

Alınan örnekten hangi tetkikler istenmeli?

MIKROBİYOLOJİK TANI:

- KONVANSİYONEL YÖNTEMLER

Direk mikroskopik inceleme

Kültür

- DİĞER YÖNTEMLER

Moleküler yöntemler ??

YAYMA

Boyama : Hangi boyalar?

YÖNTEM	UYGULAMA AMACI	SIK GÖZLENEN YAPILAR
Gram boyası	Bakteriyal etkenlerin ve maya mantarlarının saptanmasında kullanılır	Bakteriler, Gram pozitif, tomurcuklanan maya hücreleri (+ psödohif, gerçek hif)
Potasyum hidroksit (KOH) ile ıslak preparat hazırlama	Örnekteki organik bileşikleri eriterek örnekte bulunan olası bir mantarın görülmesini kolaylaştırır	Hif, artrokonidyum
"Calcofluor" beyazı ile floresan boyama	Mantara ait yapıların görülme olasılığını artırır. KOH'den önemli ölçüde daha duyarlıdır.	Hif, artrokonidyum, maya hücreleri
Modifiye aside dirençli boyama yöntemi	Nocardia, Rhodococcus,...	Filamentöz, ince uzun, dallanan, aside kısmi dirençli basiller

Yayma tanıya ne ölçüde yardımcı?

AVANTAJLARI ve ÖNEMİ:

- Hızlı olası ön tanı
- Pozitif kültür sonucunun değerlendirilmesinde yardımcı (özellikle küfler)

Yaymanın duyarlılığı birçok faktörden etkilenebilir...:

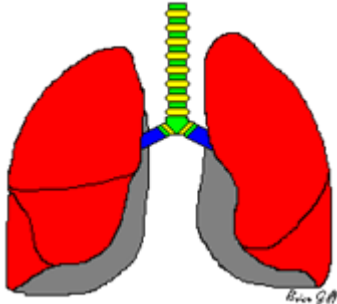
Uygun Örnek Seçimi

Bir küf mantarına bağlı alt solunum yolu enfeksiyonu şüphesinde uygun örnek?

Kontaminasyon? Kolonizasyon? Enfeksiyon?

Etkeni saptama şansı

Biyopsi > BAL > DTA > Balgam



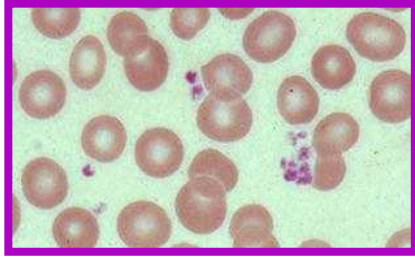
≥ 2
örnekte
aynı küf
üremelil

Mikroskopik inceleme ve kültür: Duyarlılığı (olumsuz yönde) etkileyen faktörler

• Uygun (steril) örnek alınmasındaki zorluklar

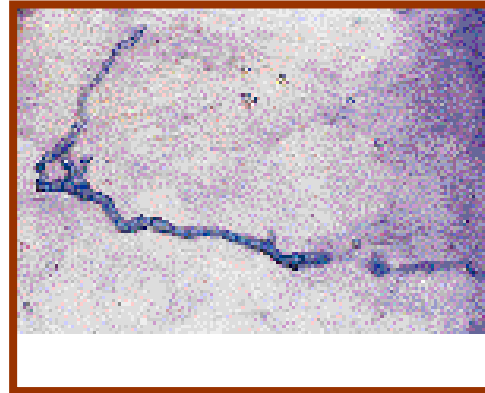
• Örnekteki mikroorganizma miktarının azlığı

• Bilgi ve deneyim eksikliği



Trombositopeni

Genel durum bozukluğu



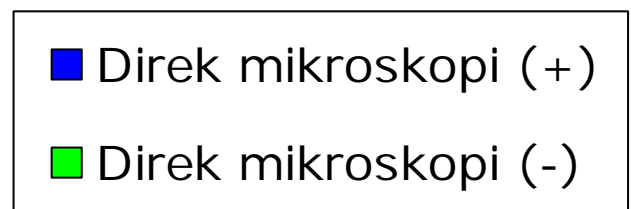
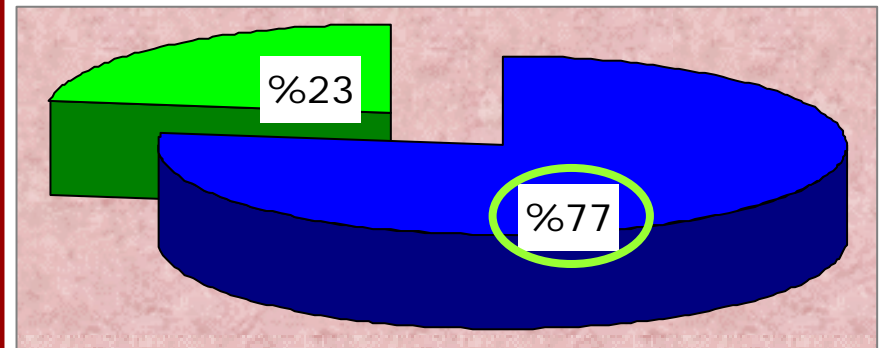
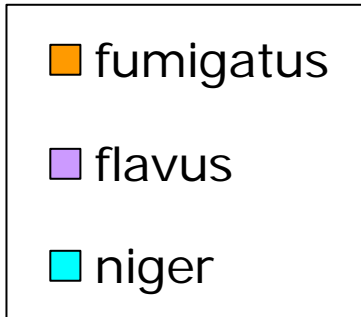
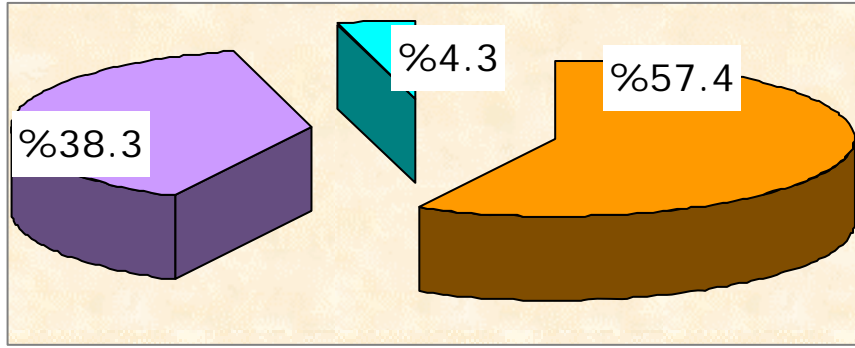
Kültürde Aspergillus türlerinin izole edildiği invazif aspergillozlu olgularda direk mikroskopi pozitifliği

ERİŞKİN

H.Ü. Mikoloji Lab., 1998-2005; n=42

43 örnek (13'ü biyopsi örneği)

Direk mikr.ik inceleme yapılabilen 35 klinik örnek



Yayma ile tanı: Mantarların mikroskopik ayırımı mümkün mü?

MİKROSKOPİK OLARAK GÖZLENEN MANTAR YAPILARI:

Maya hücreleri

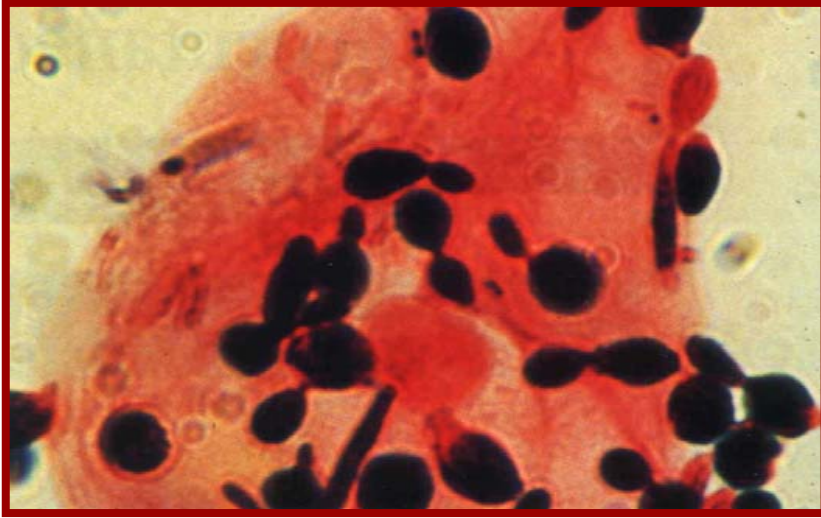
Psöдохif

Gerçek hif (septalı / septasız)

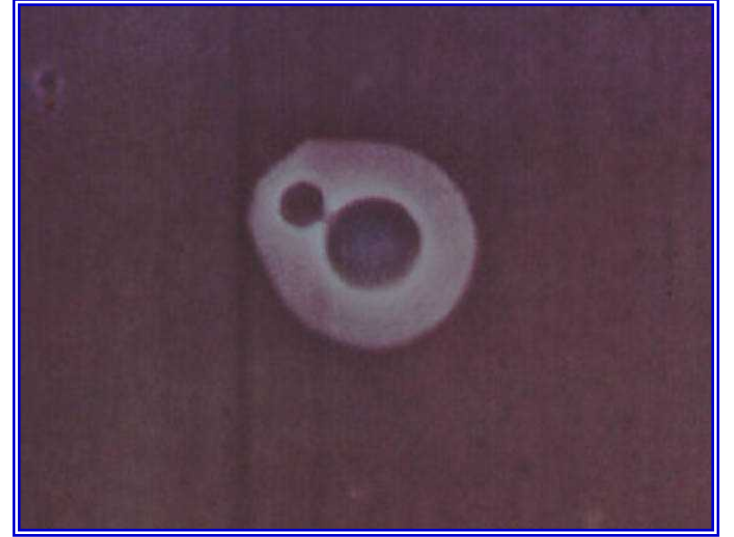
Artrokonidyum

Sferül

Mikroskopik inceleme



Tomurcuklanan maya hücreleri ve psödohif (Gram)

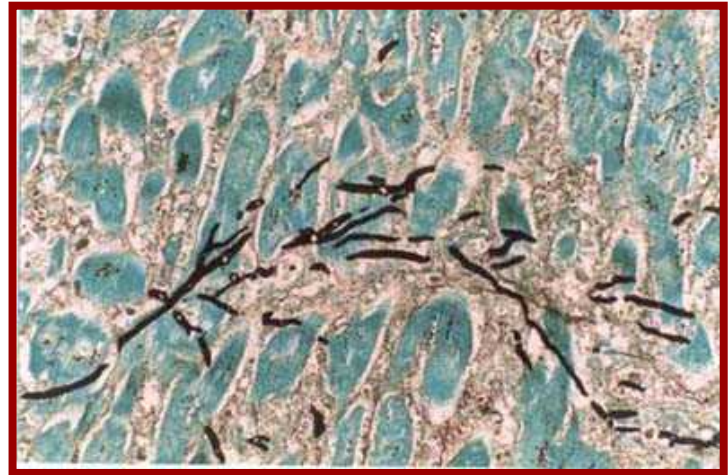


Kapsüllü maya hücreleri (çini mürekkebi)

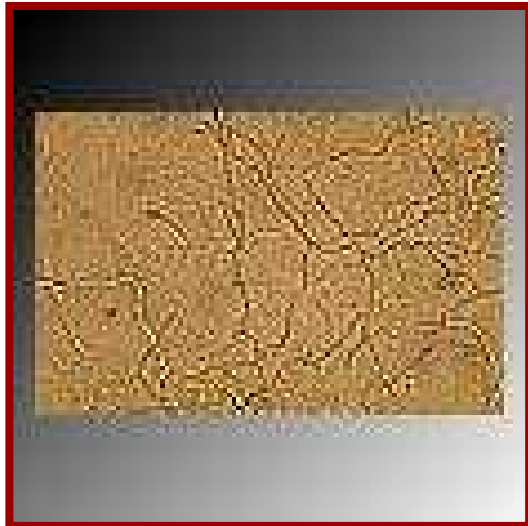
Mikroskopik inceleme



Septalı hif (Gram)



Septalı hif (GMS)



Hif (KOH)



Septasız hif

Mucor species in biopsy material. Note broad, irregular, non-septate hyphae with right angle (arrow) branching.

Yayma ile tanı: Mantarların mikroskopik ayırımı mümkün mü? -2

- Mikroskopik inceleme ile cins ve tür düzeyinde kesin bir tanımlama yapılamaz...
- Görülen yapıların özellikleri incelenerek, bu yapıların, olası etken olarak düşünülen mantar ile uyumlu olup olmadığı söylenebilir...

Yaymanın mantarlar yönünden değerlendirilmesinde yeni gelişmeler var mı? (boyama, moleküler?)

- Direk örnekten
- Araştırma düzeyinde
- Moleküler inceleme yöntemleri

Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR

L. Klingspor and S. Jalal

CMI 2006; 12: 745

This report describes the development of a real-time LightCycler assay for the detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp., using the MagNa Pure LC Instrument for automated extraction of fungal DNA. The assay takes 5–6 h to perform. The oligonucleotide primers and probes used for species identification were derived from the DNA seq^{CMI, 12, 745–753} e 18S rRNA genes of various fungal pathogens. All samples were screened for *Aspergillus* and *Candida* to the genus level in the real-time PCR assay. If a sample was *Candida*-positive, typing to species level was performed using five species-specific probes. The assay detected and identified most of the clinically relevant *Aspergillus* and *Candida* spp. with a sensitivity of 2 CFU/mL blood. Amplification was 100% specific for all *Aspergillus* and *Candida* spp. tested. To assess clinical applicability, 1650 consecutive samples (1330 blood samples, 295 samples from other body fluids and 25 biopsy samples) from patients with suspected invasive fungal infections were analysed. In total, 114 (6.9%) samples were PCR-positive, 5.3% for *Candida* and 1.7% for *Aspergillus* spp. In patients with positive PCR results for *Candida* and *Aspergillus*, verification with conventional methods was possible in 83% and 50% of cases, respectively. In conclusion, the real-time PCR assay allows sensitive and specific detection and identification of fungal pathogens *in vitro* and *in vivo*.

Molecular tools for identification of Zygomycetes and the diagnosis of zygomycosis

Dannaoui E. *CMI* 2009; 15 (Suppl. 5): 66

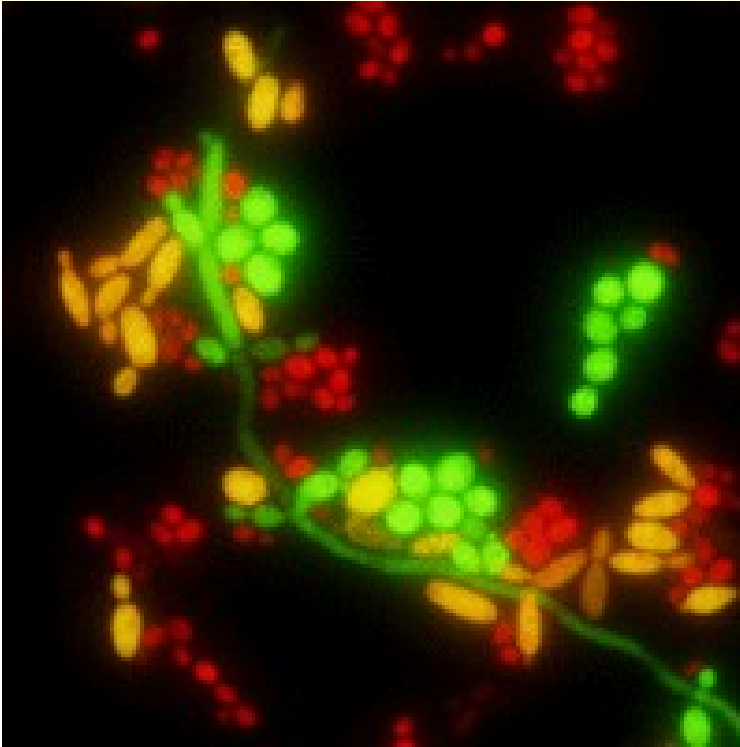
The identification of Zygomycetes and diagnosis of zygomycosis are notoriously difficult. However, there have been recent advances, particularly in the availability and evaluation of new molecular approaches. Two main issues are of importance: the identification to species level of a strain isolated in culture, and the identification of a zygomycete in tissues. By using several molecular targets and by increasing the number of available DNA sequences in international databases, several studies have shown that accurate molecular identification of Zygomycetes to species level is feasible. The internal transcribed spacer (ITS) region may be used as a first-line molecular target for the identification of Zygomycetes in pure culture. However, cultures from infected tissues are often negative and the different Zygomycetes share similar morphology according to histopathology. Furthermore, differentiation of a zygomycete from another hyalohyphomycete can sometimes be difficult in histopathology. Thus, alternative methods for the diagnosis of zygomycosis and for species identification directly from tissues are needed. For this purpose, molecular methods have been recently evaluated, both on unfixed fresh/frozen material and on formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies. This review discusses the molecular approaches currently available for the identification of Zygomycetes and the diagnosis of zygomycosis.

Klinik örneklerden direk Candida-tür tanısı

Kan kültüründen/klinik örneklerden/koloniden direk inceleme

Nükleik asit hibridizasyon

Candida-PNA FISH: Türe özgü rRNA'yı hedef alan, floresan işaretli peptid nükleik asit problemlerini kullanır. Değerlendirme floresan mikr. ile yapılır.



Tür düzeyinde ayırım

*Duyarlılık (%95-99), özgüllük (%99-100)
(klinik örneklerden)*

yeşil: albicans / parapsilosis

sarı: tropicalis

kırmızı: glabrata / krusei

negatif: bu beş türden birisi değil

www.advandx.com/products/pna_fish

Kültür için materyal laboratuvara nasıl
iletilmeli?

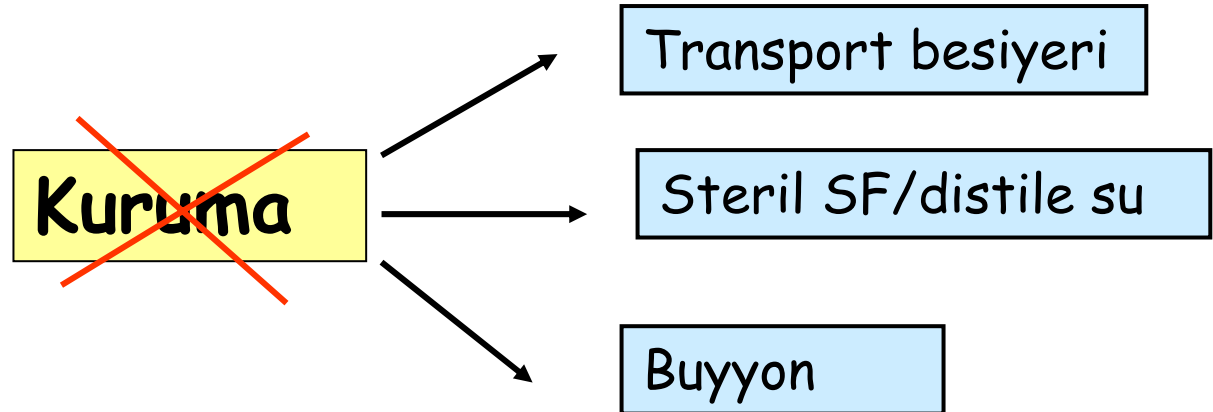
Saklama koşulları

Transport

Klinisyen-lab işbirliği

Örnek alma, saklama, laboratuvara ulaştırma: Genel ilkeler

- Uygun ve yeterli örnek
- **STERİL** koşullarda
- Hızlı transport, çabuk işlem
- Klinik ön tanı (örn. endemik mikoz etkenleri için özel besiyeri - - BHIA)



Alt solunum yolu örnekleri için kurallar (BAL, fırça, aspirasyon, balgam)

- Steril tüpte
- > 1 ml
- \leq 2 saat: oda sıcaklığı
- \leq 24 saat: 4°C'de
- Termal dimorfik mantarların dayanma süresi kısa

Kültür için hangi besiyerleri ve ekim koşulları?

- (Rutin bakteriyolojik besiyerleri)
- Sabouraud dekstroz agar (birden fazla besiyerine)
(Küfler için kontaminasyonu ekarte etmeye yardımcı ekim yöntemleri -- bu örnek için kontaminasyon riski düşük)
- 30°C, 35°C
- 3-4 hafta

Aspergillus: Kültürün inkübasyon koşulları duyarlılığı etkiler mi? - I

Aspergillus ile enfekte doku örnekleri:
Köpek modeli / insan otopsi materyalleri

Enfekte dokuda:
Fizyolojik sıcaklık,
mikroaerobik atmosfer

İNKÜBASYON

25°C
normal atm.

35°C
normal atm.

İzolasyonda ~10 kat artış

Tanıda kültürün etkinliği Üreme olasılığı Kontaminasyon-kolonizasyon sorunu

Kültürün duyarlılığı ve özgüllüğünü etkileyen faktörler:

Doğru örnek, doğru işlem (Biyopsi ✓)

Altta yatan hastalık ✓ (örn. IA yönünden yüksek riskli olgularda *Aspergillus* üremesi daha anlamlı)

Kontaminasyon/kolonizasyon: eşik değer yok

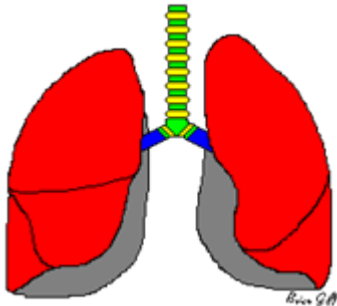
Uygun Örnek Seçimi

Bir küf mantarına bağlı alt solunum yolu enfeksiyonu şüphesinde uygun örnek?

Kontaminasyon? Kolonizasyon? Enfeksiyon?

İzolasyon şansı

Biyopsi > BAL > DTA > Balgam



≥ 2
örnekte
aynı küf
üremeli!

Biyopsi örneklerinde duyarlılık yüksek, kontaminasyon riski düşük, başarı şansı yüksek

Örneğe göre kültürün duyarlılığı (invazif aspergilloz)

Örnek	Duyarlılık (%)
Balgam	15-69
BAL, fırça	21-77

Albelda et al. Am J Med 1984, 76: 1027; Horvath et al. Am J Med 1996, 100: 171;
Jantunen et al. Bone Marrow Transpl 2000, 25: 867

Kültür sonuçlarını ne zaman elde ederiz?

İnkübasyon süresi: 3-4 haftaya tamamlanmalı

- Sıklıkla:
- Nocardia dışı bakteriyal etkenlerimiz: 24 saat
 - Mayalar: ~24-72 sa içinde
 - Nocardia: 4 günden itibaren
 - Küfler: ~ 7 gün içinde

Kültürde yeni gelişmeler, yeni teknikler?

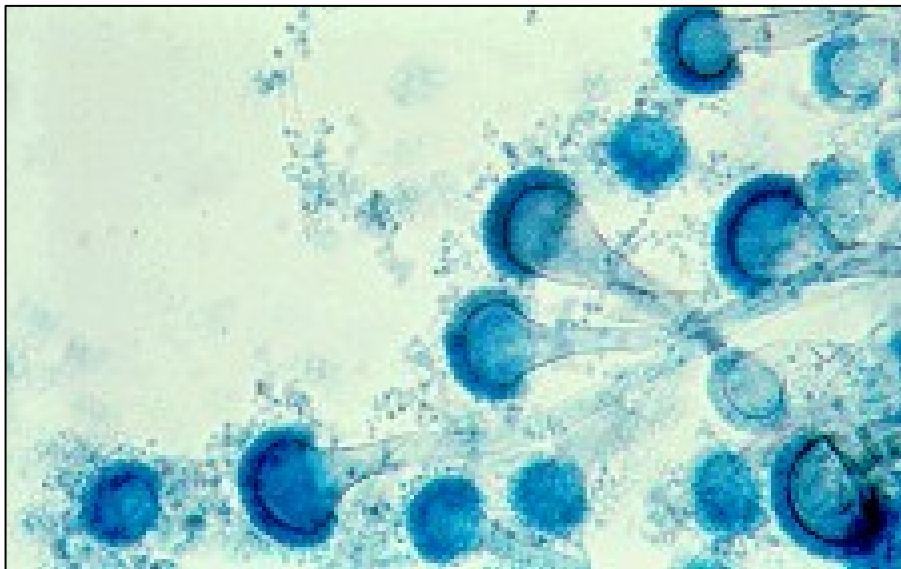
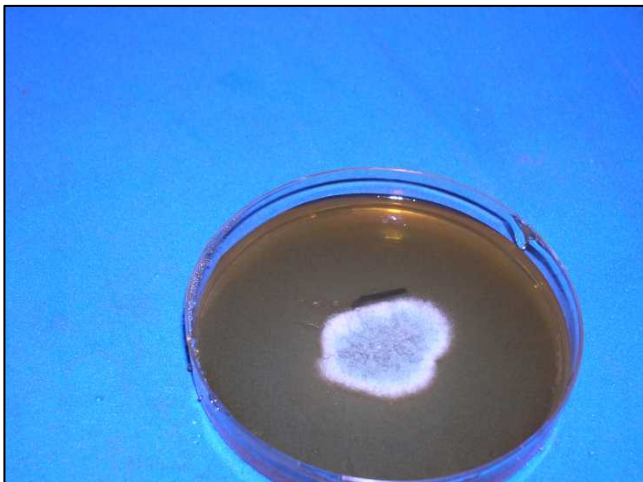
Moleküler tanımlama yöntemleri
(rutinde kullanım gereksinimi nadir)

Yayma raporu?

Septalı hifler

Dikotom dallanma

Üreme?



Kültürden mikroskopik inceleme
(LPM)

Aspergillus fumigatus kompleks

Galaktomannan antijen testinin tanıdaki yeri nedir?

Galaktomannan (GM) testi

- Lateks aglütinasyon (15 ng/ml)
 - ELISA (0.5-1 ng/ml)

ELISA

Duyarlılık: %29-100

Özgüllük: %21-98

FDA verileri

Duyarlılık %81, Özgüllük %89

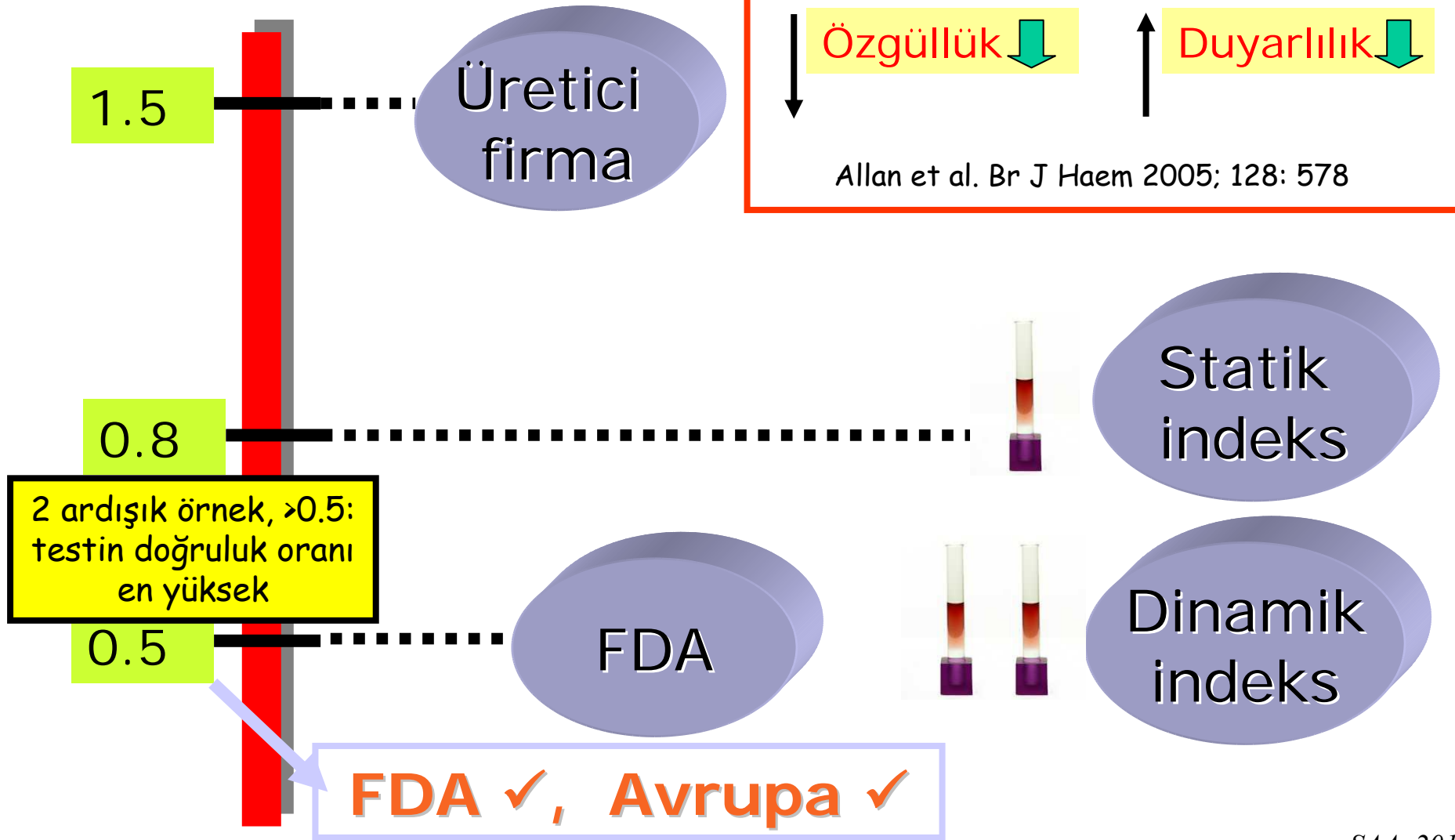
PA-EIA, Platelia Aspergillus, Bio-Rad

GM: "cut-off" indeks değerinin geętięi evreler (serum)

Maertens et al. JCM 1999, 37: 3223; Blood 2001, 97: 1604; Br J Haem 2004, 126: 852, Maertens et al. CID 2007;44:1329

Özgüllük ↓ ↑ Duyarlılık ↓

Allan et al. Br J Haem 2005; 128: 578



GM testi-Yalancı pozitiflik

Çapraz reaksiyon (*Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *Paecilomyces variotii*, *Geotrichum capitatum*, *Histoplasma*); (*Bifidobacterium-prematüre*, *yenidoğan*)

Yalancı pozitif antijenemi (Besin kaynaklı translokasyon—süt, pirinç, proteinden zengin ürünler...)

İlaçlar, solüsyonlar (*Piperasilin*, *Piperasilin-tazobaktam*, Amoksisilin-klavulanik asit, Sitotoksik kemoterapötikler, "Plasmalyte")

**Serumun alınma zamanı—Vadi döneminde/
doz verilmeden hemen önce olmalı**

GM testi- öneriler, güncel durum

- IA yönünden yüksek riskli olgularda, -konvansiyonel tanı yöntemlerine eşlik edebilecek- bir tarama testi
- Haftada (en az) iki örnek
- Farklı merkezlerde bulunan duyarlılık değerleri çok değişken. Bunda, hastanın antifungal tedavi alıp almıyor olması da etkili.
- Negatif prediktif değerinin yüksek olması nedeniyle enfeksiyonun ekarte edilmesinde yardımcı
- *Cut-off*, son öneri: **0.5** (A.B.D. ve Avrupa)
- Tedaviye yanıtın izlenmesinde başarılı

Balgam kültüründe *Aspergillus flavus*

Sonuçların yorumu

Balgam kültürünün tanıdaki yeri:

BALGAM KÜLTÜRÜ:

- En az 2 balgam kültüründe aynı küfün izolasyonu!
- Direk mikroskopi sonucu kültür sonuçlarının yorumlanmasında önemli
- Altta yatan hastalık, balgam kültüründeki *Aspergillus* üremesinin anlamı yönünden önemli

Kültürde Aspergillus ürediğinde...?

24 merkez,
A.B.D.

1209 olgudan
1477 pozitif
kültür

Üreme saptanan
örneklerin çoğu
(%72.9) balgam
(%49.6) veya BAL
(%23.3)

Üreme saptanan 1209 olgudan 245'inde
(%20.3) klinik hastalık var:

KLİNİK HASTALIK	n	(%)
İnvaziv aspergilloz	148	12
<i>Kanıtlanmış</i>	90	61
<i>Yüksek olasılıklı</i>	49	33
<i>Düşük olasılıklı</i>	9	6
Kronik nekrotizan aspergilloz	19	2
Aspergillom	43	4

Yüksek riskli olgularda (allojeneik KİT, hematolojik kanser, nötropeni) kültürde üreme olması olguların %50-65'inde IA ile ilişkili. Diğer olgularda oranlar daha düşük. Kontaminasyon olan örnekler ekarte edildiğinde oranlar daha da yükseliyor. (Yüksek risklilerde: %70-80).

Tedavi izleminde galaktomannan monitorizasyonunun yeri

Galactomannan Serves as a Surrogate Endpoint for Outcome of Pulmonary Invasive Aspergillosis in Neutropenic Hematology Patients

Cancer

January 15, 2009

Johan Maertens, MD¹, Kristel Buvé, MD¹, Koen Theunissen, MD², Wouter Meersseman, MD³, Eric Verbeken, MD PhD⁴, Gregor Verhoef, MD PhD¹, Johan Van Eldere, MD PhD⁵, and Katrien Lagrou, PharmD PhD⁵



GM (+)



GM (-)

Survival of 70 neutropenic patients with invasive aspergillosis is shown according to serum galactomannan index (GM) kinetics.

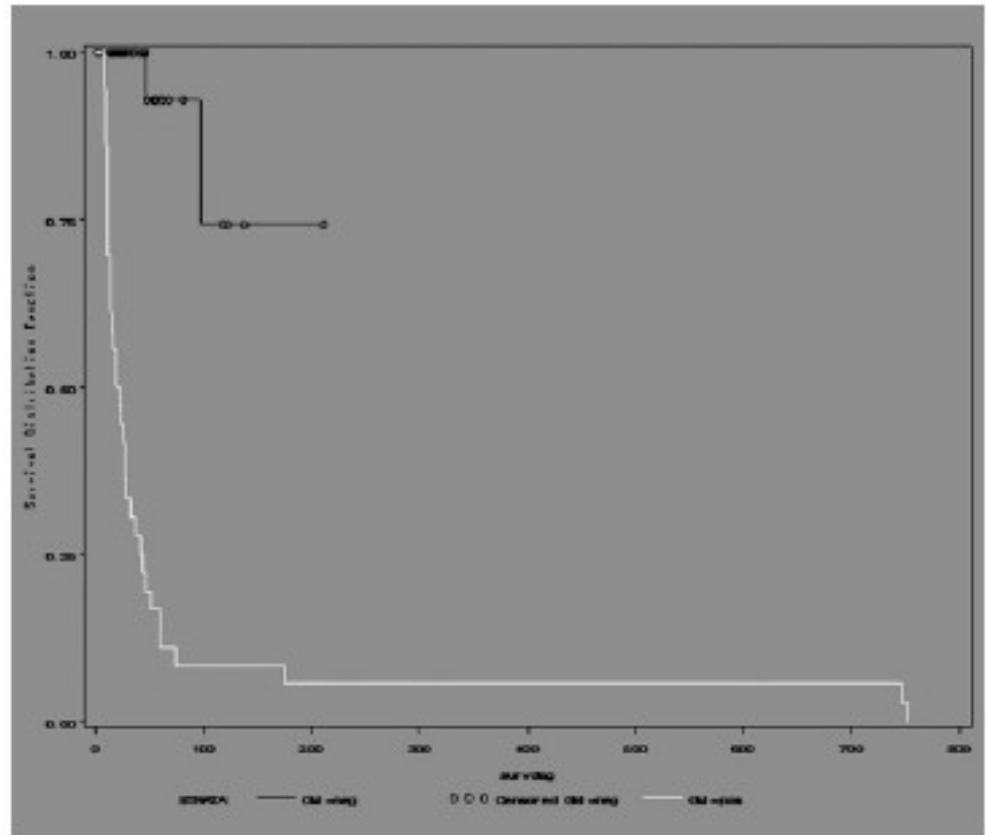


FIGURE 1. Survival of 70 neutropenic patients with invasive aspergillosis is shown according to serum galactomannan index (GM) kinetics.

Galaktomannan indeksi ile IA'da klinik sonuç arasındaki ilişki

27 çalışma sonucu
Kanıtlanmış / olası
IA olguları (n=257)



GM indeksi, IA'da klinik yanıt ile korelasyon gösteriyor. Klinik yanıtın tahmininde yararlı bir belirteç

Bu preparatlar size konsülte edilse nasıl yorumlarsınız?

Dikotom dallanma gösteren, düzgün yapıda septalı hifler

Kültür yok. Yapılması gerekir miydi?

KÜLTÜR ŞART !:

TEDAVİ BAŞLANMADAN ÖNCE ALINMALI

- Cins düzeyinde tanımlama (Bu görünüm, farklı cinsteki küflere ait olabilir.)
- Tür düzeyinde tanımlama, duyarlılık profilinin tahmini ve duyarlılık testlerinin yapılması:

Antifungal ilaçlara suş düzeyinde azalmış duyarlılık ya da potansiyel direnç saptanmış izolatların ait olduğu türler (direnç nadir)

A. terreus (kompleks)	Amfoterisin B (doğal direnç)
A. fumigatus	Azol (itrakonazol, vorikonazol, posakonazol)
A. fumigatus	Kaspofungin
A. flavus	Amfoterisin B
A. flavus	Kaspofungin

Lass-Flörl et al. Br J Haem 2005, 131: 201; Denning et al. JAC 1997, 40: 401; Denning et al. AAC 1997, 41:1364; Verweij et al. JCM 2002; 40: 2648; Snelders et al. PLoS Med 2008; 5: e219; Howard et al. Emerg Infect Dis 2009; 15: 1068

A. fumigatus ve azoller için önerilen direnç sınır değerleri ve tanımlamalar

Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints

Paul E. Verweij^a, Susan J. Howard^b, Willem J.G. Melchers^a, David W. Denning^{b,*} Drug Resistance Updates 12 (2009) 141–147

Table 3

Proposed interpretative breakpoints (MIC, mg/L) for *A. fumigatus* and clinically licensed, active azoles.

Drug	Susceptible	Intermediate	Resistant
Itraconazole	<2	2	>2
Voriconazole	<2	2	>2
Posaconazole	<0.5	0.5	>0.5

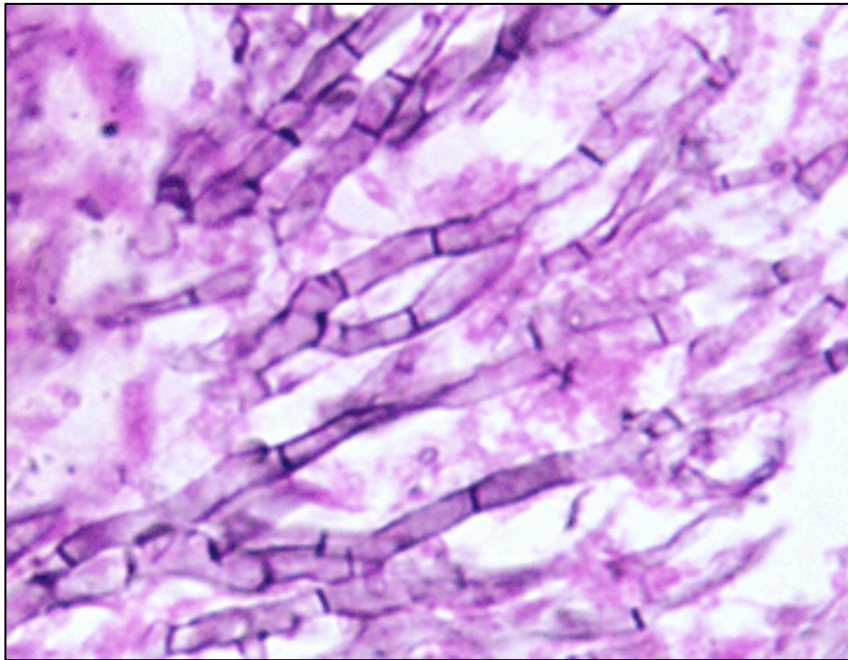
Table 4

Proposed nomenclature of resistance in *Aspergilli* to clinically licensed azoles.

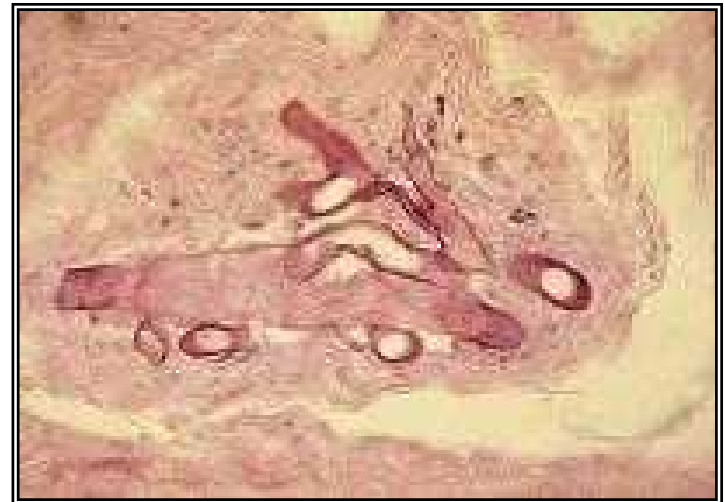
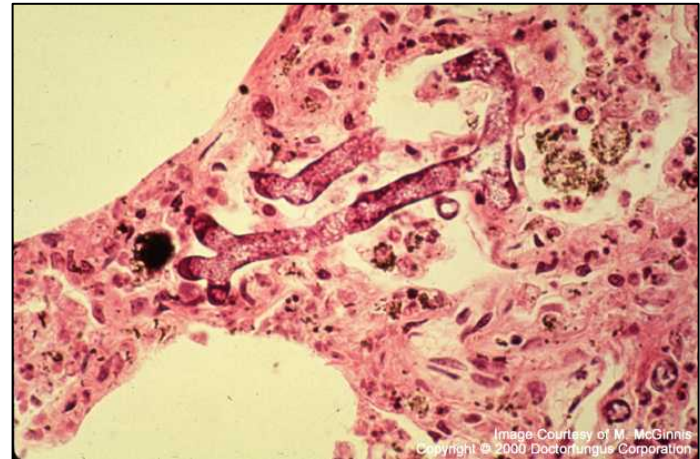
	Name	Description
Phenotype	Pan-azole resistant	The MICs of the isolate are in the resistant range for all available active azoles.
	Multi-azole resistant	The MICs are in the resistant range for more than one, but not all, azoles.
	Itraconazole, voriconazole or posaconazole resistant	The MICs are in the resistant range for a single azole.
Genotype	ITZgR, VCZgI, POSgR (G54W)	Isolate has a G54W substitution with a corresponding phenotype of resistance to itraconazole and posaconazole and intermediate susceptibility to voriconazole.

EUCAST
CLSI

KBB, sinüs biyopsisi. Tanı?



Septalı hif



Septasız hif

Aspergillus flavus'un amfoterisin B ve vorikonazol duyarlılığı

Table 1 MICs of posaconazole, voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against clinical *Aspergillus* and *Rhizopus* isolates.

Test isolates (number tested) Incubation time	Posaconazole CLSI microdilution		Posaconazole Etest		Voriconazole CLSI microdilution		Itraconazole CLSI microdilution		Amphotericin B CLSI microdilution	
	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range
	<i>Aspergillus</i> (Total, n =82)									
24 h	0.96	0.5-1	0.02	0.002-0.03	0.49	0.125-1	0.93	0.25-2	1.82	0.5-4
48h	1.01	0.5-2	0.02	0.0075-0.125	0.80	0.125-2	1.13	0.25-2	2.51	1-8
<i>A. fumigatus</i> (43)										
24 h	0.94	0.5-1	0.01	0.002-0.03	0.45	0.125-1	1	0.5-2	1.73	1-4
48 h	0.97	0.5-2	0.03	0.0075-0.125	0.72	0.125-2	1.21	0.5-2	2.39	2-8
<i>A. flavus</i> (29)										
24 h	1	1	0.02	0.0075-0.03	0.65	0.25-1	0.83	0.25-1	2.2	1-4
48 h	1.02	1-2	0.06	0.03-0.125	1	0.5-2	0.98	0.25-2	2.93	2-4
<i>A. niger</i> (7)										
24 h	0.91	0.5-1	0.01	0.002-0.03	0.30	0.125-0.5	0.91	0.5-2	1.21	0.5-2
48 h	1.22	1-2	0.07	0.06-0.125	0.67	0.25-1	1.35	0.5-2	1.81	1-2
<i>A. terreus</i> (2)										
24 h	-	1	-	0.0075-0.03	-	0.5	-	1	-	2
48 h	-	1	-	0.015-0.125	-	1	-	1	-	2-4
<i>A. nidulans</i> (1)										
24 h	-	1	-	0.03	-	0.125	-	1	-	2
48 h	-	1	-	0.125	-	0.25	-	1	-	2
<i>R.oryzae</i> (n =11)										
24 h	1.13	1-2	ND	ND	15.02	8-8	2	2	2.57	2-4
48h	1.55	1-2	ND	ND	15.02	8-8	3.75	2-8	3.53	2-8

GM, Geometric mean; ND, not determined.