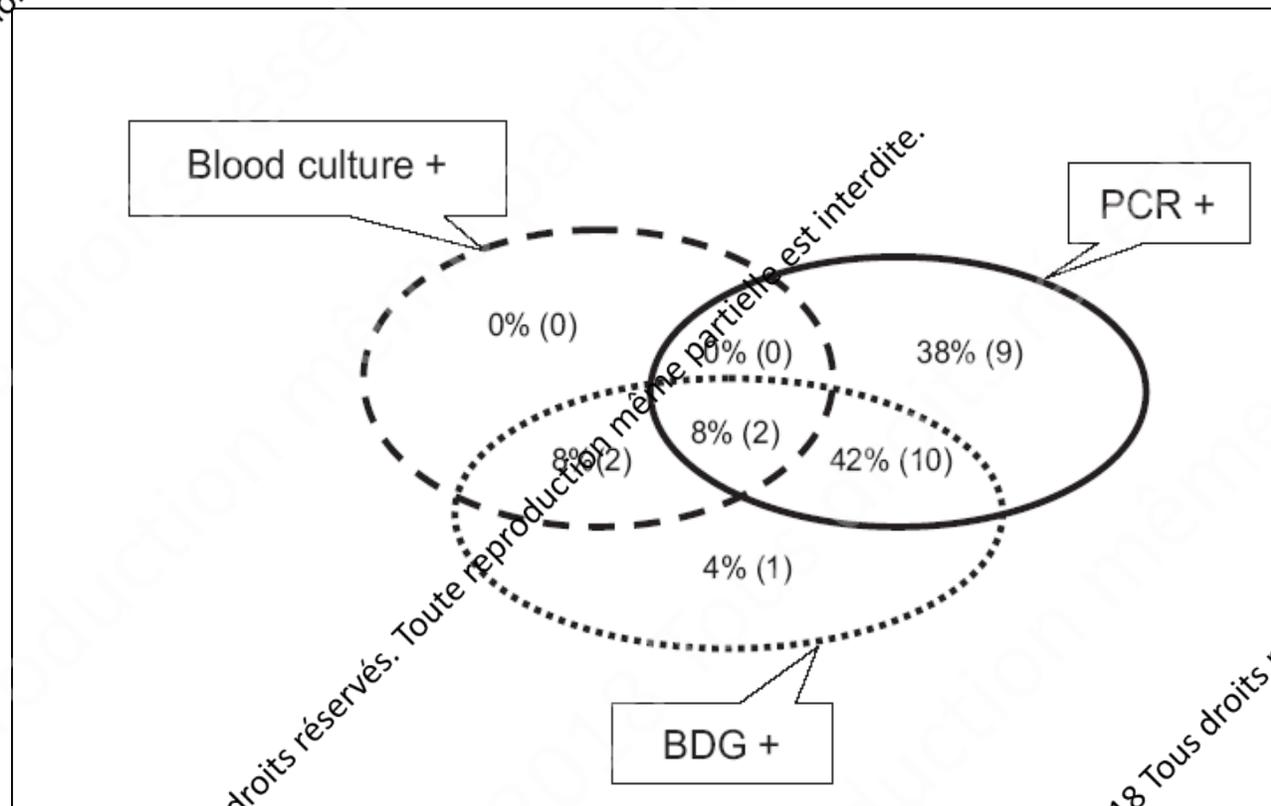
Bêta-D-glucan/Fungitell® serum ou plasma
RT-PCR ITS1 & ITS2 sur WB, plasma et/ou serum
C. albicans+C. tropicalis,
C. glabrata+C.krusei, C. parapsilosis complexe

Étude prospective
Avril 2009-2011
Pittsburg, USA
Pop mixte

Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, β -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis

Assay	Invasive Candidiasis (n = 55)	Candidemia ^a (n = 22)	Deep-Seated Candidiasis ^{a,b} (n = 38)	Intra-abdominal Candidiasis (n = 34)
PCR ^c				
Sensitivity	80% (44/55)	59% (13/22)	89% (34/38)	88% (30/34)
Specificity	70% (51/73)			
BDG (positive ≥ 80 pmol/mL)				
Sensitivity	56% (31/55)	68% (15/22)	53% (20/38)	56% (19/34)
Specificity	73% (53/73)			
BDG (positive ≥ 60 pmol/mL)				
Sensitivity	69% (38/55)	81% (18/22)	66% (25/38)	65% (22/34)
Specificity	63% (46/73)			
<i>P</i> value ^d				
PCR vs BDG (positive ≥ 80 pmol/mL)	.03	.77	.004	.0015
PCR vs BDG (positive ≥ 60 pmol/mL)	.31	.23	.04	.06

Performance des différents biomarqueurs



Fungiplex Candida (Bruker)

CE-IVD depuis 2017

PCR multiplexe en temps réel

- Candida species détectant 4 espèces:
 - (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*)
- Candida glabrata
- Candida krusei

3 matrices validées:

- Sang total EDTA
- Plasma
- Serum



Composition du kit Fungiplex *Candida*

100 tests

- Stabilité testée pour supporter 10 cycles de congélation/décongélation. Péréemption à 6 mois.
- ---Pas de contrôle d'extraction fourni dans le kit.

Reagent	Volume per tube	No. of tubes	Cap colour	Reactions per tube
PCR MM	1.2 mL	1	Orange	100
Candida MM	120 µL	1	Purple	100
PCR Water	800 µL	1	White	100

Fungiplex *Candida* Control Kit

Reagent	Volume per tube	No. of tubes	Cap colour
Internal control	135 µL	3	Red
Positive Control Candida	60 µL	3	Green
Negative Control	240 µL	3	White

Plateformes PCR compatibles

Real-Time PCR Instrumentation Manufacturer	Real-Time PCR Platform Model	Real-Time PCR Instrument Software version	Verified Consumables
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast	2.3	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate MicroAmp® Optical 8-Cap Strips
Bio-Rad	CFX96™	3.1	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate MicroAmp® Optical 8-Cap Strips
Qiagen	Rotor-Gene Q 5plex HRM	2.3.1 OR QREx 1.0.0	Qiagen Strip Tubes and Caps, 0.1 mL
Roche	LightCycler® 480 II	1.5.1	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 MicroAmp® Optical 8-Cap Strips
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5	1.3.1	MicroAmp® Fast Optical 96-Well MicroAmp® Optical 8-Cap Strips

Extraction d'ADN

- Bruker: pas de plateforme d'extraction
- Recommandations à suivre: EAPCRI

Aspergillus PCR: One Step Closer to Standardization^{▽†}

P. Lewis White,^{1*} Stéphane Bretagne,² Lena Klingspor,³ Willem J. G. Melchers,⁴ Elaine McCulloch,⁵ Bettina Schulz,⁶ Niklas Finnstrom,⁷ Carlo Mengoli,⁸ Rosemary A. Barnes,⁹ J. Peter Donnelly,⁴ and Juergen Loeffler¹⁰ on behalf of the European *Aspergillus* PCR Initiative

Critical Stages of Extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in Whole-Blood Specimens^{▽†}

P. Lewis White,^{1*} Michael D. Perry,¹ Juergen Loeffler,² Willem Melchers,³ Lena Klingspor,⁴ Stéphane Bretagne,⁵ Elaine McCulloch,⁶ Manuel Cuenca-Estrella,⁷ Niklas Finnstrom,⁸ J. Peter Donnelly,³ and Rosemary A. Barnes⁹ on behalf of the European *Aspergillus* PCR Initiative

Evaluation of *Aspergillus* PCR Protocols for Testing Serum Specimens^{▽†}

P. Lewis White,^{1*} Carlo Mengoli,² Stéphane Bretagne,³ Manuel Cuenca-Estrella,⁴ Niklas Finnstrom,⁵ Lena Klingspor,⁶ Willem J. G. Melchers,⁷ Elaine McCulloch,⁸ Rosemary A. Barnes,⁹ J. Peter Donnelly,⁷ and Juergen Loeffler¹⁰ on behalf of the European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI)

White L. *J Clin Microbiol*, 2010, 48, 1231-1240

White L. *J Clin Microbiol*, 2010, 48, 3753-3755

White L. *J Clin Microbiol*, 2011, 48, 3842-3848

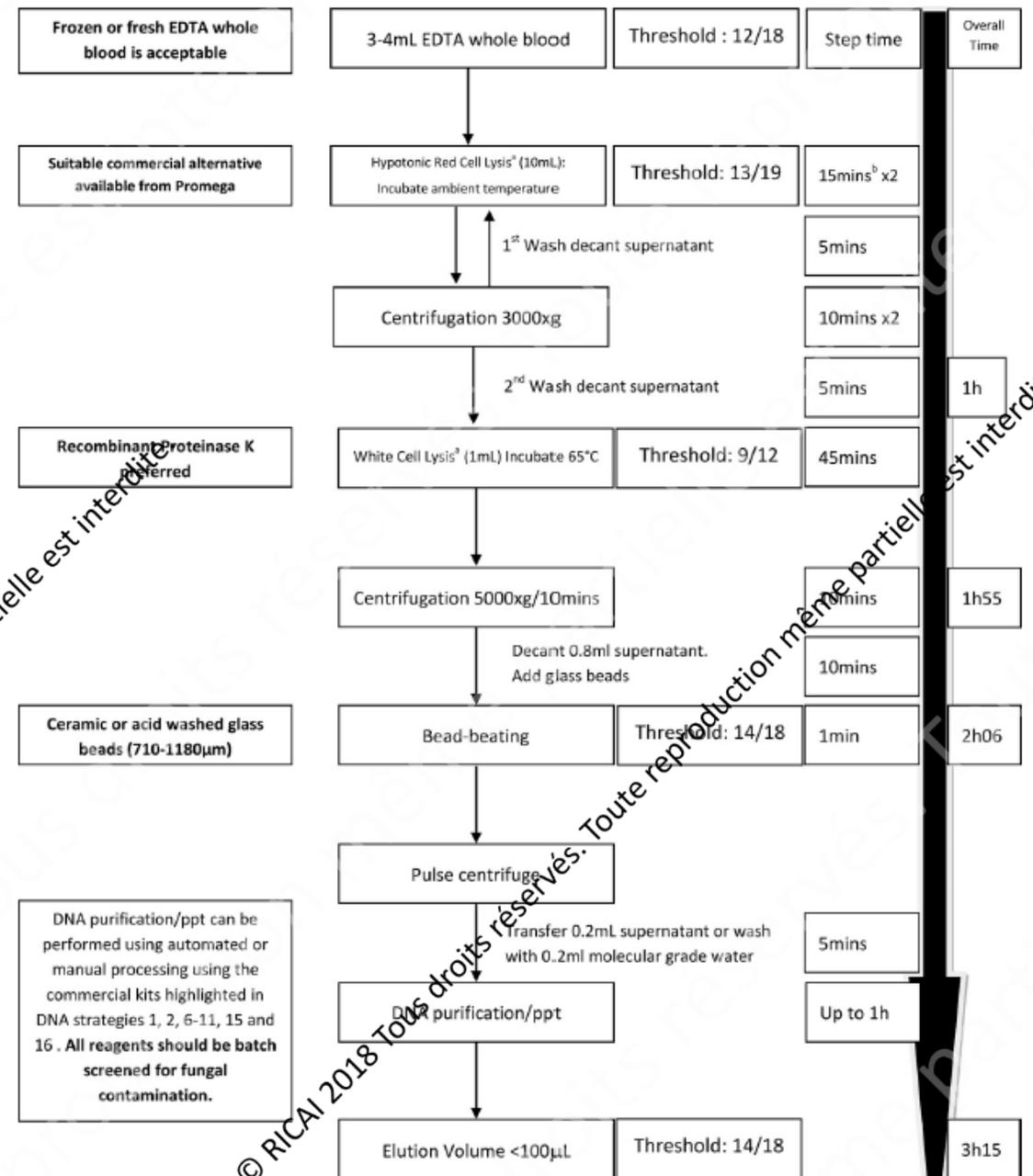
Extraction de l'ADN

Selon les recommandations de l'European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI)

Beaucoup d'inconvénients

- ❑ Sang total
- ❑ Pré-traitement
- ❑ Tropes étapes → long
- ❑ Tampon d'extraction à fabriquer

Aspergillus PCR: one step closer to standardisation.
 White L. J Clin Microbiol, 2010, 48, 1231-1240



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Critical Stages of Extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in Whole-Blood Specimens^{▽†}

P. Lewis White,^{1*} Michael D. Parry,¹ Juergen Loeffler,² Willem Melchers,³ Lena Klingspor,⁴ Stephane Bretagne,⁵ Elaine McCulloch,⁶ Manuel Cuenca-Estrella,⁷ Niklas Finnstrom,⁸ J. Peter Donnelly,³ and Rosemary A. Barnes⁹ on behalf of the European *Aspergillus* PCR Initiative

- ≥ 3 ml sang EDTA
- Lyse des hématies et leucocytes
- Bead-beating
- Elution volume $\leq 100\mu\text{l}$

Extraction

Article fondé sur la performance de la PCR
Aspergillus sur le **serum**

23 centres européens

Panels serum spikés avec ADN *Aspergillus*:
0-12.000 génomes/ μ l

15 systèmes d'extraction: manuels et
plateformes automatisées (Roche,
Qiagen, bioMérieux, Promega, Cepheid)

Evaluation of Aspergillus protocols for testing serum specimens.
White L. *J Clin Microbiol*, 2011, 48, 3842-3848

TABLE 4. Bivariate linear regression analysis between C_q and the additional covariates, excluding log₁₀ genomes/ml^a

Covariate	z value	P value
Sample vol	-2.27	0.023
DNA extraction system		
Roche	-0.11	0.909
Qiagen	-1.15	0.250
Other	1.50	0.133
Elution vol	2.96	0.003
PCR amplification system		
Roche	-0.64	0.521
ABI	0.53	0.598
Other	0.25	0.803
Template vol	-1.07	0.286
PCR vol	0.97	0.334
PCR target		
18S rRNA gene	-0.28	0.779
ITS region	-2.48	0.013
28S rRNA gene	0.39	0.698
Mitochondrial	2.57	0.010
Internal control	-2.18	0.029

^a Significant associations are highlighted in boldface. Note that a negative z value predicts an earlier C_q, and thus a higher probability of PCR positivity, whereas a positive value has the opposite effect.

TABLE 5. Recommendations of the EAPCRI for *Aspergillus* PCR protocols when testing serum

Result	Recommendation
<p>A positive association between serum volume was noted (z value, -2.27; $P = 0.024$). When detecting low fungal burden difference in sensitivity using a serum volume of ≥ 0.5 ml compared to < 0.5 ml is 2.1-fold ($P = 0.0091$).</p>	<p>Large volumes (≥ 0.5 ml) will improve sensitivity. For low fungal burdens (< 10 genomes/ml), a larger eluting material should be used.</p>
<p>Twenty-eight of 39 protocols evaluated designated a threshold of detection generating a threshold positivity rate of $\geq 50\%$.</p>	<p>While the nucleic acid extraction systems described here can extract <i>Aspergillus</i> DNA using the protocol as published, however, all kits should be screened for their limit of detection determined prior to clinical use.</p>
<p>Method 11 (Table 2) was specific for blood and was not able to efficiently detect <i>Aspergillus</i> in serum.</p>	<p>Method 11 should not be used for testing alternative specimen types.</p>
<p>A negative association between serum volume was noted (z value, 2.96; $P = 0.003$). When detecting low fungal burden difference in Cq for methods eluting in < 100 μl (4.1 cycles) compared to ≥ 100 μl (4.6 cycles) (95% CI, 1.9 to 5.8 cycles) was a 29.0% reduction in positivity.</p>	<p>Large volumes (≥ 100 μl) will reduce sensitivity. For low fungal burdens (< 10 genomes/ml), nucleic acid extraction in a smaller volume of < 100 μl is preferred. Elution in a volume of ≥ 100 μl is preferred where real-time PCR is inconsistent or not detected.</p>

- Volume de serum $\geq 0,5$ ml
- Volume d'éluion post-extraction $\leq 100\mu$ l
- N'importe quelle plateforme biomol utilisable mais attention aux contaminations
- Contrôle d'extraction indispensable

Clinical Performance of *Aspergillus* PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative

P. Lewis White,^a Rosemary N. Barnes,^b Jan Springer,^c Lena Klingspor,^d Manuel Cuenca-Estrella,^e C. Oliver Morton,^f Katrien Lagrou,^g Stéphane Bretagne,^h Willem J. G. Melchers,ⁱ Carlo Mengoli,^j J. Peter Donnelly,ⁱ Werner J. Heinz,^c Juergen Loeffler,^c the EAPCRI

Comparaison de la PCR *Aspergillus* sur plasma et serum en situation clinique dans 2 centres (Cardiff/UK et Würzburg/Ger)

Période d'1 an – 19 cas prouvés/probables et 42 contrôles.

Sensibilité meilleure sur **plasma** 94/83% versus 68/76% sur **serum**

Positivité avant diagnostic: sur plasma 16,8 jours versus 10 jours sur serum

Evaluation analytique du kit Fungiplex *Candida*

CHU de Liège

Novembre-Décembre 2017



Fungiplex candida: évaluation analytique au CHU Liège

Souches *Candida* inoculées dans EDTA

C. albicans ATCC 10231

C. glabrata ATCC 90030

C. krusei ATCC 6258

C. parapsilosis ATCC 22019

C. tropicalis NEQAS 1036

C. lusitanae NEQAS 1511

C. guilliermondii NEQAS 1035

C. dubliniensis IHEM 14280

1CFU/mL

10 CU/mL

100 CFU/mL

1000CFU/mL

Spiking de sang de volontaires sains (3mL)

1

Amplification de l'ADN par PCR sur LightCycler® 480 II

3

Extraction d'ADN

3h15

Extraction manuelle EAPCRI (prot K+BB)
+ purification sur QIAcube (Qiagen)
Elution dans 50µl tampon



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Amplification sur LC480II et comparaison avec une qPCR *Candida in house*

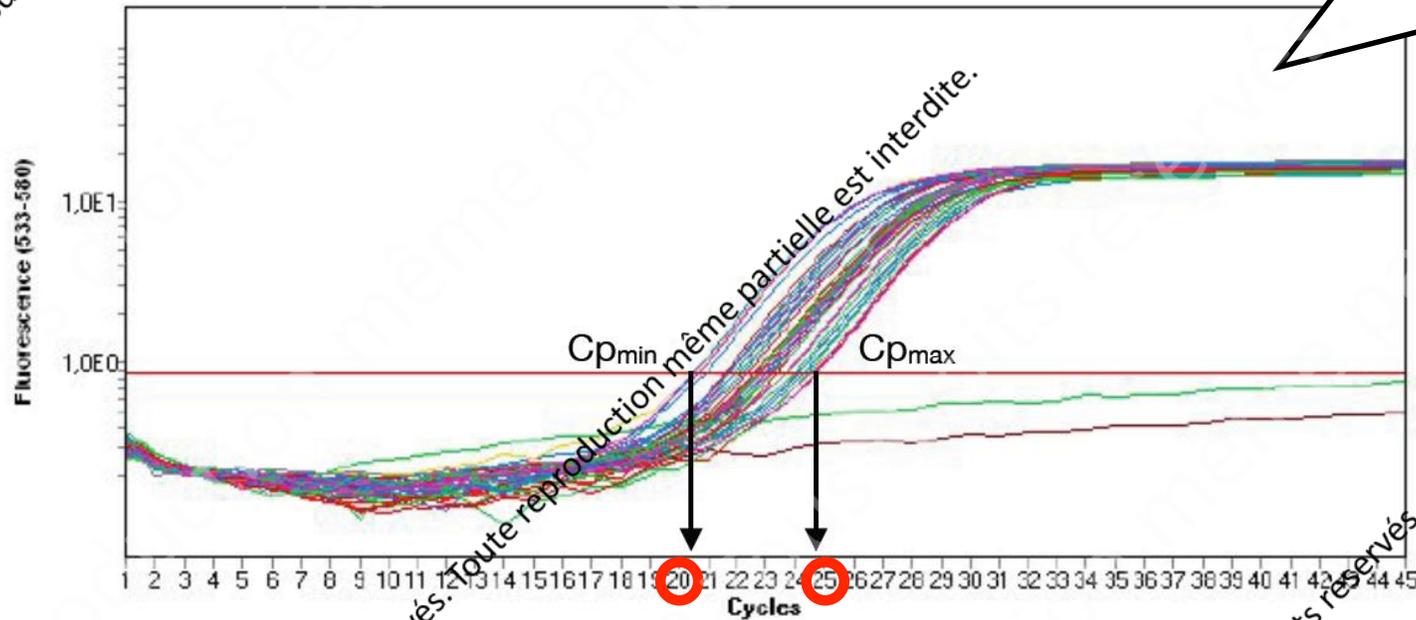
- ADN extraits
- ADN dilués à partir de la dilution 1000CFU/mL
- QCMD *Candida* 2017

	BRUKER	METWALLY
Préparation avant analyse	Courte : 1 seul Master Mix	Longue : 3 Master Mix
Protocole de température	Activation : 1 cycle de 15 min à 95°C Dénaturation : 5 s à 95°C Hybridation/extension : 30 s à 60°C } 45 cycles	Activation : 1 cycle de 10 min à 95°C Dénaturation : 30 s à 95°C Hybridation/extension : 1 min à 60°C } 45 cycles
Analyse	1 puits/échantillon (multiplex)	3 puits/échantillon
Temps d'analyse	1h15	1h50
Contrôle interne	Contrôle interne d'amplification Absence de contrôle d'extraction	<u>Contrôle d'extraction endogène (β-globine)</u>

Qualité de l'extraction : PCR β -globine

Impact sur la charge fongique

Observations :
Résultats positifs pour 40 échantillons
Cp entre 20 et 25



42 échantillons amplifiés

Conclusion :
Extraction réussie-
Absence
d'inhibiteur de PCR

Figure : Courbe d'amplification des échantillons d'ADN en PCR β -globine

Sensibilité du kit Fungiplex® Candida

- ADN extraits

a) Analyse en simplex (Cg Ca) ou duplicate (Cg-Cd-Cp-Ck)

	1000		100		10		1	
	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type
<i>C.glabrata</i>	1/1	31,42	1/1	33,65	1/1	35,60	1/1	37,87
<i>C.albicans</i>	1/1	31,99	1/1	35,65	1/1	37,47	0/1	/
<i>C.tropicalis</i>	2/2	34,53 ± 0,75	1/2	35,95	1/2	37,73	0/2	/
<i>C.dubliniensis</i>	2/2	31,7 ± 1,36	2/2	36,34 ± 1,2	1/2	37,49	0/2	/
<i>C.parapsilosis</i>	2/2	34,27 ± 0,54	1/2	36,11	0/2	/	0/2	/
<i>C.krusei</i>	2/2	33,35 ± 0,73	1/2	35,04	0/2	/	0/2	/
Total	10/12		7/12		4/12		1/12	
Sensibilité par concentration (%)	83,33		58,33		33,33		8,33	

b) Analyse en triplicate

	1000 CFU/mL		100 CFU/mL		10 CFU/mL		1 CFU/mL	
	Fréquence de détection	Cp _{moyen}	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type	Fréquence de détection	Cp _{moyen} ± écart-type
<i>C.glabrata</i>	1/1	31,56	3/3	32,63 ± 0,27	3/3	34,76 ± 0,69	0/3	/
<i>C.albicans</i>	1/1	32,13	3/3	34,86 ± 0,24	0/3	/	0/3	/
<i>C.tropicalis</i>	1/1	35,04	3/3	35,11 ± 0,40	2/3	36,08 ± 0,13	0/3	/
<i>C.dubliniensis</i>	1/1	32,59	3/3	35,55 ± 0,29	0/3	/	0/3	/
<i>C.parapsilosis</i>	1/1	33,56	3/3	36,54 ± 0,51	1/3	36,65	0/3	/
<i>C.krusei</i>	1/1	32,59	3/3	34,3 ± 0,47	0/3	/	0/3	/
Total	6/6		18/18		6/18		0/18	
Sensibilité par concentration (%)	100		100		33,33		0	

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Résultats globaux de Fungiplex Candida sur ADN extraits

	1000 CFU/mL	100 CFU/mL	10 CFU/mL	1 CFU/mL
C. glabrata	2/2	4/4	4/4	1 /4
C. albicans	2/2	4/4	1 /4	0/4
C. tropicalis	2/2	4/5	3/5	0/5
C. dubliniensis	2/2	5/5	1/5	0/5
C. parapsilosis	2/2	4/5	1/5	0/5
C. krusei	2/2	4/5	0/5	0/5
Total	12/12	25/28	10/28	7/28
Sensibilité	100%	71%	35,7%	3,5%

Fungiplex sur ADN dilués (en duplicate)

	100 CFU/mL	10 CFU/mL	1 CFU/mL
	<i>Moyenne Cp des duplicate</i>		
C. glabrata	35,1	36,46	Non détecté
C. albicans	38,3	40	Non détecté
C. tropicalis	36,85	38,56	38,12
C. dubliniensis	37,16	Non détecté	Non détecté
C. parapsilosis	37,02	37,32	Non détecté
C. krusei	35,43	37	Non détecté
Total	6/6	5/6	1/6
Sensibilité	100%	83,3%	16,6%

CONCLUSION

- Sensibilité améliorée par rapport aux performances sur ADN extraits **pour 10 CFU/mL**
- Préparation et extraction plus aléatoire dans les faibles quantités d'ADN
- Effet de plateau de la PCR >38Cp

Détection des contrôles externes QCMD Candida 2017

- QCMD 1 *C. albicans*
- QCMD 2 *C. albicans*
- QCMD 3 *C. albicans & C. glabrata*
- QCMD 4 *C. albicans*
- QCMD 5 *C. glabrata*
- QCMD 6 *C. parapsilosis*
- QCMD 7 *C. albicans*
- QCMD 8 *Candida négatif*
- QCMD 9 *C. krusei*

Fungiplex Metwally



Observations :
Identification correcte
des 9 QCMD par
Fungiplex

Conclusions : Sensibilité
diagnostique de 100 %

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Conclusions étude FungiPLEX Candida au CHU Liège

POINTS POSITIFS

- Détection rapide de 5 espèces de Candida :
C. glabrata, C. krusei, C. albicans, dubliniensis, C. tropicalis, C. parapsilosis dans le sang inoculé EDTA
- Détection différenciée de 2 espèces fluconazole résistants
- Un puits/test: PCR multiplexe
- Coût par test abordable <100€ euros

POINTS A AMELIORER

- Matrice Sang total: extraction fastidieuse car semi-automatique
 - A automatiser
 - Changer de matrice → PLASMA + automatisation complète.
- Sensibilité du kit à 10 CFU/mL: 83,3% sur ADN dilués vs 35% sur ADN extraits: biais lié à la méthode d'extraction/préparation des échantillons simulés?
- Contrôle d'extraction

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

RÉSULTATS BRUKER

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

The evaluation of a real time PCR assay for aiding the diagnosis of Invasive Candidiasis: Fungiplex® Candida

TMM 2017 P106

Julie Dixon, Jennifer Duggan and Corinne Dalton, Molecular Testing Branch, Bruker Microbiology, Glasgow, UK, jennifer.duggan@bruker.com

Introduction

Invasive fungal diseases (IFDs) are a significant cause of mortality and morbidity, posing a risk to immunosuppressed patients, such as those undergoing solid organ transplant, allogeneic haematopoietic stem cell transplant, or those with prolonged stay in the intensive care unit. Difficult to diagnose and with poorer patient outcome directly attributable to delayed treatment, IFD is combated in many healthcare settings by employing prophylaxis and empiric therapy. PCR has been shown, in combination with other biomarkers, to be a promising tool to aid the diagnosis of IFD.^{1,2}

Bruker have already launched their CE-IVD Fungiplex® Aspergillus assay and are now introducing a CE-IVD Fungiplex® Candida assay. Together, the two multiplex real-time PCR assays test for Invasive Aspergillus (IA) and Invasive Candidiasis (IC), detecting the most common causative agents and differentiating those species resistant to first line treatment.



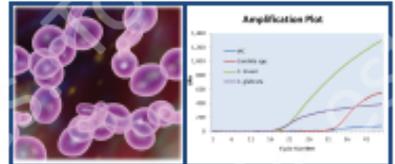


Fig 2: Images of Candida (left) and a representative real-time PCR amplification plot for the Fungiplex Candida assay (right)

Results & Discussion

The results of the Fungiplex Candida internal validation are shown in Table 1. Candida targets are detectable at 10 Ipc, with reproducible detection at 10 Ipc (or 40 Ipc for C. krusei) using plasmid DNA. Table 2 provides a summary of the analytical performance.

The Fungiplex Candida Real Time PCR assay has just completed a multi-centre performance evaluation, assessing both retrospective and simulated samples.

Conclusions

- The Fungiplex Candida Real Time PCR assay exhibits excellent analytical performance tested against a range of Candida species
- Analytical sensitivity performance achieved at 98 %
- Analytical specificity performance reported > 99 %
- Fungiplex Candida Real Time PCR offers the potential to aid the diagnosis of IC and guide therapy.



Fig 1: Fungiplex Candida Real Time PCR kit

Methods

The analytical performance of the Fungiplex Candida Real Time PCR assay was determined by testing simulated samples of plasmid material (10 – 1x10⁸ input copies [Ipc]) and genomic DNA (1 – 1000 CFU) for the most prevalent pathogenic Candida species (Table 1) across a total of 5 real-time PCR instruments from a range of manufacturers.

The Fungiplex assays have been designed to be easy to use in a format with internal positive and negative controls provided (1). Results are generated in < 2 hours from extracted DNA. The assays are designed to run on DNA extracted from whole blood, serum and plasma samples without culture.

Candida Target	Plasmid DNA		Genomic DNA		Candida Target	Plasmid DNA		Genomic DNA	
	Ipc	Detection	CFU	Detection		Ipc	Detection	CFU	Detection
C. albicans	10	47/56	1	8/8	C. dubliniensis	10	50/56	1	4/4
	30	70/71	10	20/20		30	56/56	10	8/8
	3x10 ³	56/56	100	20/20		3x10 ³	56/56	100	8/8
C. glabrata	10	35/56	1	34/20	C. parapsilosis	10	52/56	1	4/4
	30	69/71	10	44/44		30	56/56	10	8/8
	3x10 ³	56/56	100	44/44		3x10 ³	56/56	100	8/8
C. krusei	10	45/56	1	19/20	C. tropicalis	10	45/56	1	4/4
	30	56/71	10	44/44		30	56/56	10	8/8
	3x10 ³	56/56	100	44/44		3x10 ³	56/56	100	8/8

Table 1: Summary of Analytical Results from testing the previous Candida species

Result	Plasmid samples	Genomic samples
Sensitivity (%)	93.0	93.3
Specificity (%)	99.9	96.5

Table 2: Analytical performance of the Fungiplex Candida Real-Time PCR assay

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr L. White and R. Pease (University Hospital Wales, Cardiff) for the preparation of simulated samples.

References

1. M. Anagnostou et al. Clin. Infect. Dis. (2008) 47 (8): 1289-1292
2. P.S. Pappas et al. Clin Infect Dis. (2004) 39 (1): 40-49
3. De Pauw et al. Clin. Infect. Dis. (2006) 43 (12): 1823-1831

Real-Time PCR

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



The evaluation of a real time PCR assay for aiding the diagnosis of Invasive Candidiasis: Fungiplex® Candida

Échantillons simulés

- Plasmides de 30 à 3×10^6 copies
- Cultures: 1 à 1000 CFU

Result	Plasmid samples	Genomic samples
Sensitivity (%)	93.0	98.2
Specificity (%)	99.9	99.5

Table 2: Analytical performance of the Fungiplex Candida Real-Time PCR assay

Candida Target	Plasmid DNA		Genomic DNA		Candida Target	Plasmid DNA		Genomic DNA	
	ipc	Detection	CFU	Detection		ipc	Detection	CFU	Detection
<i>C. albicans</i>	10	47 / 56		8 / 8	<i>C. dubliniensis</i>	10	50 / 56	1	4 / 4
	30	70 / 71	10	20 / 20		30	56 / 56	10	8 / 8
	3×10^6	56 / 56	100	20 / 20		3×10^6	56 / 56	100	8 / 8
			1000	8 / 8				1000	4 / 4
<i>C. glabrata</i>	10	35 / 56	1	14 / 20	<i>C. parapsilosis</i>	10	52 / 56	1	4 / 4
	30	69 / 71	10	44 / 44		30	56 / 56	10	8 / 8
	3×10^6	56 / 56	100	44 / 44		3×10^6	56 / 56	100	8 / 8
			1000	20 / 20				1000	4 / 4
<i>C. krusei</i>	10	38 / 56	1	19 / 20	<i>C. tropicalis</i>	10	45 / 56	1	4 / 4
	40	66 / 71	10	44 / 44		30	56 / 56	10	8 / 8
	4×10^6	56 / 56	100	44 / 44		3×10^6	56 / 56	100	8 / 8
			1000	20 / 20				1000	4 / 4

Sensibilité à 10 ipc/1 CFU pour toutes les espèces sauf *C. glabrata* (30ipc/10CFU)

Fungiplex[®] Candida

Performance evaluation

Résultats des échantillons testés

- Etude retrospective et panels simulés (sang total, serum et plasma), testés en double
 - Prélèvements cliniques:
 - **Candidoses invasives * prouvées** vs
 - «pas d'évidence d'infection fongique»
- * Echantillons de 2010-2017 (testés in 2017)

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Echantillons simulés Performance (≥ 5 CFU mL ⁻¹)	97.8	100
Echantillons cliniques rétrospectifs	83.3	98.2
Résultats de l'évaluation de la performance du test	97.2	99.9

- Performance combinée des échantillons cliniques et simulés de concentration[‡] (5-10 CFU mL⁻¹) and above: ‡ Note: detection of 1 CFU mL⁻¹ = 83 – 88 %
 - **Sens = 97 %**
 - **Spec = 99.9 %**

Conclusions

- Sensibilité analytique entre nos mains: sensibilité acceptable sur les ADN dilués: 10CFU/mL pour les 5 espèces majeures/ 83% sensibilité.
- Facile à mettre en oeuvre par tous les laboratoires de biologie moléculaire mais méthode **peu automatisée**.
- Inconvénient absence de contrôle d'extraction dans le kit.
- Coût du test abordable.

Perspectives

-Reproduire les tests analytiques à partir de plasma spiké et sur l'automate d'extraction Qiasymphony.

-Evaluation clinique dans une étude multicentrique en comparaison avec des biomarqueurs tels que le BDG, Ag Mannane-Ac antimananne.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Remerciements

➤ Aurane SERVAIS

➤ Marie Wéry

➤ Equipe de biologie moléculaire du service de microbiologie au CHU de Liège
○ Cécile Meex, Raphaël Boreux, Laetitia Levoux

➤ Plateforme de biologie moléculaire de l'Unilab
○ Valérie Capraro

➤ Bruker (Mise à disposition de kits Fungiplex *Candida* et support technique)