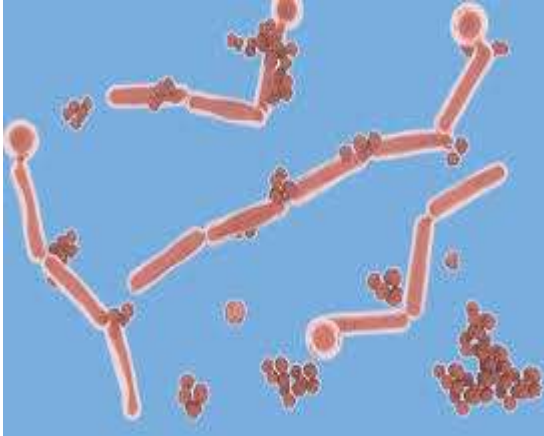




İnvaziv Fungal Enfeksiyonların Tanısında Laboratuvarda Pratik İpuçları

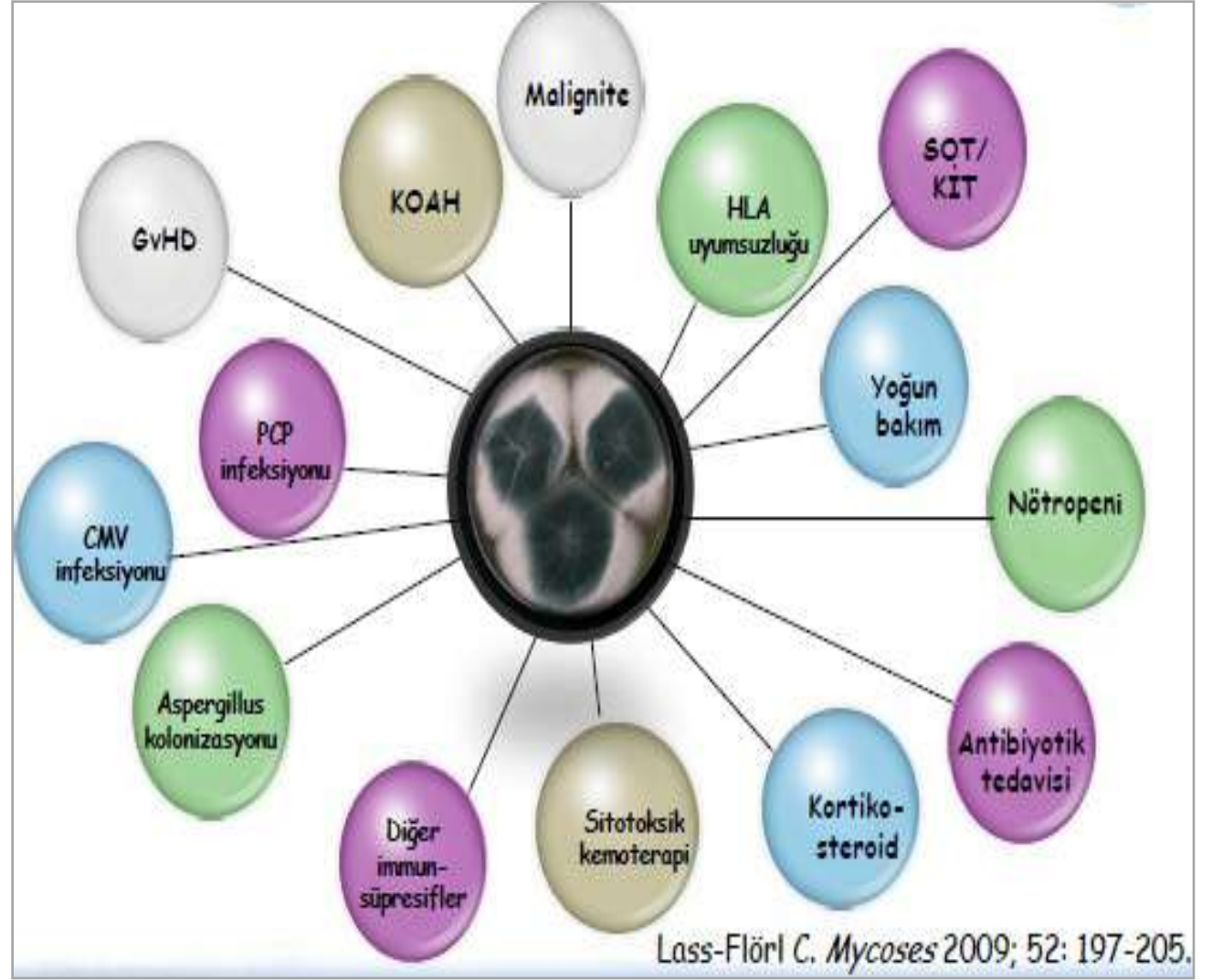
Dr Beyza Ener

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi



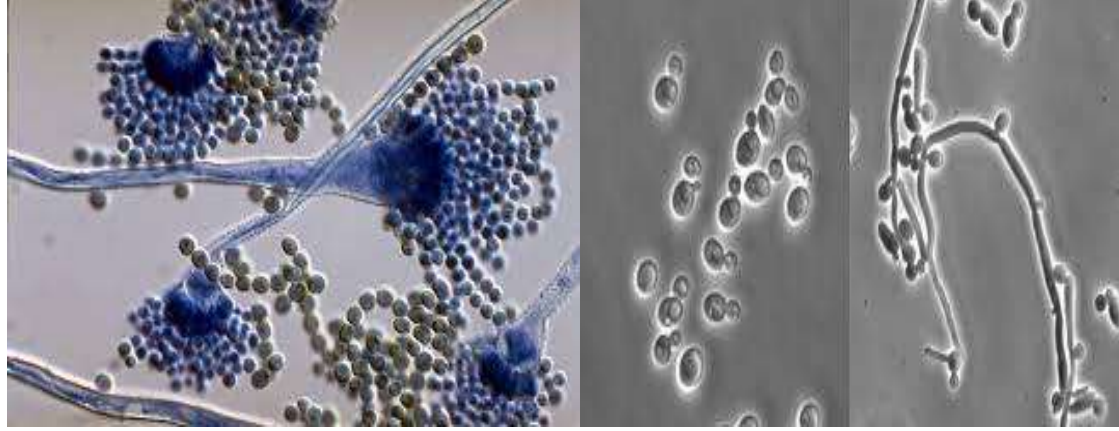
İnvaziv Fungal Enfeksiyonlar (İFE)

- Hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlar
 - Kanser hastaları
 - Nakil olan hastalar
 - Nötropeni, mukoza bariyerinin bozulması yoğun antibiyotik ve kortikosteroidler
 - Otoimmün hastalığı olanlar
 - İmmünsüpresyon yapan ilaçlar ve kortikosteroidler
 - Kronik hastalığı olanlar
 - Kronik granülomatöz hst
 - Kronik akciğer hst
 - Kronik renal hst..vs
 - Kronik CMV enfeksiyonları
 - Yoğun bakım hastaları
 - Yoğun bakım ihtiyacı olan büyük cerrahi geçirenler
 - Yoğun bakım ihtiyacı olan influenza ve covid-19 hastaları



İnvaziv Fungal Enfeksiyonlar

- *Candida* türleri
- *Aspergillus* türleri
- *Pneumocystis jirovecii*
- *Cryptococcus neoformans*



- *Candida* dışı maya mantarları
- *Aspergillus* dışı küf mantarları

Trichosporon türleri
Malassezia türleri
Geotrichum candidum
Saprochaete capitata

Mucorales takımı
Fusarium türleri
Pseudallesheria/Scedosporium
Esmer mantarlar

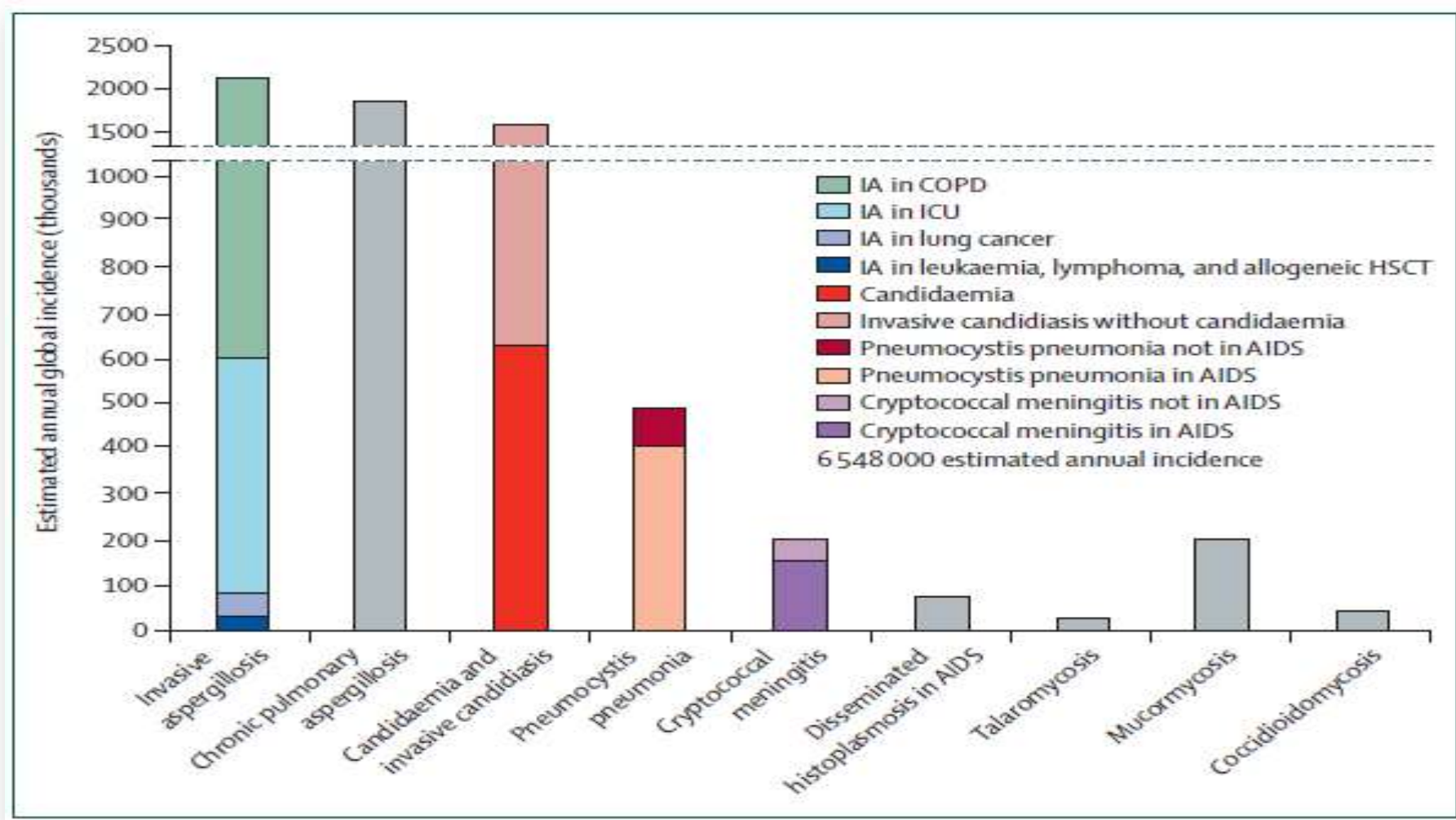
İnvazif Fungal Enfeksiyonların İnsidansı

	Incidence per million per year (period)				
	CPHA ^a	CDC ^b	NHDS ^c	CDC ^d	NHDS ^e
Mycosis	(1980-1982)	(1992-1993)	(1996)	(2000)	(2003)
Candidiasis	2.6	72.8	228.2	100.0	290.0
Histoplasmosis	13.9	7.1	13.6	NA ^f	NA
Aspergillosis	8.4	12.4	34.3	NA	22.0
Cryptococcosis	4.0	65.5	29.6	13.0	NA

İnvazif Fungal Enfeksiyonlara Sebep Olan Türlerin Dağılımı

Pathogen group	% Infections by clinical service (N)								Total
	GMED	HEME	SCT	HIV	NICU	SOT	ST	SURG	
	(3,640)	(1,010)	(377)	(263)	(54)	(886)	(863)	(1,906)	(6,031)
<i>Candida</i> spp.	81.7	42.6	31.6	32.7	96.3	57.2	89.2	91.2	75.0
<i>Cryptococcus</i> spp.	4.0	2.1	0.0	48.7	0.0	6.4	1.6	1.0	4.5
Other yeasts ^f	1.2	3.3	2.7	3.4	0.0	1.0	1.2	0.8	1.4
<i>Aspergillus</i> spp.	8.3	33.8	50.7	4.9	1.9	26.0	4.9	3.4	12.3
Zygomycetes	1.1	5.2	6.4	1.1	1.9	1.7	0.0	0.6	1.4
Other mould ^d	1.6	7.6	6.4	1.5	0.0	4.7	1.3	1.5	2.7
Endemic fungi	1.9	1.2	0.5	7.6	0.0	2.6	0.8	0.7	1.6

İnvazif Fungal Enfeksiyonların Görülme Sıklığı



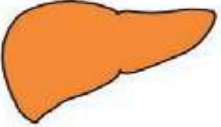
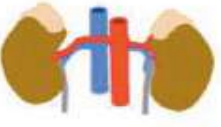





İnvaziv Fungal Enfeksiyonlarda Tanı

Tanı → ZOR

Erken tanı → daha da ZOR

**İnvaziv fungal enfeksiyonlarda
tedaviye erken başlanması
başarıyı arttırıyor**

Bu nedenle invaziv fungal enfeksiyonlarda yoğun ampirik tedavi uygulanıyor

Hepatic	Renal toxicity	CNS	Photosensitivity	Other
 All azoles Amphotericin B 5-FC Echinocandins	 Amphotericin B Cyclodextrins possibly toxic (IV voriconazole)	 Amphotericin B Echinocandins	 Amphotericin B	 Amphotericin B (anemia associated with decreased epoetin production)
 Itraconazole Posaconazole 5-FC	 Cardiomyopathy (itraconazole) QTc prolongation (all azoles, especially with drug interactions)			

CİDDİ YAN ETKİLER



ARTMIŞ MALİYET

**ANTİFUNGAL DİRENÇ
????**

İFE açısından yüksek riskli olan hasta

Tanı

Klinik bulgular

AB tdv rağmen düşmeyen ateş

İFE açısından odak

Solunum yolları

GIS , katater...vs

Görüntüleme Yöntemleri

Toraks BT

Abdominal US

Etiyolojiye Yönelme

Kan kültürleri, Doku, Solunum örnekleri

DMİ ve Kültür

Diğer yöntemler

İnvazif Fungal Enfeksiyonların Tanı ve Yönetimi

CLSI M54-A

IDSA-ASM Kılavuzu

ECİL-3 – Klasik Tanı Kılavuzu

ECİL – Biyolojik Belirteç Kılavuzu

ECİL-3 – Mukormikoz Kılavuzu

ESCMID – Candida Tanı Kılavuzu

ESCMID-ECMM – Feohifomikoz Kılavuzu

ESCMID-ECMM – Hiyalohifomikoz Kılavuzu

ESCMID-ECMM – Mukormikoz Kılavuzu

ESCMID-ECMM – Nadir Görülen İnvazif Maya Enfeksiyonları Kılavuzu

Etiyolojik Tanıda Konvansiyonel Yöntemler Altın Standart

- Kültür
- Direkt Mikroskopik İnceleme



- Uygun örnek almak
- Örnekleri uygun işlemek
- Sonuçları doğru yorumlamak

Fungal Enfeksiyonlar İçin Uygun Örnekler

• Biyopsi örnekleri

- Nazal, sizonazal, deri, karaciğer, MSS.....vs
- Steril cerrahi koşullarda alınmalı
- Kesinlikle formol gibi fiksatif konulmamalı
- Gazlı bez içinde gönderilmemeli
- Steril bir kap içine alınır
- Kurumasını önlemek için steril serum fizyolojik eklenebilir

• Kan, kemik iliği ve steril vücut sıvıları

- Alınırken kontaminasyon önlenmeli
- Uygun miktarda alınmalı
- Steril vücut sıvıları 2ml'nin üzerinde olmalıdır
- Oda ısısında saklanmalı

• Aspirasyon örnekleri

- Paranasal sinüs aspirasyon materyali
- Nazal sürüntü örnekleri kullanılmamalıdır

• Solunum yolu örnekleri (Balgam, DTA, BAL, NBL, gibi)

- Sabah ilk balgam tercih edilir
- BAL örneklerinin miktarı 5-10ml olmalıdır
- Ağız kapalı steril kaplara alınması gerekiyor
- En fazla iki saat oda sıcaklığında tutulabilir
- En fazla 24 saat buzdolabı sıcaklığında tutulabilir

• İdrar

- Üriner sonda varlığı?
 - *Candida* türleri geçici olarak kolonize
- Kadın hastalarda vajinal kontaminasyon
- Sistemik enfeksiyonlarda mantarların çoğu böbreği tutar
- En fazla iki saat oda sıcaklığında tutulabilir
- En fazla 24 saat buzdolabı sıcaklığında tutulabilir

• Sürüntü örnekleri uygun değildir

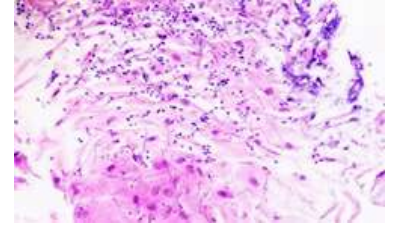
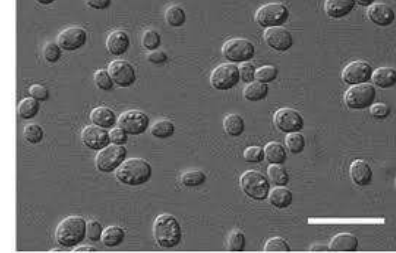
- Sadece *Candida* mukoza enfeksiyonlarında alınabilir
- Çift ekivyonla alınmalıdır

Antifungal tedavi alındaki hastalarda karakteristik hif yapısı bozulabilir

- Sporlar

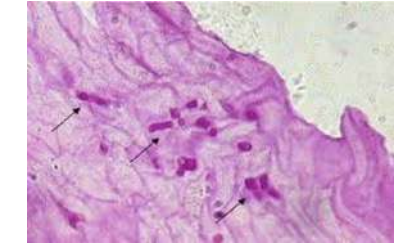
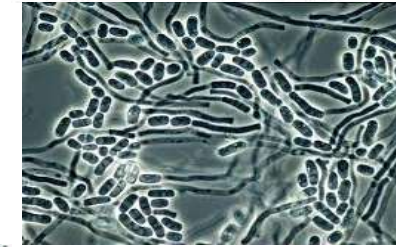
- Blastospor

Tomurcuklanma



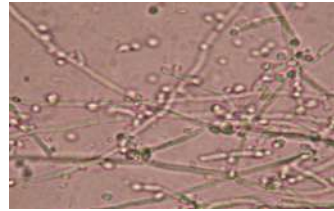
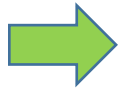
- Artrospor

Fragmentasyon



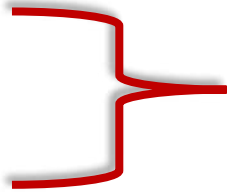
- Hifler

- Yalancı hifler



- Hiyalen hifler

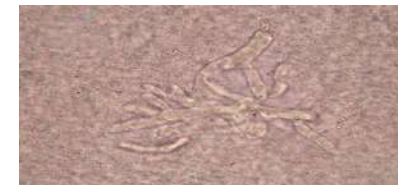
- Esmer hifler



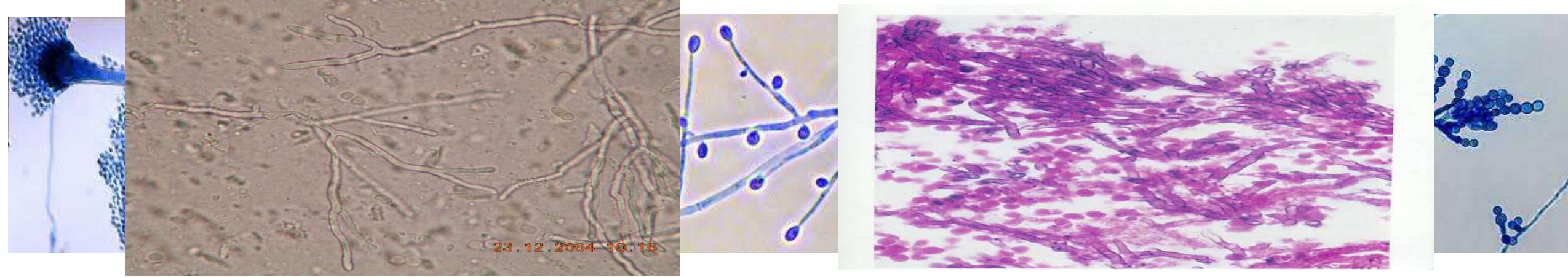
Septalı hifler



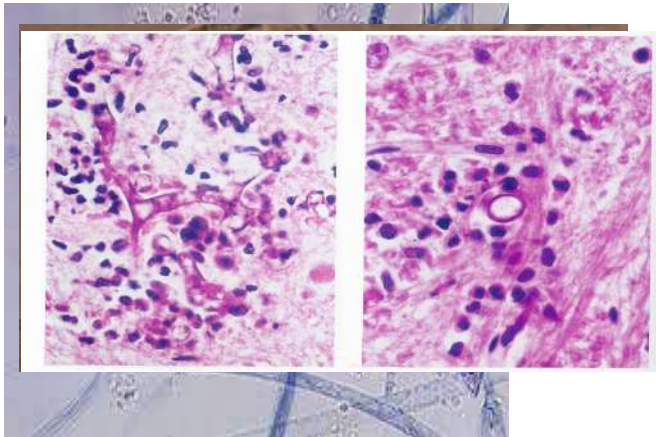
- *Mucarales* takımına özgü hifler



Küf Mantarları

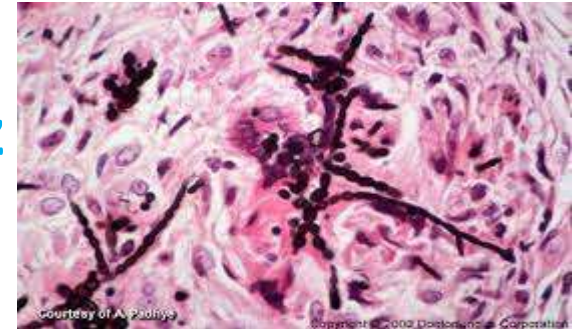


Aspergillus, Fusarium, Scedosporium, Acremonium, Scoploriopsis vb küf mantarları → **hiyalohifomikoz**



Basidiomycota takımını → **mukormikoz**

Esmer mantarlar → **Feohifomikoz**



Direkt Mikroskopik İnceleme

- Gram / Giemsa boyalı inceleme
- Lam-lamel arası taze inceleme
 - %10-30 KOH ve/veya Kalkoflor beyazı
- Florasan boyalı inceleme
- Histopatolojik inceleme (HE, PAS, GMS)



Ön rapor = Maya hücreleri ve yalancı hifler

Direkt Mikroskopik İnceleme

- Gram / Giemsa boyalı inceleme
- Lam-lamel arası taze inceleme
 - %10-30 KOH ve/veya Kalkoflor beyazı
- Florasan boyalı inceleme
- Histopatolojik inceleme (HE, PAS, GMS)



Ön rapor = Septalı 45 derece açı ile dallanan düzenli gerçek hifler

Direkt Mikroskopik İnceleme

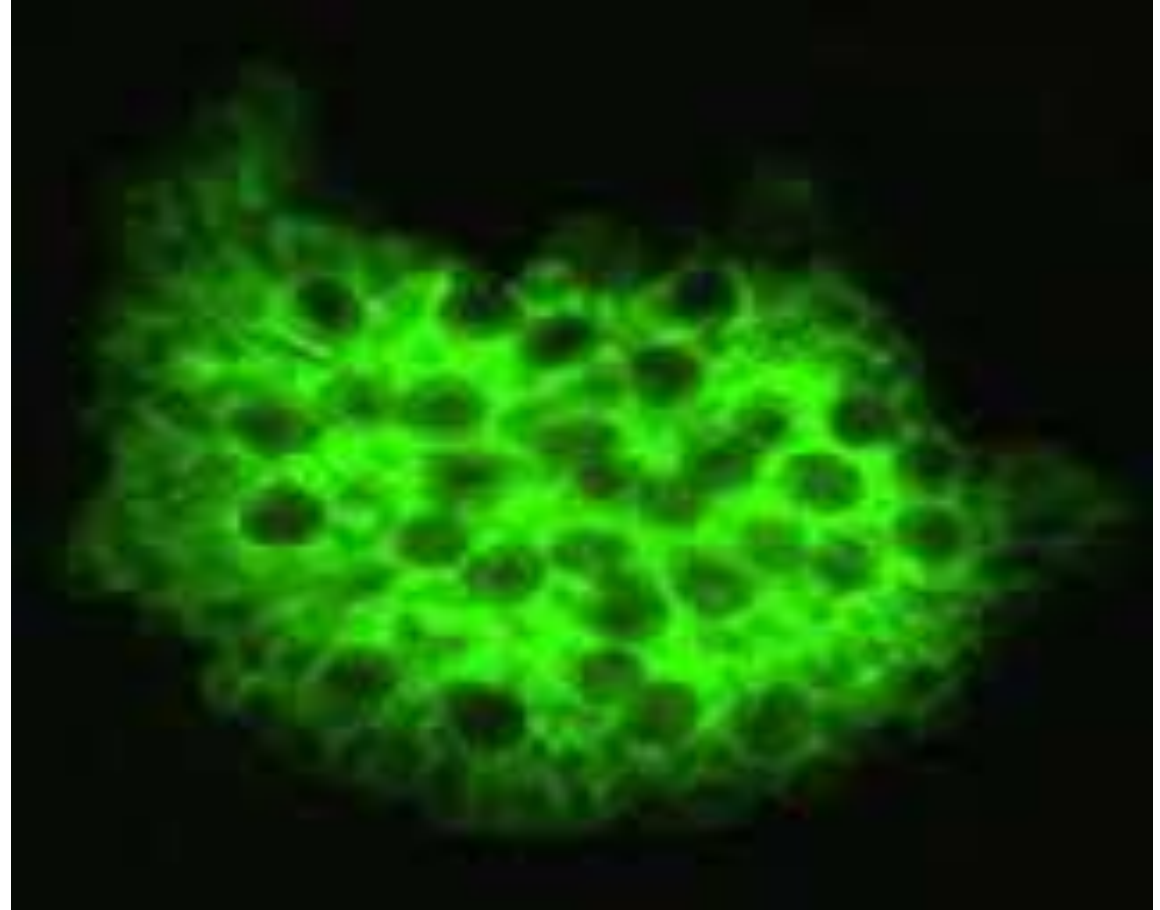
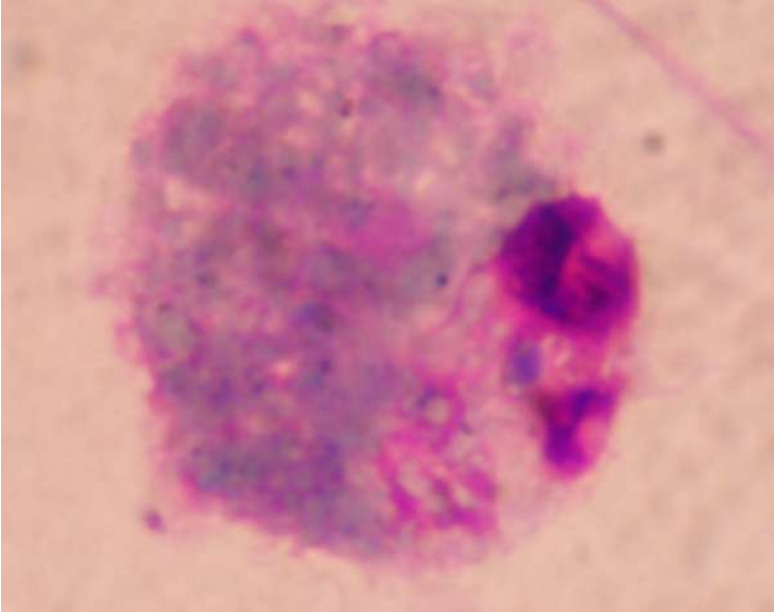
- Gram /Giemsa boyalı inceleme
- Lam-lamel arası taze inceleme
 - %10-30 KOH ve/veya Kalkoflor beyazı
- Florasan boyalı inceleme
- Histopatolojik inceleme (HE, PAS, GMS)



Ön rapor = Septasız düzensiz iri hifler

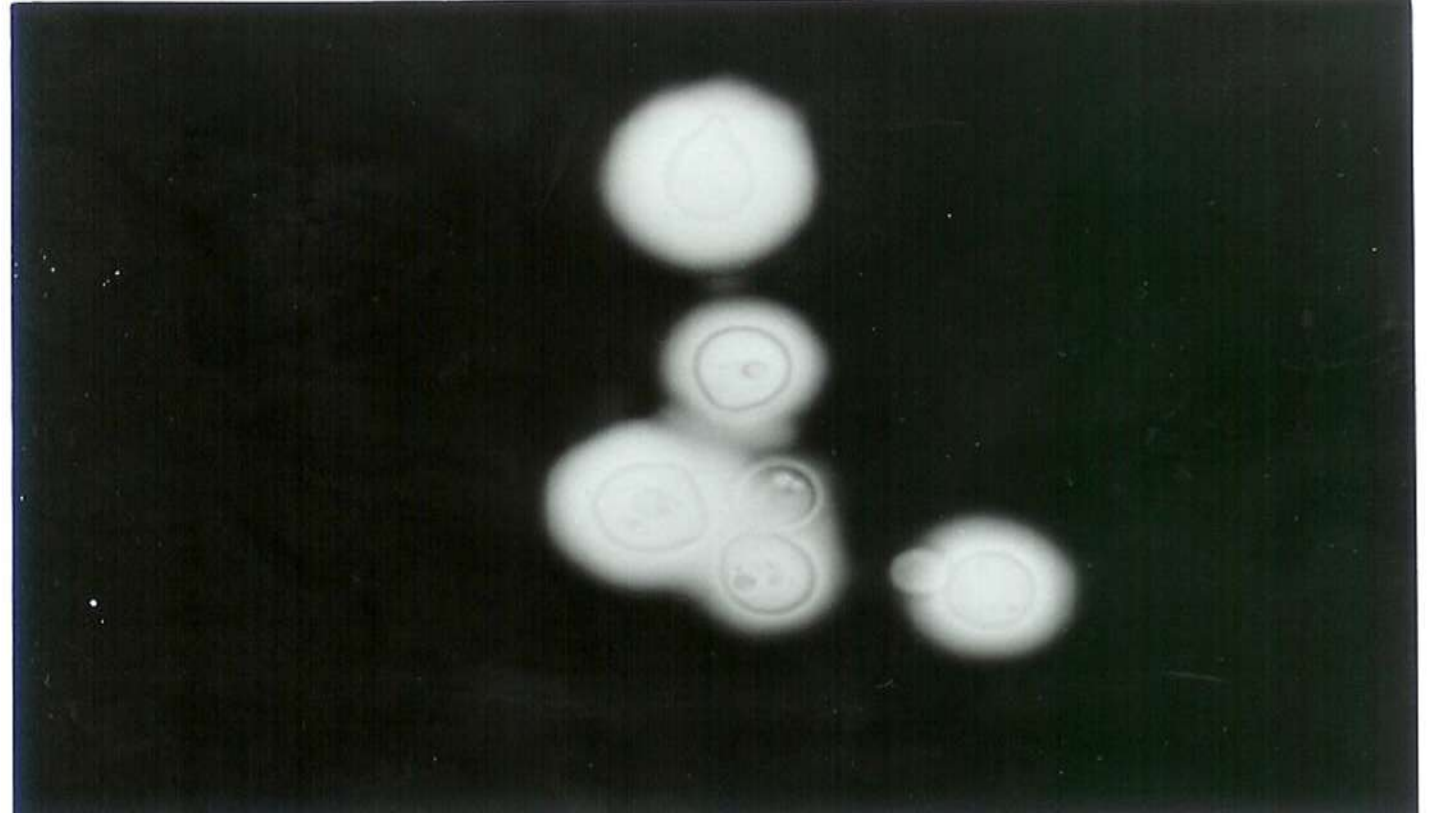
Direkt Mikroskopik İnceleme = *Pneumocystis jirovecii*

- Gram Giemsa boyalı inceleme
- Lam-lamel arası taze inceleme
 - %10-30 KOH ve/veya Kalkoflor beyazı
- Florasan boyalı inceleme
- Histopatolojik inceleme (HE, PAS, GMS)



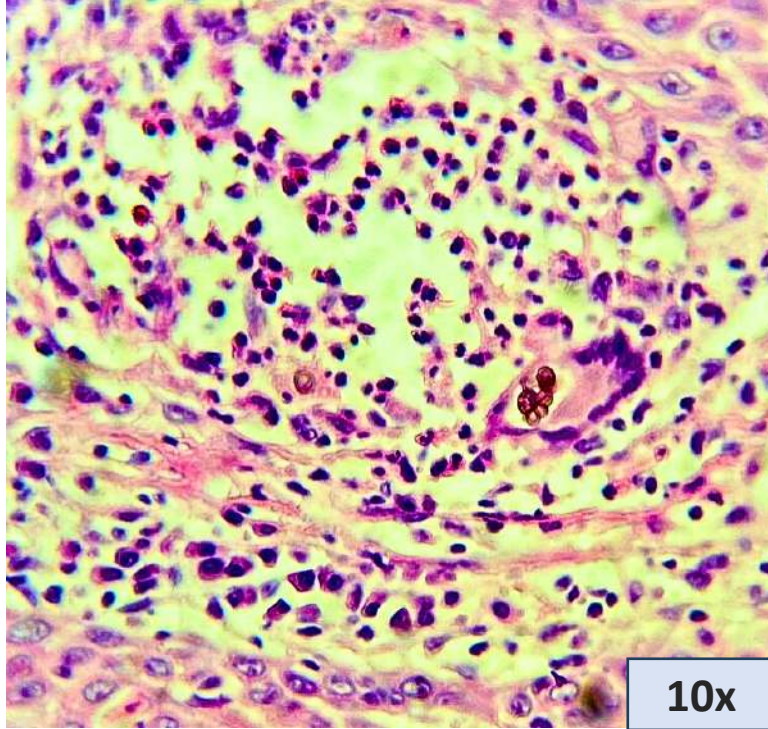
Direkt Mikroskopik İnceleme; Çini Mürekkebi ile İnceleme

- Gram /Giemsa boyalı inceleme
- Lam-lamel arası taze inceleme
 - %10-30 KOH ve/veya Kalkoflor beyazı
- Florasan boyalı inceleme
- Histopatolojik inceleme (HE, PAS, GMS)

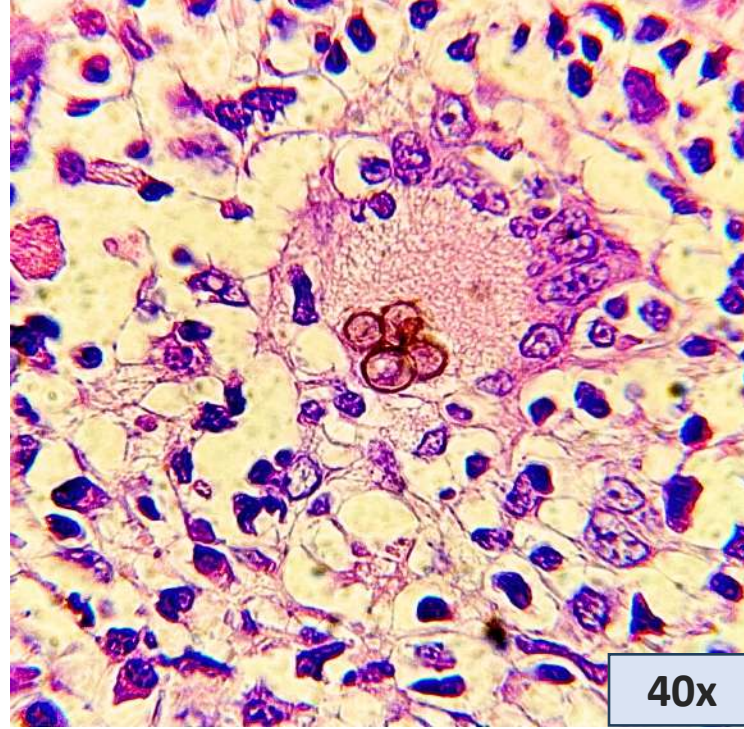


Ön rapor = Kapsüllü maya hücreleri

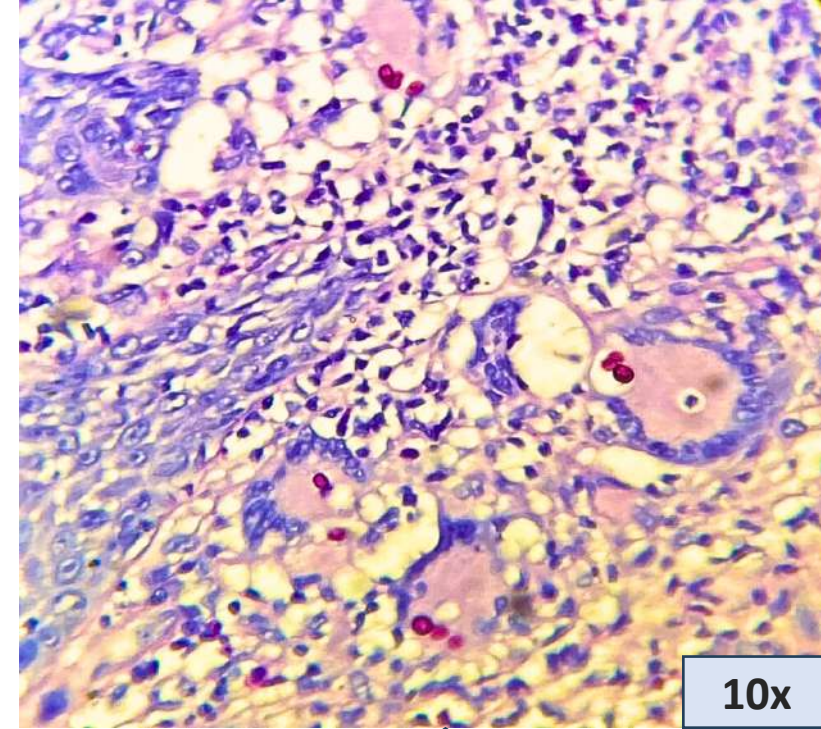
Histopatolojik İnceleme



10x



40x



10x

**Muriform
hücreler**

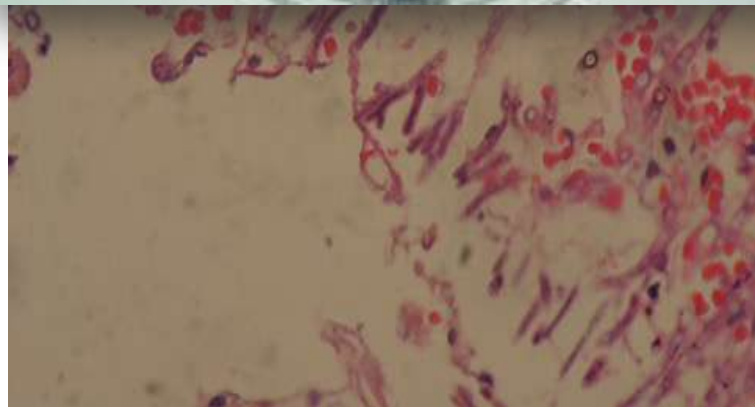
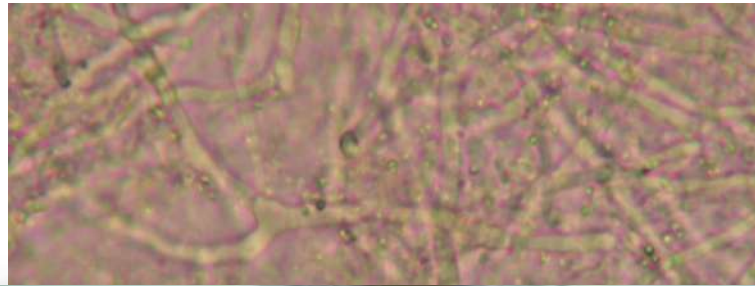
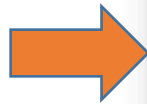
Hematoksilen-Eozin
Boyama

**Muriform
hücreler**

Periyodik asit-
Schiff
(PAS) boyama

Kromoblastomikoz





Kültür

AVANTAJLARI

- Cins ve tür düzeyinde tanımlama
- Kan, steril vücut sıvıları ve biyopsi örneklerindeki üremeler **kesin mantar enfeksiyonu tanısını koyduruyor**
- Antifungal duyarlılık testi şansı

DEZAVANTAJLARI

- Duyarlılığı ve özgüllüğü çeşitli faktörlerden etkilenir
 - **Uygun örnek**, doğru işlem
 - Altta yatan hastalık
 - Bazı örneklerdeki üremelerin yorumlanmasındaki güçlükler (eşik değerlerin mevcut olmayışı, enfeksiyon-kolonizasyon ayırımı zor)
- Süre uzun

Kan Kùltürü

- *Candida* türleri ve benzer mayalar
- *Fusarium* ve *Scedosporium* türleri
- Dimorfik mantarlar

- Lizis-sentrifügasyon sistemleri
- Modern otomatik kan kùltür sistemleri

- *Aspergillus* türleri
- *Mucorales* takımı



- Her gün alınmalı
- 30 dk ara ile 3 (2-4)
- Erişkinde 40-60ml/gün
- Çocukta
 - 2-4 ml <2kg
 - 6ml 2-12kg
 - 20ml 12-36kg

Kan kültürü Ne Kadar Başarılı ?

- Otopsi çalışmaları
 - Kandidemide kan kültürünün duyarlılığı: **~%50**
 - Ostrosky-Zeichner et al. Crit Care Med 2006; 34: 8
 - Sims et al. Arch Med Res 2005; 36: 660
 - Berenguer et al. DMID 1993; 17: 103
 - Kan kültürü pozitiflik oranı, tutulan organ sayısı ile yakından ilişkili
 - Tek organ tutulumunda kan kültürü pozitifliği : %28
 - >3 organ tutulumunda kan kültürü pozitifliği : %78
 - Berenguer et al. DMID 1993; 17: 103

Fungal Kan Kültür Şişeleri Kullanımı?

- Bactec 9120 Plus Aerobic/F - Mycoses IC/F
 - Tüm maya türleri değerlendirildiğinde üretme oranı açısından fark yok
 - ❖ Plus Aerobic F %71 / Mycoses IC/F %77 ($p>0,05$)
 - Mayaların üreme süresi mantar şişesinde anlamlı ölçüde daha kısa
 - ❖ Plus Aerobic F 38.01 ± 16.61 saat / Mycoses IC/F 29.19 ± 16.9 saat ($p<0.001$)
 - *C. glabrata*'nın üremesi daha kolay
 - Aynı anda bakteriyemi varsa fungal şişe daha avantajlı (mantarın üremesi gecikiyor veya engelleniyor)

- Chiarini et al. JCM 2008; 46:4029
- Kirby et al. Arch Pathol Lab Med 2009; 133:93

BACTEC vs BacT/Alert

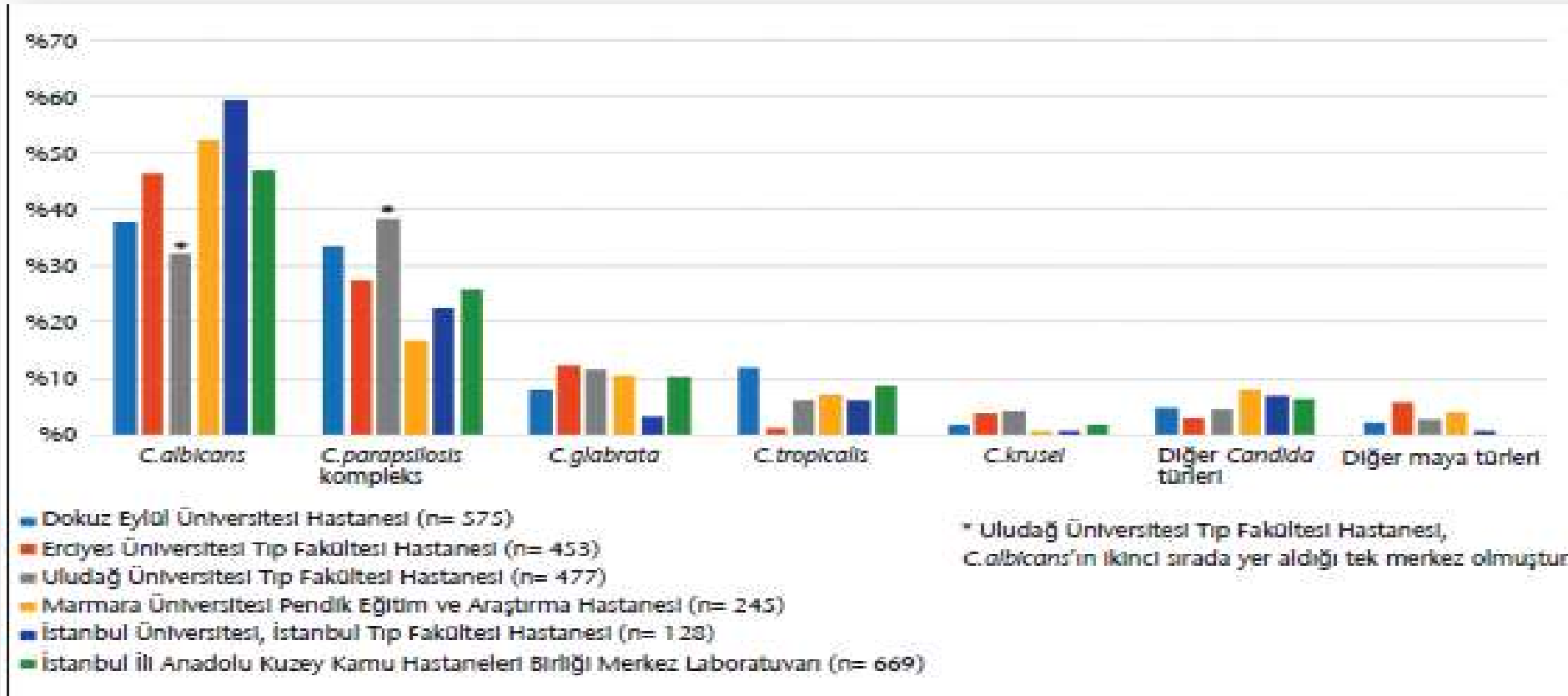
Arendrup et al JCM 2011; 49:325-334

- 2820 fungemi epizodu (Danimarka)
- Standart Kan kültür şişesi
 - %98 *Candida* türü
 - %57 *C. albicans*
 - %21 *C. glabrata*
- *C. glabrata*
 - BACTEC %17,9
 - BacT/Alert %23,6

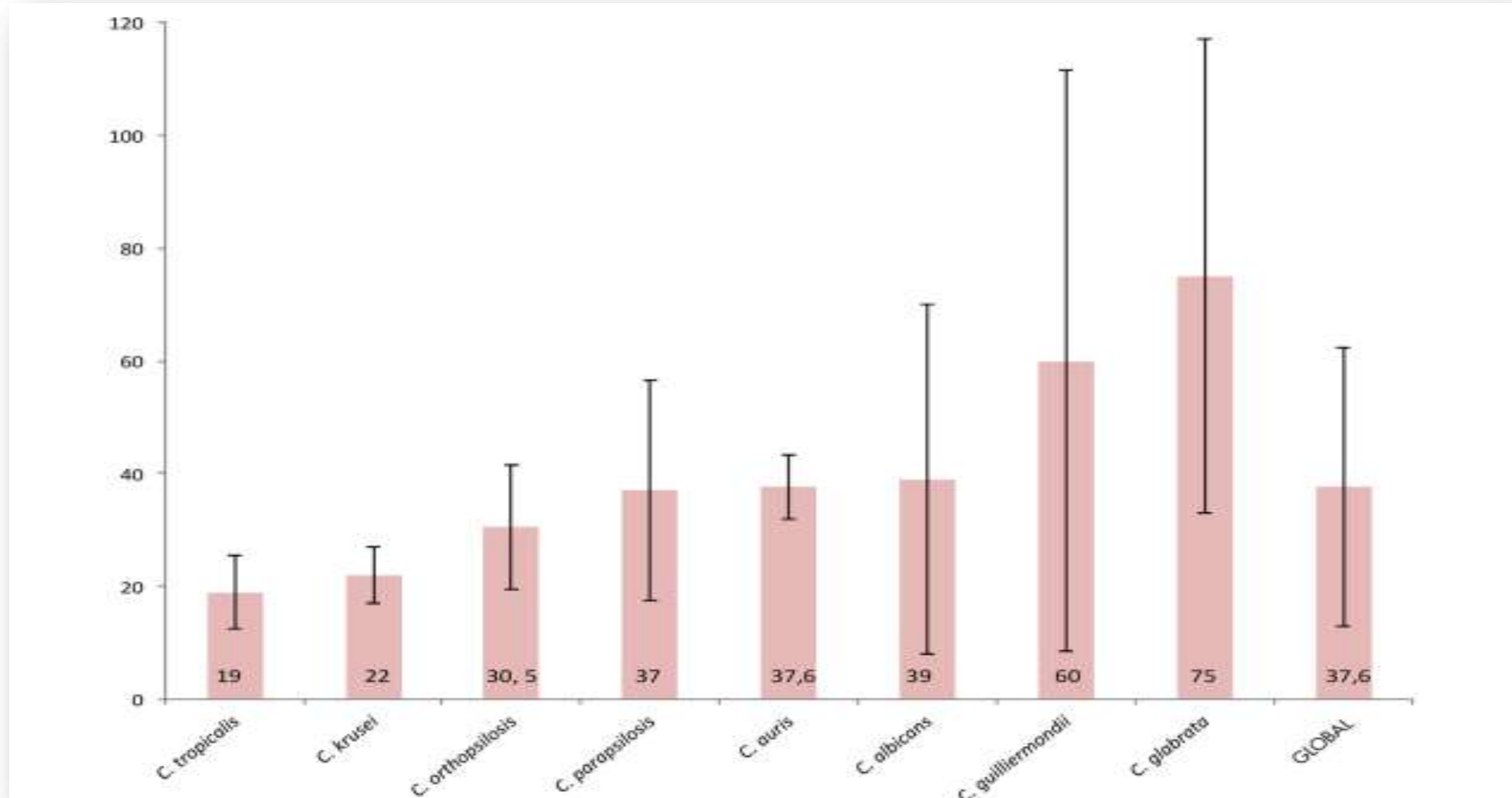
P=0,002

Fungal besiyeri kullanımı ve kan kültür sistem seçimi kararını merkezlerin *C. glabrata* oranlarına göre vermesi

Türkiye’de Altı Yıllık Zaman Dilimi İçerisinde Kan Kültürlerinden Soyutlanan Maya Mantarlarının Tür Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma



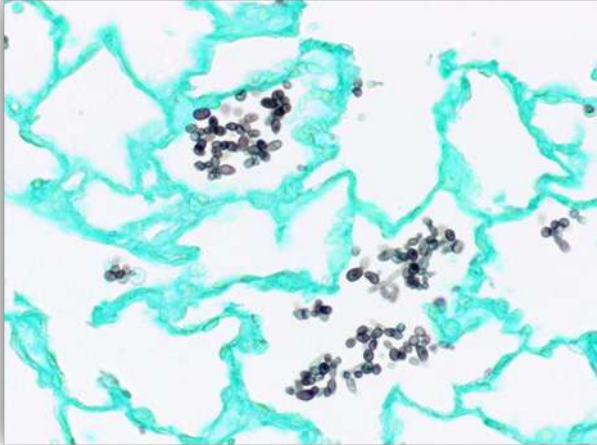
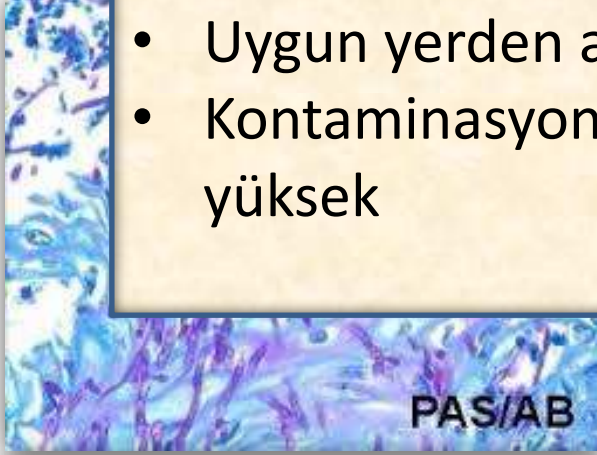
Kan kültürlerinde *Candida* türleri ortalama 36-38 saatte ürer



DOKU

(Klinik bulguların olduğu yerden görüntüleme eşliğinde)

- Örnek alma zor
 - Trombositopeni ve genel durum bozukluğu
- Uygun yerden alınmazsa **duyarlılık** düşük
- Kontaminasyon olmadığı sürece **özgülük** çok yüksek



- Ön rapor ile kliniğe bilgi verilebilir
 - Yalancı hif ve blastosporlar
 - Septalı gerçek hif (Hiyalen veya esmer)
 - Septasız gerçek hif

inde

i bez

yolojik

celeme

r beyazı)

Steril vücut sıvıları

- Kan kültürleri gibi işlem görür

BOS

- Direkt mikroskopik inceleme
 - Çini mürekkebi ile değerlendirme *Cryptococcus* menenjitinde %60 duyarlı
 - Gram ile değerlendirme *Candida* menenjitinde %40 duyarlı
- Kültür duyarlılığı
 - *Cryptococcus* menenjitinde %98 duyarlı
 - *Candida* menenjitinde %80 duyarlı
 - SSS aspergilloz veya kandidozunda yararsız

Solunum Yolu Örneklerindeki *Candida* Üremelerinin Değerlendirilmesi

- *Candida* türlerinin üremesi anlamlı kabul edilmez
 - Solunum yolu örneklerinde *Candida* türleri izole edilen hastaların akciğer biyopsisi ve akciğer otopsi örneklerinde enfeksiyon bulgusu yok
 - Yüksek riskli hastalarda kolonizasyon indeksi ve *Candida* skoru açısından tanımlanarak raporlanmakta

Solunum Yolu Örneklerindeki Küf Üremelerinin Değerlendirilmesi

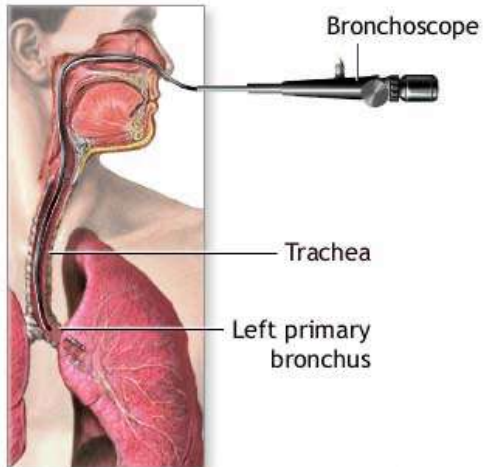


Biyopsi örneği



En değerli örnek

Left lung



Bronchoscope

Trachea

Left primary bronchus

BAL/BL > DTA > Balgam

Original Article

Sputum and bronchial secretion samples are equally useful as bronchoalveolar lavage samples for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in selected patients

Pilar Escribano^{1,2,3}, Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2},
Teresa Peláez^{1,2,3,4}, Patricia Muñoz^{1,2,3,4}, Belén Padilla^{1,2,3},
Emilio Bouza^{1,2,3,4} and Jesús Guinea^{1,2,3,4,*}

- Balgam ve bronş sekresyonu
- Tanıda bronkoalveolar lavaj kadar değerli

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Any	To achieve a homogeneous sample of viscous samples such as sputum	Liquefaction using a mucolytic agent, e.g. Pancreatin®, Sputolysin®, or using sonication and 1,4-dithiothreitol	A	III	Essential investigation <u>High-volume sputum culture (entire sample)</u> shown to significantly increase recovery

Solunum Yolu Örneklerindeki Küf Üremelerinin Değerlendirilmesi

- Küf mantarı
 - Direkt mikroskopik inceleme hif elemanları
 - Aynı türe ait birden fazla koloni
 - Besiyerinde mantarın ürediği yerin hasta örneğinin ekildiği yere olan yakınlığı
 - Tekrarlayan kültürlerde aynı etkenin saptanması
 - İzole edilen türün vücut ısısında üreyebilmesi

- Hastanın altta yatan hastalığı
 - ✓ Hematolojik malinite
 - ✓ Allojenik KIT
 - ✓ Akciğer nakli
 - ✓ GvHD
 - ✓ Nötropeni
 - ✓ Kortikosteroid kullananlar

>%80 anlamlı kabul edilmeli

TANIMLAMA

Candida enfeksiyonlarında

- Tür düzeyinde tanımlama (virülansları, antifungal duyarlılıkları doku tropizmleri farklı)
 - API ID 32 C
 - MALDİ-TOF Tanımlama
 - Moleküler tanımlama
 - Vitek maya tanımlama ?
 - BD maya tanımlama ?

Mukormikozda

- Takım düzeyinde tanımlama
 - *Mucorales* takımı

Fusarium ve Scedosporium enfeksiyonlarında

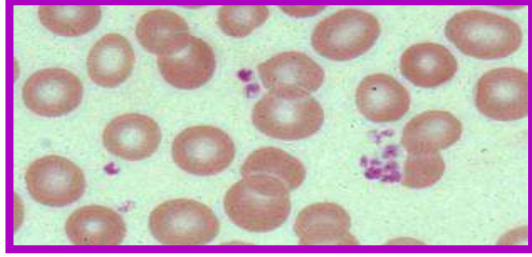
- Cins düzeyinde tanımlama
 - ITS tür kompleksi düzeyinde tanımlama yapar
 - Tür tanımı için multilokus sekanslama gerekir

Aspergillus enfeksiyonlarında

- Tür kompleksi düzeyinde tanımlama
 - Uzmanlık istiyor
 - *A. fumigatus* tanımlaması için termotolerans testi yapılabilir
- MALDİ-TOF Tanımlama
- Tür düzeyinde tanımlama
 - ITS, β -tubulin ve kalmodulin genlerine bakılmalı
 - Tipik üreme gösterenlerde gerekli değil
- Epidemileri incelerken
 - Mikrosatellit genotipleme veya hücre yüzey proteinleri ile genotipleme

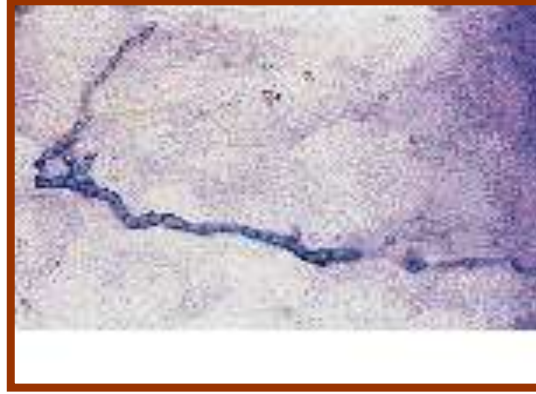
Konvansiyonel Yöntemlerde Sorun Nedir?

Uygun (steril) örnek alınmasındaki zorluklar



- Trombositopeni
- Genel durum bozukluğu

Örnekteki mantar miktarının azlığı



- Hızlı olan direkt mikroskopik incelemeyi değersizleştirir
- Kültürün sonuçlanması ise geçtir

Bilgi, deneyim ve işbirliği eksikliği



Biyobelirteçler

Biyobelirteç dediğimiz zaman mantarlara ait çeşitli yapıların kültür dışı yöntemlerle belirlenmesi anlaşılır

- Kapsül antijeni taranması
 - *Cryptococcus* enfeksiyonlarında
- Hücre duvarı antijenleri
 - β -glukan aranması (pan fungal)
 - Galaktomannan aranması (aspergilloz)
 - Mannan aranması (kandidoz)
- Özgül nükleik asit aranması
 - Spesifik veya panfungal PCR

- **Tanı amaçlı kullanma**
 - Belirteç serumdan çabuk uzaklaştırılmamalı
- **Tarama amaçlı kullanma**
 - Duyarlılığının yüksek olması
 - Prevelans >%5-10

(1→3)-β-D-Glukan

Reference	Patient population	No. of studies (no. of patients)	Type of fungal infection	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)
Karageorgopoulos					
Lu et al., 2011					
Onishi et al., 2012					
Karageorgopoulos et al., 2012	HIV, HM, HSCT, SOT	14 (2800)	PJP	0.96 (0.92–0.98)	0.84 (0.83–0.86)
Lamoth et al., 2012	HM, HSCT	6 (1771)	IA, IC	0.50 (0.34–0.65) for 2 consecutive samples	0.99 (0.97–0.99) for 2 consecutive samples

- Yalancı pozitiflik
- Yüksek maliyet
- Geri ödemesi yok
- Negatif tanı değeri yüksek

(1→3)-β-D-Glukan (BDG)

- **Fungitell test (80pg/ml) (Associates of Cape Cod East Falmouth, MA, USA)**
- Fungitec-G-Test MK (30pg/ml) (Seikagaku Corporation Tokyo, Japan)
- B-G Star (20pg/ml) (**Maruha Corporation, Osaka, Japan**)
- Wako β-Glucan (11pg/ml) (**Wako Pure Chemicals Wako, Japan**)
- Dynamiker Fungus (1-3)-β-D Glucan Assay (95pg/ml) (**Dynamiker Biotechnology Tianjin Co., Ltd, China**)
- **VS**

Mannan Antijeni ve Anti-mannan antikoru

- Mannan *Candida* hücre duvarının önemli bir molekülü
- ELISA yöntemi ile serum/plazma örneklerinde aranıyor
- Mannan antijenemisi, anti-mannan varlığında azalıyor
 - Sadece Mannan testinin geri ödemesi var
- Kombine kullanımı
- Seri kullanımı
 - ECIL kronik dissemine kandidoz ve kandidemi beraber kullanılması (BIII ve CII)
 - ESCMID: Kandidemi ve kronik dissemine kandidozda «recommended II»

Tüm Hastalar (128 hasta)

	Duyarlılık	Özgüllük	PPV	NPV
Mannan Ag	31,9	76,8	63,9	46,7
Anti-mannan Ab	81,9	46,4	66,3	66,7
Her ikisi (+)	20,8	89,3	48,4	46,7
Herhangi biri (+)	93	33,9	64,4	88,1

Hasta Gruplarına göre duyarlılık

	Mannan Ag (+)	Mannan Ab (+)
Nötropenik hasta (9)	6 (%66,7)	2 (%22,2)
Non-nötropenik hasta (63)	17 (%27)	57 (%90,5)
Bakteriyemili ve sağlıklı kontrol (56)	13 (%23,2)	30 (%53,6)

Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment	Ref.
Patients with prolonged neutropenia or allogeneic stem cell transplantation recipients <u>not on mould-active prophylaxis</u>	Prospective screening for IA	GM in blood ^a Draw samples every 3–4 days	<u>A</u> C	<u>I</u> III	Highest test accuracy requiring two consecutive samples with an ODI ≥ 0.5 or retesting the same sample Prospective monitoring should be combined with HRCT and clinical evaluation	[82,94,390–394]
Patients with prolonged neutropenic or allogeneic stem cell transplantation recipients <u>on mould active prophylaxis</u>	Prospective screening for IA	GM in blood ^a	<u>D</u>	<u>II</u>	Low prevalence of IA in this setting with consequently low PPV of blood GM test Prophylaxis may have a negative impact on sensitivity of the test or the low yield may be due to decreased incidence of IA	[395,396]
Patients with a haematological malignancy • <u>Neutropenic patients</u> • Non-neutropenic patients	<u>To diagnose IA</u>	GM in blood ^a	<u>A</u> B	<u>II</u> II	Significantly lower sensitivity in non-neutropenic patients	[319,391,397,398]
ICU patients	To diagnose IA	GM in blood ^a	<u>C</u>	<u>II</u>	Better performance in neutropenic than in non-neutropenic patients	[89,399]
Solid organ recipients	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Low sensitivity, good specificity Most data for lung SOT	[319,400,401]
Any other patient	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Piperacillin/tazobactam may no longer be responsible for false-positive results according to recent studies Cross-reactivity in case of histoplasmosis, fusariosis, talaromycosis (formerly: penicilliosis) False-positive results reported due to ingestion of ice-pops, transfusions, antibiotics, Plasmalyt® infusion	[398,402–409]
Cancer patients	To monitor treatment	GM in blood ^a	A	II		[85,353,410]

Guo YL, et al. 2010. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* **138**:817– 824.

PLOS ONE 2012, 7(8):e43347.

Systematic Review and Meta-Analysis of Detecting Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive *Aspergillosis*

Mingxiang Zou¹, Lanhua Tang², Shushan Zhao^{2*}, Zijin Zhao², Luyao Chen², Peng Chen³, Zebing Huang⁴, Jun Li¹, Lizhang Chen⁵, Xuegong Fan⁴

Serum GM testine göre daha yüksek duyarlılık daha düşük özgüllük

Günümüzde eşik optik indeks 1 olarak alınıyor

Detection of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples of Patients at Risk for Invasive Pulmonary Aspergillosis: Analytical and Clinical Validity

D'Haeze J et al. JCM 2012; 50:1258-63

- Hematoloji ve diğer hastalar (Karışık popülasyon)
- 251 BAL örneği kullanılmış
- Proflaksi değerlendirilmemiş

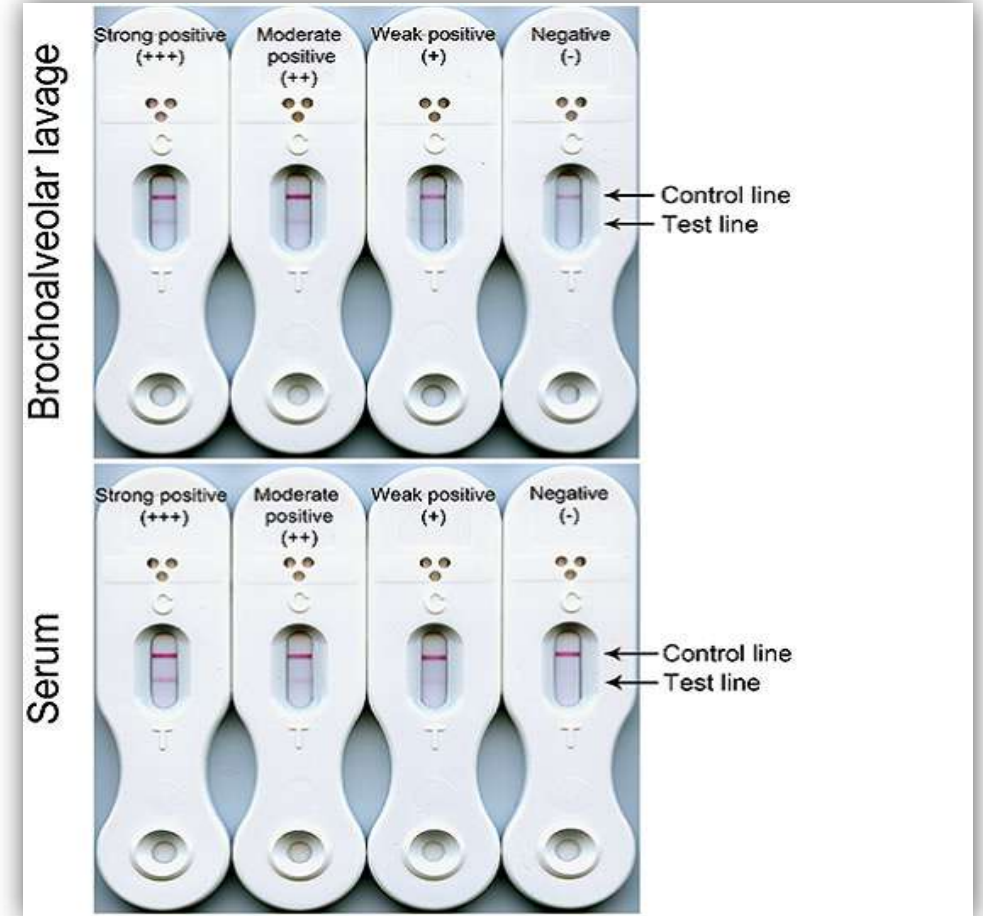
- ROC analizi sonucu en iyi OI değeri 0,8 bulunmuş
- $OI \geq 3$ PPD %100; $OI \leq 0,5$ NPD %98

Galaktomannan Kiti

- **Platelia Aspergillus (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France)**
- Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan Assay (Dynamiker Biotechnology Tianjin China)
- FungiXpert *Aspergillus* Galactomannan ELISA (ERA Biology Tianjin China)
- Euroimmun Galaktomannan kiti (Euroimmun; Germany)
-VS

Lateral Flow Device (LFD)/Lateral Flow Assay (LFA)

- İmmunkromotografi prensibini kullanmakta
- **LFD** (LFD=OLM Diagnostics UK): *Aspergillus* tarafından salgılanan glikoproteine karşı oluşturulmuş monoklonal antikoru (JF5 IgG3) kullanmakta
- **LFA** (LFA= IMMY sona USA) : Galaktomannan antijenine karşı monoklonal antikor kullanmakta
- 10-15 dakikada sonuçlanıyor
 - **a point-of-care (POC) test**



Fungal enfeksiyon tanısında PCR değerlendiren çalışmalar

	Toplam yayın sayısı	Duyarlılık özgüllük bildiren	Örnek tipi	Ekstraksiyon yöntemi	PCR formatı	Hedef gen	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Aspergilloz	33	23	BAL / tam kan / serum	In house (enzimatik/ mekanik) Ticari (Qiamp/ MagnaPure)	Real-time /endpoint /nested	18S rRNA/mt/28 S rRNA / ITS1	55–100	63.5–100
<i>Pneumocystis</i> pnömoni	13	12	BAL/ balgam/ ağız yıkama	QIAamp/ NucliSens/ HighPure/ Wizard/ In-house (enzimatik)	Endpoint/ nested/ real-time	mt LSU, MSG/ ITS/ 5.8S rRNA/ HSP70	40–100	59–100
Kandidoz	6	6	Tam kan/ serum	In house (enzimatik)/ ticari (Qiamp)	Real-time /endpoint /nested	ITS/ 18S rRNA/ P-450 L	77-100	66–100
İnvaziv fungal enfeksiyonlar	14	8	Tam kan/ serum/ doku	In house (enzimatik)/ ticari (Qiamp)	End point/ real-time	18S rRNA/ ITS	75–100	70–98
Mukormikoz	2	0					-	-

İnvaziv fungal enfeksiyon tanısında PCR

ISHAM
INTERNATIONAL SOCIETY FOR
HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY



WORKING GROUP
EUROPEAN ASPERGILLUS PCR INITIATIVE
EAPCRI

Chamber of Commerce number
(Kamer van Koophandel-NL)
09165918

[Our Goals](#)

[Foundation](#)

[Milestones](#)

[The Steering Committee](#)

[Working Parties](#)

[Commercial Section](#)

[Current Activities](#)

[Publications](#)

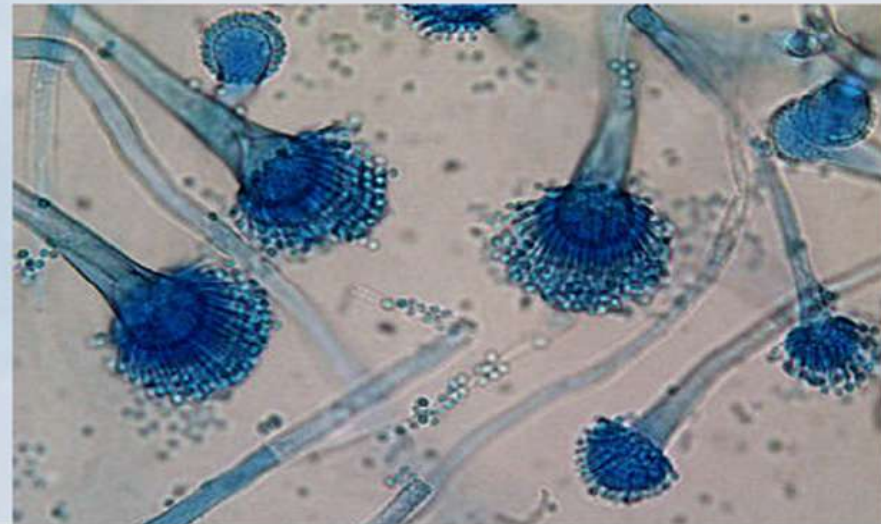
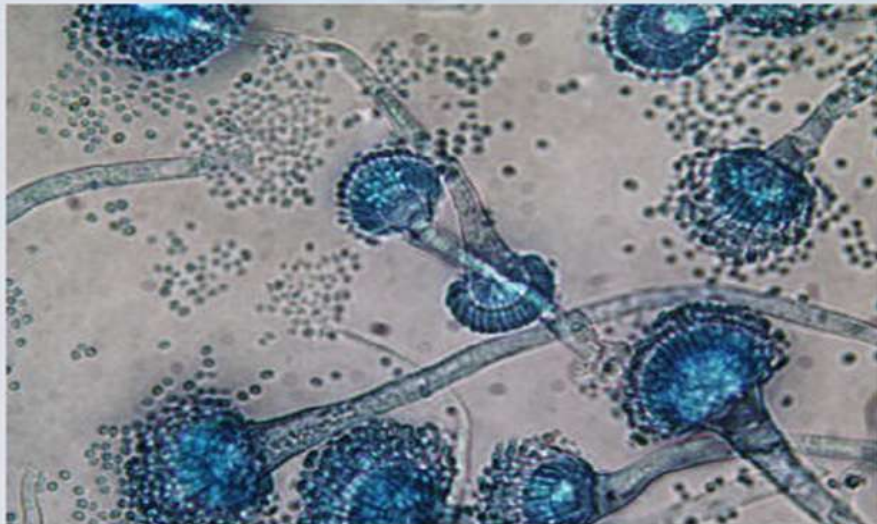
[Sponsors](#)

[Links](#)

[Contact](#)

Welcome to the Working Group European Aspergillus PCR Initiative

The ISHAM Working Group – "Towards a Standard for Aspergillus PCR"



The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

BACKGROUND: Currently, a lack of consensus exists on how best to perform and interpret quantitative real-time PCR (qPCR) experiments. The problem is exacerbated by a lack of sufficient experimental detail in many publications, which impedes a reader's ability to evaluate critically the quality of the results presented or to repeat the experiments.

CONTENT: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines target the reliability of results to help ensure the integrity of the scientific literature, promote consistency between laboratories, and increase experimental transparency. MIQE is a set of guidelines that describe the minimum information necessary for evaluating qPCR experiments. Included is a checklist to accompany the initial submission of a manuscript to the publisher. By providing all relevant experimental conditions and assay characteristics, reviewers can assess the validity of the protocols used. Full disclosure of all reagents, sequences, and analysis methods is necessary to enable other investigators to reproduce results. MIQE details should be published either in abbreviated form or as an online supplement.

SUMMARY: Following these guidelines will encourage better experimental practice, allowing more reliable and unequivocal interpretation of qPCR results.

© 2009 American Association for Clinical Chemistry

The fluorescence-based quantitative real-time PCR (qPCR)¹⁵ (1–3), with its capacity to detect and measure minute amounts of nucleic acids in a wide range of samples from numerous sources, is the enabling technology par excellence of molecular diagnostics, life sciences, agriculture, and medicine (4, 5). Its conceptual and practical simplicity, together with its combination of speed, sensitivity, and specificity in a homogeneous assay, have made it the touchstone for nucleic acid quantification. In addition to its use as a research tool, many diagnostic applications have been developed, including microbial quantification, gene dosage determination, identification of transgenes in genetically modified foods, risk assessment of cancer recurrence, and applications for forensic use (6–11).

This popularity is reflected in the prodigious number of publications reporting qPCR data, which invariably use diverse reagents, protocols, analysis methods, and reporting formats. This remarkable lack of consensus on how best to perform qPCR ex-

Ticari sistemler

- MycoGENIE (Ademtech)
- AsperGenius (PathoNostics)
- Fungiplex (Renishaw)

Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, *Aspergillus* Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment	Ref.
Patients with haematological malignancy	To diagnose IA	PCR on blood samples	B	II	Meta-analysis: 16 studies PCR single positive test: Sensitivity: 88% specificity: 75%; PCR two consecutive	[460]
<p>Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium</p>						[461]
<p>recommendations, fever driven: Sensitivity: 92%, specificity: 95%, negative PCR result to be used to rule out IA</p>						[462]
Haematopoietic stem cell transplantation	To diagnose IA	Prospective screening PCR on whole blood samples	B	II	Combination of serum and whole blood superior	[94–97]
	To diagnose IA	Prospective screening PCR on blood samples	B	II	Addition of GM and PCR monitoring provides greater accuracy, PPV 50%–80%, NPV 80%–90%	[98]
	To diagnose IA	<u>PCR and GM in BAL</u>	A	II		[393]

- Fungal enfeksiyonlarda en önemli ipucu direkt mikroskopik inceleme
 - İyi bir direkt mikroskopik inceleme önemli ilgiler verir
 - Deneyim gerektirir
 - Duyarlılığın düşük olması
- Kültür, tür tanımlaması ve antifungal duyarlılık testleri
 - Biyopsi ve kan kültürleri en önemli örnekler
 - Diğer kültürler yorum gerektirir
- Bugün birçok merkezde galaktomannan testi çalışılıyor
 - Tek serum örneğinde >ODI 1
 - Art arda gelen serum örneklerinde >ODI 0,5
 - BAL örnekleri >ODI 1
 - Serum ODI 0,7; BAL ODI 0,8
 - BAL: $OI \geq 3$ PPD %100; $OI \leq 0,5$ NPD %98
 - Farklı firma kitleri ???
- LFA kullanılabilir. Ülkemizde bulunmakta. Ancak gerçekten hasta başı test mi?
- *Aspergillus* PCR rutin laboratuvar girmeli. Ticari kitler pahalı. Ancak artık in-house yöntem için standardizasyon var
 - *Aspergillus* enfeksiyonlarında BAL GM ve PCR testinin beraberliği tanıda çok önemli
 - Antifungal tedaviyi kestirebilir

Mantar Enfeksiyonları

- Günümüzde mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmaktadır.



- Mantar enfeksiyonlarının nedeni nedir?
- Yeni değişen küresel ısınma ile hiç bilmediğimiz türlerle karşılaşmak olasıdır. Bu