PCR as a Diagnostic Tool for the Detection of Fungal Infection in Immunocompromised Patients

Thesis

Submitted for partial fulfillment of master degree in ***Pediatrics***

Presented By
Dr. Reham Samir Elansary
M.B.,B.Ch (2004),
Faculty of Medicine, Ain-Shams University

Supervised By

Prof. Zeinab Awad El Sayed

Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine, Ain-Shams University

Dr. Zeinab Ebraheem Hasan

Assistant Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine – Ain Shams University

Dr. Rasha Ahmed Reda Nasr

Assistant Professor of Microbiology And Immunology
Faculty of Medicine – Ain Shams University

Faculty of Medicine

Ain Shams University
٢٠١٠

TABLE OF CONTENTS

Subject	Page
LIST OF ABBREVIATIONS	ii
LIST OF TABLES	iv
LIST OF FIGURES	v
I- INTRODUCTION	١
II- AIM OF THE WORK	٣
III- REVIEW OF LITERATURE:	
١- The Immunocompromised Host	٤
٢- Fungal infections	٢٣
٣- Candida	٢٩
٤- Aspergillus	٣٨
٥- Diagnosis of fungal infection	٤٥
٦- Management of fungal infection	٥٥
IV- PATIENTS AND METHODS	٦٢
V- RESULTS	٧٠
VI- DISCUSSION	٨١
VII- RECOMMENDATIONS	٩١
VIII- SUMMARY AND CONCLUSIONS	٩٢
IX- REFERENCES	٩٤
X- ARABIC SUMMARY	--

LIST OF ABBREVIATIONS

A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
ABPA	Allergic bronchopulmonary aspergillosis
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AMC	Absolute monocytic count
AML	Acute myeloblastic leukemia
ARNF	Antibiotic-resistant neutropenic fever
C albicans	Candida albicans
CT	Computed tomography
CGD	Chronic granulomatus disease
CMV	Cytomegalovirus
CRP	C reactive protein
CVID	Common variable immunodeficiency
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC	European organisation for research and treatment of cancer
ESR	Erythrocyte sedimentation rate
FDA	US food and drug administration
GI	Gastrointestinal
GM	Galactomannan
HIES	Hyper-IgE syndromes
HIV	Human Immunodeficiency virus
HRCT	High-resolution computed tomography
HTLV-١	Human T lymohocytic virus-١
IA	Invasive aspergillosis
IC	Invasive candidiasis
ICH	Intracranial hemorrhage
ICU	Intensive care unit
IFI	Invasive fungal infection
IMA	Inhibitory mould agar
IPA	Invasive pulmonary aspergillosis
IUIS	International Union of Immunological Society
KOH	Potassium hydroxide

LAD	Leucocyte adhesion defect

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

MSG	National institute of allergy and infectious diseases mycosis study group
NPV	Negative predictive value
PCR	Polymerase chain reaction
PID	Primary immunodeficiency disease
PPV	Positive predictive value
RA	Rheumatoid arthritis
RQ-PCR	Real-time quantitative PCR
RSV	Respiratory syncitial virus
SCID	Severe combined immunodeficiency
S-DD	Susceptible-dose dependent
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SLE	Systemic lupus erythrematosis
SPP	Species
TLRs	Toll-like receptors
WAS	Wiscott Aldrich syndrome

List of Tables

Table	Title of tables	Page
١	Classification of primary immunodeficiency disorders A. Predominantly antibody deficiencies B. Combined T-cell and B-cell immunodeficiencies C. Other well defined immunodeficiency syndromes D. Diseases of immune dysregulaton E. Congenital defect of phagocytic number, function or both F. Diseases of innate immunity G. Diseases of autoinflammation H. Complement deficiency	٥
٢	Causes of acquired immunodeficiency	٢٠
٣	Definition of levels of immunocompromised patients	٢٢
٤	Classification of fungi	٢٤
٥	Criteria for diagnosing a fungal infection • Criteria for proven invasive fungal disease except for endemic mycoses: • Criteria for probable invasive fungal disease except for endemic mycoses: • Criteria for the diagnosis of endemic mycoses	٤٦
٦	Demographic, clinical and some laboratory data of patients.	٧٠
٧	Patients with neutropenia and patients on antifungal treatment in different groups	٧٠
٨	Types of immunodeficiency and clinical presentations of the studied cases	٧١
٩	Results of PCR with respect to different aetiology of primary and secondary immunodeficiency	٧٢
١٠	Results of blood culture and PCR of the studied cases	٧٣

١١	Results of panfungal PCR with respect to sex, fever, type of immunedeficiency, clinical presentation and antifungal treatment	٧٥

List of Tables (Cont.)

Table	Title of tables	Page
١٢	Comparison between blood culture and panfungal PCR in detection of fungal infection	٧٦
١٣	Comparison between blood culture and PCR for Aspergillus in detection of Aspergillus	٧٧
١٤	Comparison between blood culture and panfungal PCR in detection of candida	٧٧
١٥	Clinical and laboratory values with respect to results of PCR	٧٨

List of figures

Fig.	Title of figures	Page
١	Candida albicans on Sabourauds dextrose agar	٢٩
٢	Oropharyngeal Candidiasis	٣٢
٣	Aspergillus fumigates	٣٨
٤	Pulmonary Aspergillosis Syndromes	٤٠
٥	Allergic broncho pulmonary aspergillosis (chest CT)	٤١
٦	Aspergillus brain involvement (brain CT)	٤٣
٧	The rationale for applying non-culture-based diagnostic methods for early management of invasive aspergillosis	٥٣
٨	Air-crescent sign of Aspergillus infection	٥٤
٩	Halo-sign of Aspergillus infection	٥٤
١٠	Mechanism of action of antifungal drugs	٥٦
١١	Schematic representation of rDNA region with primers ITS١ and ITS٤ localization	٦٦
١٢	Real-time PCR amplification results	٦٨
١٣	Melting curve	٦٨
١٤	Aetiology of secondary immunodeficiency in the studied patients	٧١
١٥	Results of panfungal PCR and PCR for Aspergillus	٧٤
١٦	Variation of the duration of current illnes and the duration of antibiotic administration with the results of panfungal PCR	٧٩
١٧	Variation of the hemoglobin levels, neutrophil and lymphocytes absolute counts with the results of panfungal PCR	٧٩
١٨	Variation of the CRP results with the results of panfungal PCR.	٨٠

الملخص العربي

أجريت هذه الدراسة على ثلاثين مريضا (٩ إناث و ٢١ ذكور)، والذين كانوا يعانون من اختلال فى الجهاز المناعى (أولى أو مكتسب) وكانوا ذوي شبهة في إصابتهم بالعدوى الفطرية ، ولقد تم انتقاؤهم بشكل عشوائي من وحدة الحساسية والمناعة، وحدة الدم والأورام ووحدة العناية المركزة بمستشفي الأطفال جامعة عي شمس، وكانت أعمارهم تتراوح بين (ثلاثة اشهر و١٤ سنة)، وقد امتدت الدراسة من مارس ٢٠٠٩ إلي ابريل ٢٠١٠ ، وقد تم تقسيمهم إلي مجموعتين :

- مجموعة مرضي نقص المناعة الأولي : ٩ مرضي (٣٠٪)
- مجموعة مرضي نقص المناعة الثانوي : ٢١ مريض (٧٠٪)

وقد تم اخذ تاريخ مرضي مفصل وأيضا تم عمل فحص طبي شامل للمرضي في هذه الدراسة، وأيضا تم عمل هذه الاختبارات المعملية:

- تعداد الدم الكامل مع العد التفصيلي
- البروتين التفاعلي C
- مزرعة دم للفطريات
- تفاعل البلمرة التسلسلي العام
- تفاعل البلمرة التسلسلي لفطر الرشاشيات

وكشفت الدراسة ان مزرعة الدم كانت سلبية للبكتريا والفطريات في٢٥ مريض(٨٣,٣٪)، وموجبة لفطر المبيضة في مريضين (٦,٧٪) ، وموجبة للبكتريا في ٣ مرضي (٩,٩٪).

إن مزرعة الدم تمتعت بحساسية ١٢٪ وخصوصية ١٠٠٪ مع قيمة تنبؤية موجبة بمقدار ١٠٠٪ ، وقيمة تنبؤية سالبة بمقدار ٤٦٪ ، ودقة في التشخيص بمقدار ٥٠ ٪.

ولقد تم تشخيص ١٧ مريض (٥٦,٧٪) بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي العام لأصابتهم بالعدوى الفطرية ، ولم يتم تشخيص ١٥ مريض (٥٠٪) بواسطة مزرعة الدم حيث تم تشخيصهم بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي ، وكان جميع

المرضي الذين يعانون من مزرعة دم ايجابية للفطريات كانوا أيضا نتيجة التحاليل ايجابية بواسطة تفاعل البلمرة التسلسي.

وفي هذه الدراسة لم نستطع إثبات وجود إي علاقة بين نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي واختلاف أعمار المرضي، صورة الدم، سرعة الترسيب، اختلاف جنسهم، درجة ارتفاع الحرارة، نوع الاختلال في الجهاز المناعي واخذ الأدوية المضادة للفطريات ولكن كان هناك علاقة بين ارتفاع البروتين التفاعليC ونتائج تفاعل البلمرة التسلسلي الموجبة.

وفي هذه الدراسة قد تم اكتشاف فطر المبيضة في١١ مريض (٣٧٪) مما يعني إن ٩ مرضي قد تم تشخيصهم بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي ولم يتم تشخيصهم بواسطة مزرعة الدم ، وأيضا تم اكتشاف فطر الرشاشيات في ٦ مرضي (٢٠٪) بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي لفطر الرشاشيات ولم يتم اكتشاف إي فطر رشاشيات بواسطة مزرعة الدم.

و قد استنتجت هذه الدراسه أن تفاعل البلمره التسلسلي العام قد اكتشف وجود عدوى فطريه حيث لم يتم اكتشافها بواسطة مزرعة الدم مما يوضح أهمية استخدام تفاعل البلمرة التسلسلي العام في التشخيص المبكر للعدوى الفطرية في مرضي اختلال الجهاز المناعي.

استخدام تفاعل البلمرة التسلسلى فى اكتشاف العدوى الفطرية فى مرضى اختلال الجهاز المناعى

رسالة

توطئة للحصول على درجة ماجستير ***طب الأطفال***

مقدم من

الطبيبة / ريهام سمير الانصارى

بكالوريوس الطب و الجراحة-جامعة عين شمس (٢٠٠٤)

تحت اشراف

الأستاذة الدكتورة / زينب عوض السيد

أستاذ طب الأطفال

كلية الطب-جامعة عين شمس

الدكتورة / زينب إبراهيم حسن

أستاذ مساعد طب الأطفال

كلية الطب-جامعة عين شمس

الدكتورة / رشا أحمد رضا نصر

أستاذ مساعد الكائنات الدقيقة و المناعة

كلية الطب-جامعة عين شمس

كلية الطب-جامعة عين شمس

٢٠١٠

Acknowledgement

First and foremost, I am always indebted to ***Allah****, to Whom I relate any success in achieving any work in my life.*

I would like to express my utmost gratitude to my ***Prof. Dr. Zeinab Awad El Sayed****, Professor of pediatrics, Faculty of Medicine, Ain Shams University.*

I'm indebted to ***Dr. Zeinab Ebraheem Hasan****, Assistant professor of pediatrics, Faculty of Medicine, Ain Shams University.*

I would like to express my sincere gratitude and deep respect to ***Dr. Rasha Ahmed Reda Nasr,*** *Assistant professor of medical microbiology and immunology, Faculty of Medicine, Ain Shams University.*

Thanks are due to all ***Resident Doctors and nurses*** *of the Pediatric Allergy and Immunology Unit and Hematology/Oncology Unit of Ain Shams Children's Hospital,*

I'm grateful to all ***studied childrent*** *and* ***their parents*** *for their assistance to perform this work.*

Introduction

Invasive fungal infections (IFIs) is a major cause of mortality and morbidity in immunocompromised patients. The precise prevalence of disease is not known, but population-based surveillance estimates it at ١٢-١٧ per ١٠٠,٠٠٠ population (***Kibbler et al., 2003 and Lamagni et al., 2001***).

The most common fungi that cause disease in transplant recipients and other immunocompromised patients are Candida and Aspergillus species. The incidence of fungal infection varies among different patient groups, although the mortality from invasive yeast infections appear to be less than the mortality from invasive mold infections (***McNeil et al.,*** ٢٠٠١). Since non-albicans Candida species and non-fumigatus Aspergillus species are increasing in importance (***Bille et al.,*** ***٢٠٠٥; Coleman et al., ١٩٩٨ and Toorres et al.,*** ٢٠٠٣), new diagnostic approaches covering a large number of fungal species are required (***Leuka., 2007***).

Although conventional diagnostic tests such as histology, microscopy, and culture remain the cornerstone of proving the presence or absence of fungal disease, their yield is low and, therefore, their impact on clinical decisions to treat patients is limited. Invasive procedures such as biopsy of the infected site may be precluded due to the presence of severe thrombocytopenia. Furthermore, cultures become positive at a