



Sistemik Mantar Enfeksiyonlarında Kan Kültürleri ve Erken Tanıda Yenilikler

Dr. Ayşe Kalkancı

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

- **Sistemik Mantar Enfeksiyonları**
- **Kan Kùltùrleri**
- **Erken Tanı**
- **Yenilikler**

Sistemik Mantar Enfeksiyonları

- Fungemi ve diğer invaziv mantar enfeksiyonları
- Bağışıklık sistemi baskılanmış veya baskılanmamış konaklarda **en sık *Candida*** cinsi mayalar sistemik enfeksiyona neden olurlar.
- *Aspergillus*
- *Cryptococcus*
- *Trichosporon*
- *Zygomycetes* (Mucomycotina)
- *Fusarium*
- *Malassezia*

Gazi Tıp

Bir yıllık toplam kan kültürü sayısı **16891**



74 *Candida* cinsi maya (% 0,4)

Binde 4, onbinde 40, onaltı binde 74

1 *Trichosporon*

2 *Saccharomyces*

Gazi Tıp

Bir yıllık toplam kan kültürü sayısı **16891**



Pozitif üreme sinyali **4942 (% 29.5)**



74 *Candida* cinsi maya (% 14)

Dünyada

Ateşli hastalardan alınan kan kültürlerinin
% 5-15'inde üreme olur.

2005-2014

132 sistemik mantar enfeksiyonu

*Candida, Histoplasma, Aspergillus,
Cryptococcus, Coccidioides*

***Kan ve kemik iliği kültürlerinin % 17.9'unda
mantar***

Gaona-Flores VA, et al. The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: A 10-year retrospective review. Med Mycol 2016.

Kan kültüründe üreyenler

- *S. aureus*
- *S. pyogenes*
- *S. pneumoniae*
- *H. influenzae*
- *Enterobacteriaceae*
- *Bacteroides*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida* türleri

Hangi mantar türleri ürüyor ?

- Ülkelere ve merkezlere göre epidemiyoloji değişiyor.

TABLE 1 - Distribution of causative agents of fungaemia according to gender, age, underlying pathology and occupation of the patients.

Fungaemia agent	Gender	Age	Underlying	
			pathology	Occupation
<i>Candida albicans</i>	female	25	malignant tumors	no occupation
<i>Candida albicans</i>	male	33	AIDS	hairdresser
<i>Candida albicans</i>	male	55	AIDS	bricklayer
<i>Candida membranifaciens</i>	female	39	AIDS	housewife
<i>Cryptococcus neoformans</i>	male	24	AIDS	hairdresser
Dematiaceous fungi	male	35	diabetes mellitus	teacher
<i>Histoplasma capsulatum</i>	female	32	lupus erythematosus	no occupation
<i>Trichosporon</i> sp.	male	48	AIDS	truck driver

AIDS: acquired immune deficiency syndrome.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(6):745-748, nov-dez, 2011



Article/Artigo

Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach

Fungemia em hospital universitário: uma abordagem epidemiológica

Fabiola Maria Marques do Couto¹, Daniele Patrícia Cerqueira Macedo¹ and Rejane Pereira Neves¹

Hangi mantar türleri ürüyor ?

Arendrup et al. ESCMID/ECMM rare invasive yeast guideline

Clin Microbiol Infect 2014; **20** (Suppl. 3): 76–98

TABLE 3. Summary of rare yeast isolates collected during the national surveillance programme in Denmark 2004–2011 and the surveillance programme in Paris hospitals, France October 2002–May 2012. Only unique isolates are included. For comparison and representing other parts of the world data from a US cancer centre, the Artemis study and a Brazilian study are included

	DK (national) [26,27]	Paris Hosp. ^a	US (cancer centre) [28]	Artemis study 1997–2007 [29]	Sao Paulo Brazil [30]
Fungaemia isolates (total)	3982	3668	3382	NA	1195
Rare yeasts other than <i>Candida</i>	44 (1.1%)	188 (5.1%)	94 (2.8%)	11,240	174 (14.5%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	13 (29.5%)	137 (72.8%)	NA	3,512 (31.2%)	79 (45.4%)
<i>Cryptococcus</i> spp.	1 (2.3%)	1 (0.5%)	NA	113 (1.0%)	NA
<i>Geotrichum</i> spp.	2 (4.5%)	19 (10.1%)	2 (5%)	NA	NA
<i>Rhodotorula</i> spp.	4 (9.1%)	5 (2.7%)	21 (51%)	462 (4.1%)	28 (16.1%)
<i>Saccharomyces</i> spp. ^b	22 (50.0%)	14 (7.4%)	8 (20%)	1,321 (11.8%)	NA
<i>Trichosporon</i> spp.	2 (4.5%)	11 (5.9%)	8 (20%)	1,196 (10.6%)	NA
<i>Malassezia</i> spp.	0	1	1 (2%)	NA	NA
<i>Pichia anomala</i>	0	NA	1 (2%)	28 (0.2%)	32 (18.4%)
<i>Saprochaete capitata</i>	0	NA	NA	109 (1.0%)	NA

NA, Not available.

^aYEASTS Network, National Reference Centre for Invasive Mycoses and Antifungals, Paris, France (unpublished data).

^bTaxonomically also a *Candida* species (*C. robusta*).

Kan kültüründe Mucoromycotina üyeleri ürüyor mu ?

- Hayır
- Olguların çok azında üreme var.

Cruz R, et al. Invasive fungal disease (IFD) by filamentous fungi in the Valparaíso Region, Chile, since implementation of rapid laboratory diagnosis. Rev Chilena Infectol 2015.

Tabla 1. Características generales de los pacientes con EFT. Región de Valparaíso, Chile: años 2012-2014 (n: 18)	
Edad (mediana)	37
Sexo masculino (n)	11
Patologías de base en pacientes	
Onco-hematológica	12
Lupus eritematoso sistémico (LES)	4
Enfermedad pulmonar crónica	1
SIDA	1
Categorías diagnósticas EORTC/MSG	
Probable	12
Probada	6
Localización de la infección	
Pulmonar	12
Senos paranasales	4
Sangre	2
Método de laboratorio diagnóstico	
GM	9
GM + cultivo de tejidos	1
Cultivo de tejidos + BP	3
Cultivo de LBA + EMD	3
Hemocultivo	2
Especies aisladas	
<i>Rhizopus oryzae</i>	3
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	1
<i>Sarocladium strictum</i>	1
<i>Sarocladium kiliense</i>	1
<i>Alternaria alternata</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
Micelio estéril	1

GM: galactomanano; BP: biopsia; EMD: examen microscópico directo.

Yanlış pozitiflik ?

	Doğru (%)	Yanlış (%)
<i>S. aureus</i>	87	6
KNS	12	82
<i>Enterococcus</i>	70	16
Difteroidler	2	96
<i>C. albicans</i>	90	

Nasıl alınmalı ?

- Deri antisepsisi
 - Merkezden perifere doğru
 - % 70'lik alkol 5 sn, kurutmak için 30-60 sn
 - % 2'lik iyot bileşikleri, kurutmak için 45-60 sn
 - İyot + alkol kurutma süresini kısaltır
- En az 10 ml
- İki ayrı noktadan alınan, iki ayrı set
- Eksik alınan her 1 ml için tanı değeri % 3 azalır

- Deri antisepsisi

- Povidin iyot bileşiklerine göre

- İyot tentürü

- (7 g iyot ve 3 g potasyum iyodür (KI) karıştırılıp, 90 g etilalkolde çözünür)

- Klorin peroksit

- Klorhekzidin glukonat **daha üstün**

- **İyot tentürü = Klorhekzidin glukonat**

Clin Microbiol Infect 2013; **19**: 513–520

Kan kültürü

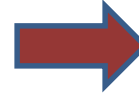
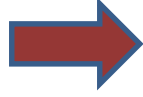
Venöz kan

- infant: 0.5 – 2 ml
- Çocuk: 2 – 5 ml
- erişkin: 5 – 10 ml

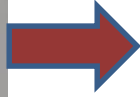
Aseptik teknik

Ateşi takiben 10.cu dakikada alınmalı

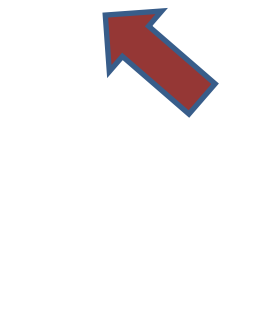
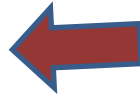
- Bakteriyel endokardit şüphesi varsa 3 set alınmalı



Kan kültürü alınması



MİKROBİYOLOJİ



Kan kültürü sistemleri

- Sıvı besiyeri
- Anti koagülan
- Resinler
- Kömür



Mantarlar için özel sistemler ??

Datcu R, et al. Comparison of BACTEC™ blood culture media for the detection of fungemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016.

- BACTEC standart & Mycosis
- 173 kan örneği
- “Mycosis” şişesine de ekim yapılması mantarların izolasyon şansını arttırıyor.
- ½ gün ile 4 gün erken tanı
- *Candida glabrata* !

Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia

Chih-Cheng Lai,¹ Cheng-Yi Wang,² Wei-Lun Liu,¹ Yu-Tsung Huang^{3,4}
and Po-Ren Hsueh^{3,4}

Table 1. TTP and number of non-duplicate positive blood culture bottles of four commonly encountered *Candida* species

Species	No. of bottles with positive cultures	Mean TTP \pm SD (h)
<i>C. albicans</i>	83	34.2 \pm 25.1*
<i>C. tropicalis</i>	41	16.9 \pm 7.7†
<i>C. glabrata</i>	33	56.5 \pm 25.5†
<i>C. parapsilosis</i>	14	38.9 \pm 17.1*

*Significantly different to *C. tropicalis* and *C. glabrata*.

†Significantly different to all other species.

Zheng S, et al. A dedicated fungal culture medium is useful in the diagnosis of fungemia: a retrospective cross-sectional study. PLOS One 2016.

<i>Fungal species</i>	No. of sets, n = 144 (%)
<i>C. tropicalis</i>	44 (30.6)
<i>C. glabrata</i>	37 (25.7)
<i>C. albicans</i>	31 (21.5)
<i>C. parapsilosis</i>	17 (11.8)
<i>T. asahii</i>	8 (5.6)
<i>C. dubliniensis</i>	2 (1.4)
<i>C. neoformans</i>	2 (1.4)
<i>Candida sp. (non-albicans)</i>	1 (0.7)
<i>S. cerevisiae</i>	1 (0.7)
<i>Ustilago species</i>	1 (0.7)

- 2012-2014
- 83 963 aerop/anaerop
- 7921 Myco
- 350 kültür pozitif (160 hasta)

- 144 kültür (93 hasta)
- “Myco” şişesi eklenmesi izolasyon şansını % 24 arttırıyor.
- Eklenmez ise fungemilerin % 25’i kaçırılıyor.

Hangi kan kültür sistemi ?

Nawrot U, et al. Evaluation of blood culture media for the detection of fungi. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015.

- Mycosis & Aerobic karşılaştırması
 - Simüle fungemi örnekleri

Table 1 Time to detection (TTD) of simulated fungal blood cultures obtained in Mycosis and Aerobic media

Species (number of strains)	Mycosis		Aerobic		Difference ^a Mean (h) (±SD)	Wilcoxon signed-rank test
	Mean (h) (±SD)	Range	Mean (h) (±SD)	Range		
<i>C. albicans</i> (14)	26.6 (5.6)	20–39	27.36 (4.6)	20.5–39.33	–0.75 (3.07)	<i>p</i> =0.18
<i>C. parapsilosis</i> (12)	31.41 (3.41)	26.7–41	30.5 (4.21)	27.7–44.3	0.91 (2.39)	<i>p</i> =0.06
<i>C. glabrata</i> (8)	21.36 (2.4)	19–25.5	56.9 (7.95)	44.2–70.3	–35.5 (7.46)	<i>p</i> =0.0006
<i>C. krusei</i> (6)	21.07 (1.17)	18.5–23.7	19.09 (0.9)	17.5–21	1.97 (1.63)	<i>p</i> =0.004
<i>Candida</i> spp. ^b (7)	41.03 (20.77)	19.2–75.8	36.57 (16.64)	18.2–69.2	4.46 (8.55)	<i>p</i> =0.03
<i>Cryptococcus neoformans</i> (8)	55.24 (10.9)	42.5–77.3	78.27 (23.4)	47.8–113.3	–24 (24.1)	<i>p</i> =0.0005
Others ^c (5)	33.43 (11.6)	24.6–59.7	37.06 (18.6)	25.17–76		<i>p</i> =0.5
Total (60)	32.4 (13.9)	18–77.3	39.48 (21.8)	17.5–113.33	–7 (16.8)	<i>p</i> =0.017

2005–2006

71 000 standart ve 3400 Myco/F Lytic

Standart şişe ile % 0.2 Myco ile % 1.2 C

85 atak (53 atak çıkarıl

32 kalan atak

Myco

GEREK YOK; ÜSTELİK PAHALI

ve 9 sadece standart

Kirby JE, et al. Optimal use of Myco/F lytic and standard BACTEC blood culture bottles for detection of yeast and *Mycobacteria*. Arch Pathol Lab Med 2009.

Isolator kan kültür sistemi



Kim TJ, et al. Update on blood cultures: how to obtain, process, report and interpret. Clin Microbiol Infect 2013

- **Lizis - santrifügasyon**
- Kan parçalanıyor
- Katı besiyerine ekim yapılıyor
- **Mantarlar** ve *Bartonella* için önerilmiş
- Ancak üstün değil
- Anaeroplara ve *Haemophilus*, pnömokoklar için standart kültürlerle göre kötü
- İş yükü fazla
- Laboratuvar çalışanları için riskli

VersaTREK® for Use in Determination of Fungemia

K. Vogt¹, C. Bastulli²

1. Alexian Brothers Med. Ctr., Elk Grove Village, IL 2. TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH.

Organism	Number of isolates tested	Range of TTD: Aerobic bottle (hours)	Range of TTD: MYCO bottle (hours)
<i>Candida albicans</i>	23	20.5 – 39.5	23.2 – 43.4
<i>Candida glabrata</i>	15	18.4 – 33.6	20.4 – 50.8
<i>Candida kruseii</i>	3	22.3 – 26.4	33.6 – 36
<i>Candida kefyr</i>	3	20 – 36	25.5 (2 not detected)
<i>Candida parapsilosis</i>	13	23.4 – 39.5	25.9 – 54.7
<i>Candida tropicalis</i>	4	17.8 – 21.8	23.1 – 25.6

Mirrett S, et al. Controlled clinical comparison of VersaTREK and Bact/ALERT blood culture systems. J Clin Microbiol 2007.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	19 – 62.6	25 – 28.8
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	No growth	No growth

Riedel S, et al. Comparison of BD Bactec Plus Aerobic/F medium to VersaTREK Redox 1 blood culture medium for detection of *Candida* spp. in seeded blood culture specimens containing therapeutic levels of antifungal agents. J Clin Microbiol 2011.

<i>Fusarium</i> spp.	1	Patient isolate	144
<i>Cunninghamella</i> spp.	1	148.8	27.1

Shanthachol T, et al. A comparative study to determine the recovery rate of microorganisms of bloodstream infections: two versus three blood culture specimens. J Med Assoc Thai 2012.

<i>Beauveria</i> spp.	1	No growth	No growth
<i>Scopulariopsis</i> spp.	1	76	97.2
<i>Trichosporon beigeli</i>	1	13.1	16.3

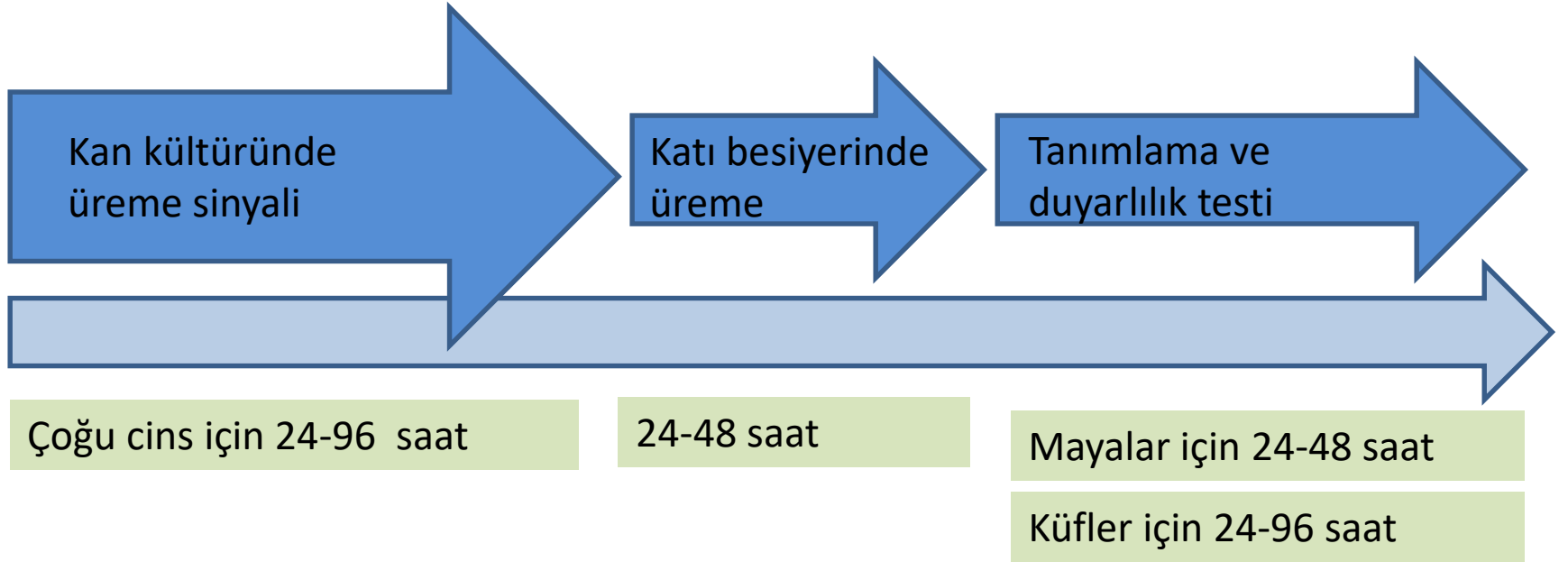
Üreme sinyali alındıktan sonra

- Gram boyama
- Besiyerlerine pasaj
- Hızlı antijen testleri
- Doğrudan çimlenme borusu
- Doğrudan maya tanımlama sistemine pasaj
- Doğrudan MALDI-TOF
- Doğrudan tanısal PCR



Tanı için geçen süre (saat)

Hastada *Candida glabrata* fungemisi var demek için geçen süre en az 7 gün



Kan kültüründen direk çimlenme borusu

- Tek yayın !
- Duyarlılık % 87.1% , özgüllük % 100

Sheppard DC, et al. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol 2008.

Kan kültüründen doğrudan MALDI-TOF ile tanı

- Kan kültüründe pozitif sinyal
- Sonrası basamaklar yerine doğrudan MALDI-TOF
- Zor üreyen ve zor tanınan mantarlar için anlamlı

Etiology

Exophiala dermatitidis

Saprochaete clavata

Fusarium verticillioides

Trichosporon asahii

Fusarium solani

Fusarium solani

Trichosporon asahii

De Almeida JN Junior, et al. Rapid identification of moulds and arthroconidial yeasts from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. Med Mycol 2016.

Doğrudan kan kültüründen MALDI-TOF

- Yöntemler karşılaştırılıyor
- Kanın uzaklaştırılması ve mikroorganizma için ön işlem basamakları deneniyor
- UMUT verici

Yonetani S, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. Int J Infect Dis 2016

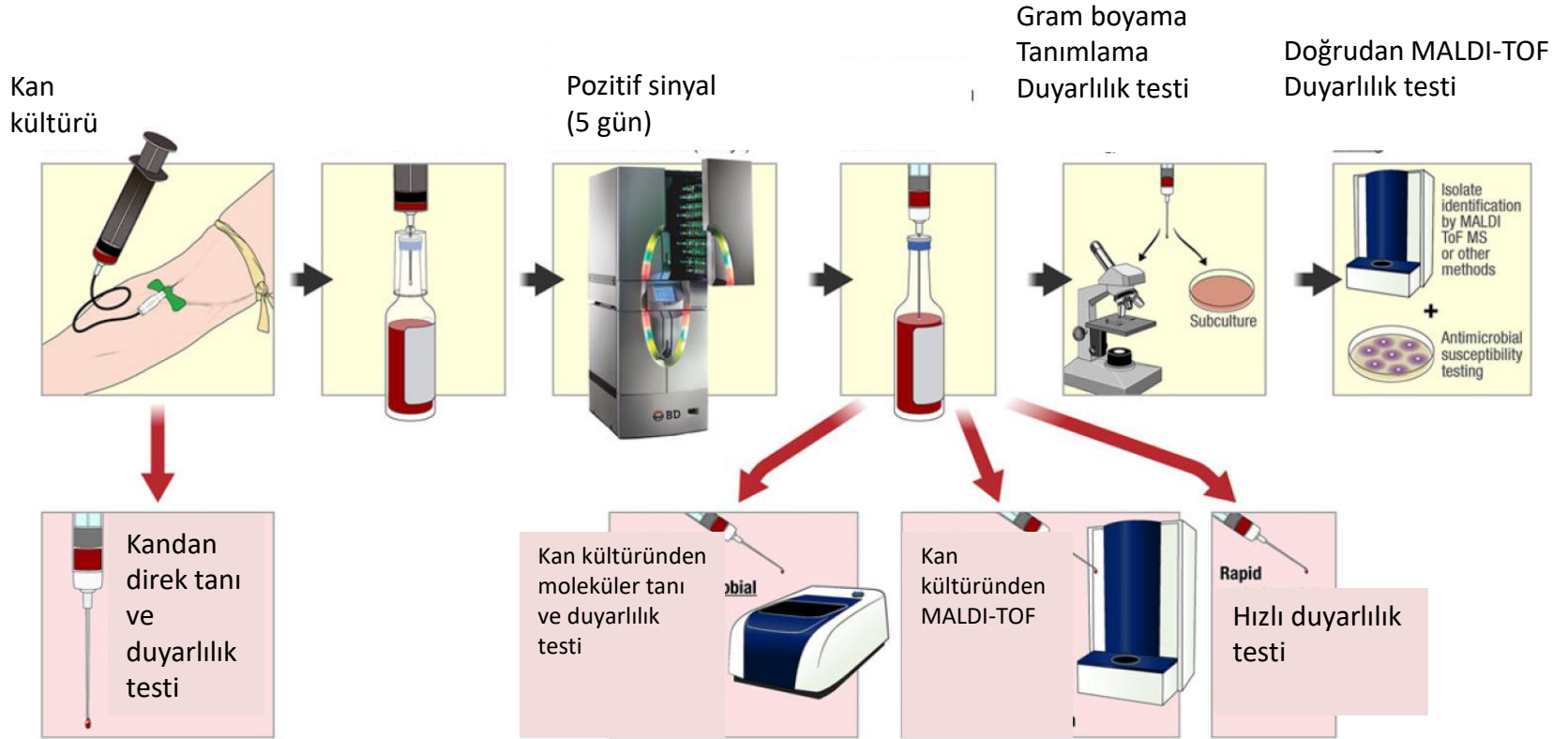
Jeddi F, et al. Performance assessment of two lysis methods for direct identification of yeasts from clinical blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. Med Mycol 2016

MALDI-TOF

Kan kültüründe üreme + MALDI-TOF

- Kan kültürü için süre aynı, izolasyon şansı aynı
 - Sadece tanımlama hızlanır
-
- Kan lizis-santrifügasyon ile katı besiyerine ekilir
 - MALDI-TOF ile tanımlanır
 - Kan kültürüne göre 3.8 saat (Sabouraud agar) veya 7.4 saat (çikolata agar) **HIZLANIR**

Idelevich EA, et al. Rapid Detection and Identification of Candidemia by Direct Blood Culturing on Solid Medium Using Lysis-Centrifugation Method Combined with MALDI-TOF MS. J Clin Microbiol 2016.



Banerjee R, et al. Individualized Approaches Are Needed for Optimized Blood Cultures. Clin Infect Dis 2016.

Kan Kùltùrlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Peptid Nùkleik Asit Floresan İn Situ Hibridizasyon (PNA FISH) Yönteminin Deęerlendirilmesi

Aydemir G, Koç AN, Atalay MA. Mikrobiyol Bùlt 2016

- Kan kùltür ŐiŐesinden doğrudan
 - PNA FISH (Yeast Traffic Light® PNA FISH, AdvanDx, ABD)
 - *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*

Tablo 1. *Candida* suşlarının tanımlanmasında her iki yöntemle alınan sonuçlar

Suş Sayısı	Olgu sayısı (%)	
	Konvansiyonel yöntemler	PNA FISH*
19	<i>C.albicans</i>	Yeşil
12	<i>C.glabrata</i>	Kırmızı
5	<i>C.parapsilosis</i>	Yeşil
5	<i>C.kefyr</i>	-
4	<i>C.krusei</i>	Kırmızı
2	<i>C.guilliermondii</i>	-
1	<i>C.tropicalis</i>	Yeşil**
1	<i>C.tropicalis</i>	Sarı
1	<i>C.lusitaniae</i>	-

* Bu yöntemde yeşil renk *C.albicans* ve *C.parapsilosis*; kırmızı renk *C.glabrata* ve *C.krusei*; sarı renk ise *C.tropicalis*'i ifade etmektedir.

** Uyumsuz sonuç.

(-) Yöntemin değerlendirme panelinde bulunmayan türler.

Aydemir G, Koç AN, Atalay MA. Mikrobiyol Bült 2016

Kan kültüründen bağımsız tanı yöntemleri

- Serolojik testler
 - Mannan antijeni
 - Mannan & Anti-mannan
 - Galaktomannan antijeni
 - Beta glukan testi
- Hasta başı testler (POC)
 - Yatay akım testleri (Lateral flow device)
- Moleküler testler
 - Etkene yönelik PCR
 - Çoklu tarama için PCR testleri

ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures

Clin Microbiol Infect 2012; 18 (Suppl. 7): 9–18

TABLE 2. Summary of recommendations by *Candida* disease, specimen and test evaluated

Disease	Specimen	Test	Recommendation	Level of evidence
Candidaemia	Blood Serum	Blood culture	Essential investigation ^a	NA
		Mannan/anti-mannan	Recommended	II
		B-D-glucan	Recommended	II
		Other antibodies	No recommendation	No data

Kan kültürü kandidemi, invaziv kandidoz ve kronik kandidozda temel tanı yöntemidir

Tissue and sterile body fluids	In-house PCR	No recommendation	No data
	Direct microscopy and histopathology	Essential investigation	NA
	Culture	Essential investigation	NA
	Immuno-histochemistry	No recommendation	No data
	Tissue PCR	No recommendation	No data
	<i>In situ</i> hybridization	No recommendation	No data

Kan kültürü dışında mannan&antimannan, beta glukan testi tanıda önerilir.

Moleküler yöntemleri önermek için henüz kanıt bulunmamaktadır.

Oropharyngeal and oesophageal candidiasis	Swab	<i>In situ</i> hybridization	No recommendation	No data
		Culture	Essential investigation	NA
	Biopsy ^b	In-house PCR	No recommendation	No data
		Direct microscopy and histopathology	Essential investigation	NA
Vaginal candidiasis	Swab/vaginal secretions	Culture	Essential investigation	NA
		In-house PCR	No recommendation	No data
		Direct microscopy	Essential investigation	NA
		Culture	Essential investigation	NA
		Commercial tests	Use validated test only	NA
In-house PCR	No recommendation	No data		

NA, not applicable.

^aEssential investigation means it must be done if possible.

^bOropharyngeal biopsy is not mandatory.

Hasta başı testler

- *Aspergillus* için yatay akım testi (LFD)
 - GM testine yakın sonuçlar
 - PCR ile birlikte özgüllük ve duyarlılık artıyor
 - Umut verici
- *Cryptococcus*
- *Histoplasma*

- Proximity ligation assays (PLA)
 - *Aspergillus* mannoproteinini gösterir
 - LFD'daki ile aynı antikor
 - Özgüllük GM'dan 10-100 kat
 - LFD'dan 1000 kat fazla

Prattes J, et al. Point of Care testing for the diagnosis of fungal infections: Are we there yet ? Curr Fungal Infect Rep 2016

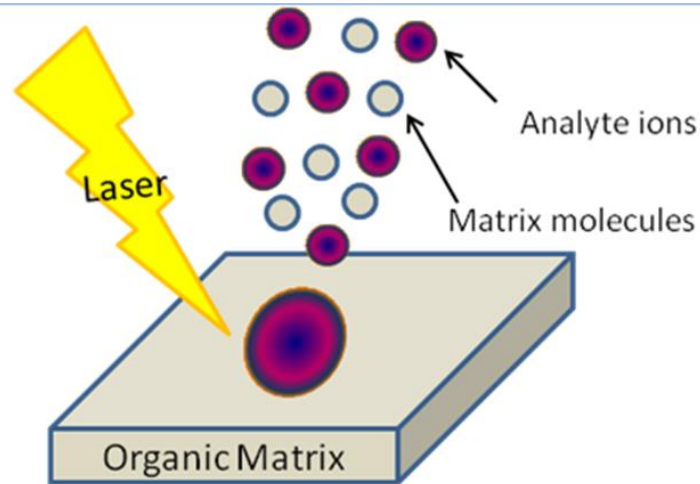
Çoklu hedefe yönelik PCR testleri

- SeptiFast (Roche)
- **Altı saat** içinde en az **bir mikroorganizma** izolasyonu kan kültüründen **13 kat fazla**
- Antimikrobiyal kullanımı ile ilişkisiz
- Kan kültürü ortalama 17 saatte pozitif
- SeptiFast ortalama 6 saatte pozitif veya negatif sonuç veriyor

Suberviola B, et al. Microbiological Diagnosis of Sepsis: Polymerase Chain Reaction System Versus Blood Cultures. Am J Crit Care 2016.

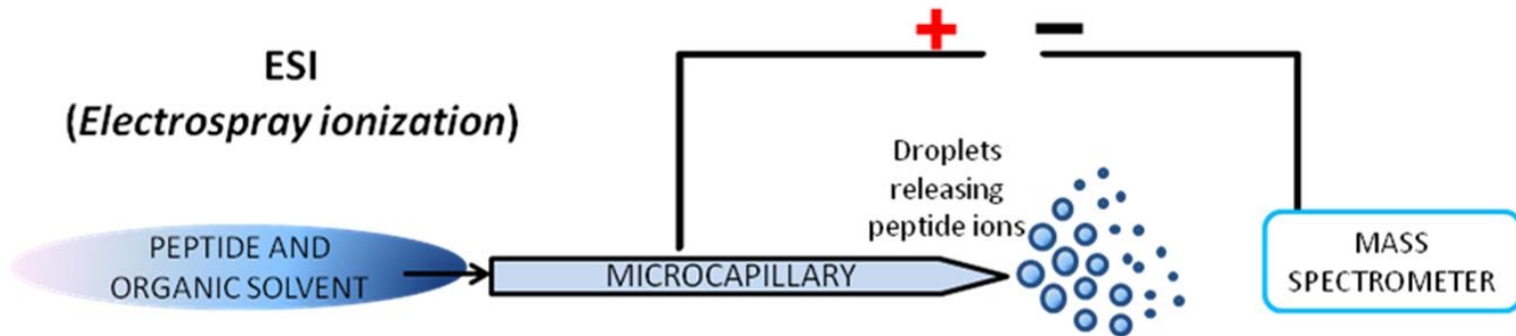
A)

MALDI
(Matrix-assisted laser desorption/ionization)



B)

ESI
(Electrospray ionization)



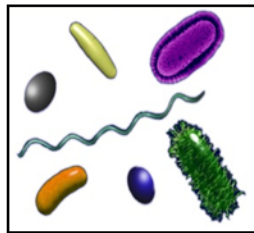
Desmet S, et al. Broad-range PCR coupled with Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for detection of bacteremia and fungemia in patients with neutropenic fever. J Clin Microbiol. 2016

PCR/ESI-MS Process

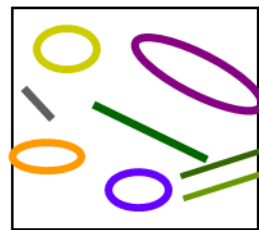
STEP

1

Extract nucleic acid from sample:



Microbe Mixture



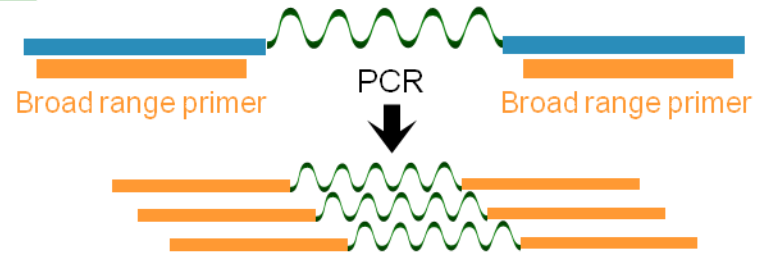
Purified Nucleic Acids

STEP

2

Amplify nucleic acids to measure:

Use broad-range, unbiased PCR primers

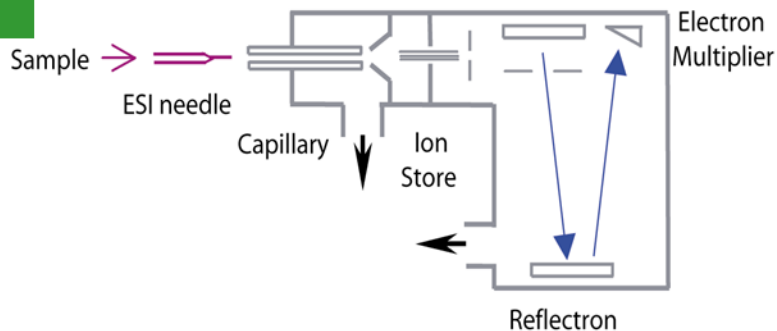


STEP

3

Measure nucleic acid:

Mass spec



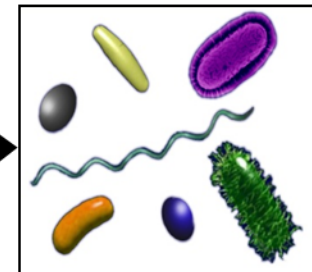
STEP

4

Identify the organisms:

Base-composition fingerprints

As: 17
Gs: 30
Cs: 11
Ts: 61



Sonuç

- Fungemide ve invaziv (sistemik) mantar enfeksiyonlarında tanı için altın standart yöntem kan kültürüdür.
- Zaman alıcıdır – Kısmen otomatize edilebilir
- Duyarlılık testi yapılabilmesi için koloni gereklidir
- Kültürü hızlandıran yöntemler
- Kültürden bağımsız tanı yöntemleri