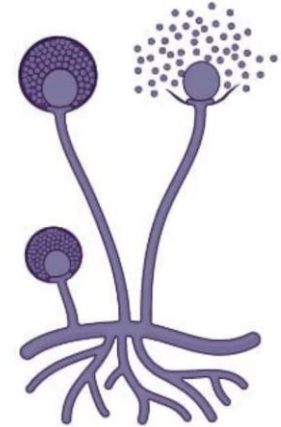


Mukormikozun Mikrobiyolojik Tanısı: Hangi Örnek, Hangi Yöntem Kullanılmalı?

Dr. Öğr. Üyesi Elif Seren Tanrıverdi

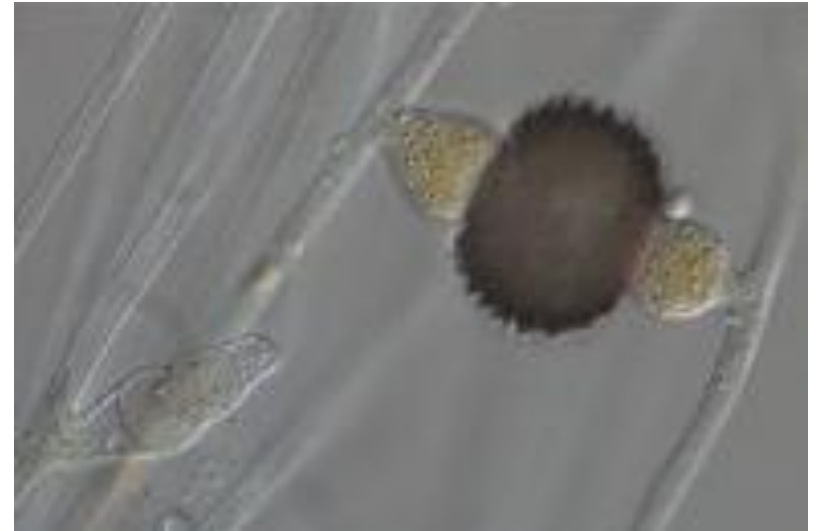
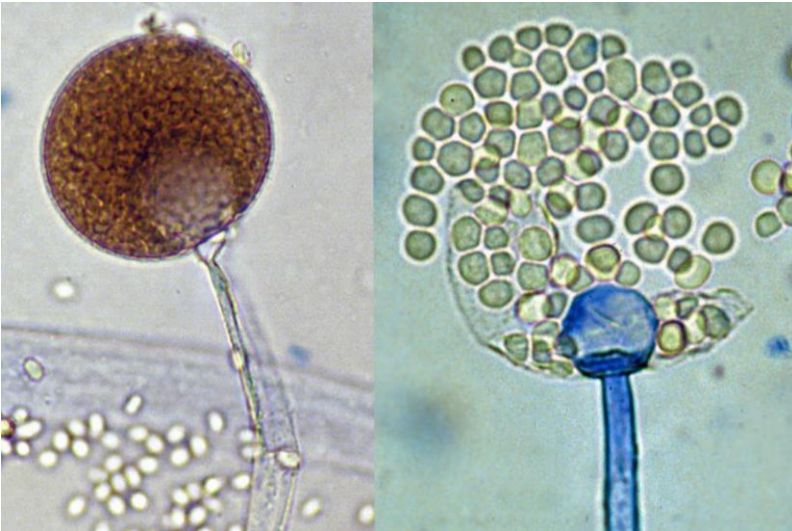
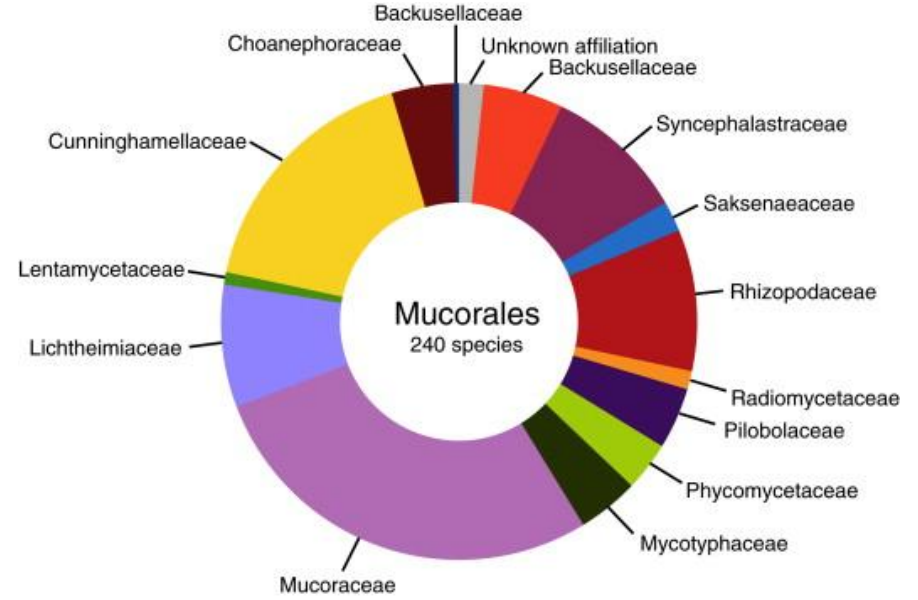
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



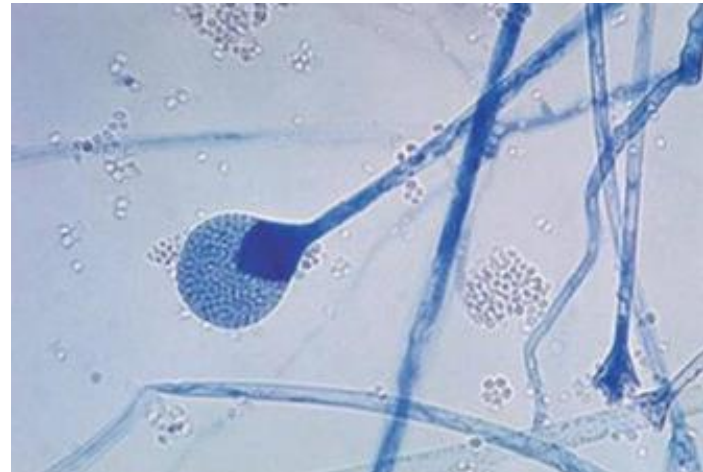
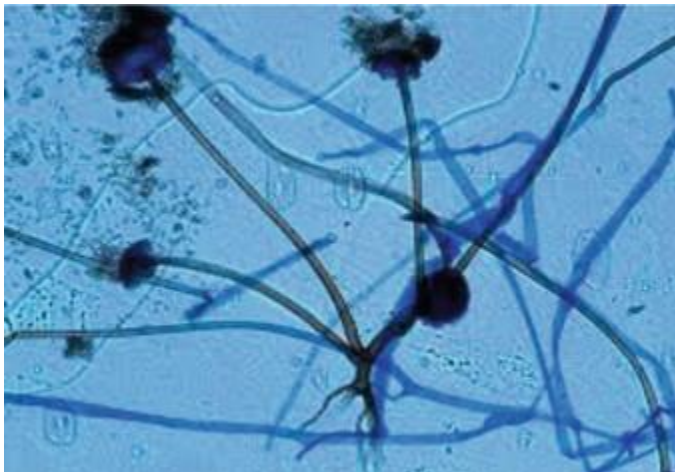
Mucorales takımı

- *Zygomycetes* (eski taksonomi)
- *Mucoromycotina* (güncel taksonomi)
- Yaklaşık 240 tür
- Septasız hifler
- **Melanin içermezler**
- Sporangiospor **eşey**siz sporları
- Zigospor **eşey**li sporları



Mucorales takımı

- *Rhizopus*,
- *Mucor*,
- *Lichtheimia* (eskiden *Absidia*),
- *Rhizomucor*,
- *Cunninghamella*,
- *Saksenaea*
- *Apophysomyces*,
- *Cokeromyces*,
- *Actinomucor*,
- *Syncephalastrum*,
- *Thamnostylum*,
- *Mycotypha*,
- *Chlamydoabsidia*,
- *Mortierella*



Mukormikoz

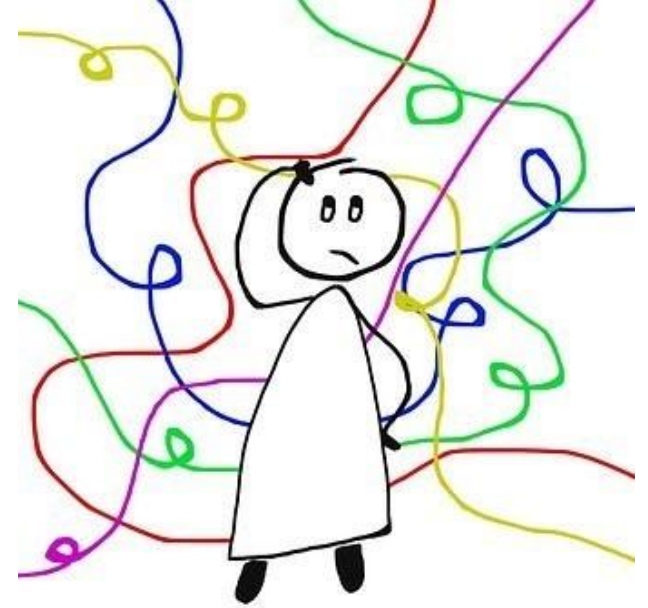
- *Mucorales* takımı mantarların neden olduğu **anjiyoinvaziv ve agresif seyirli** fungal enfeksiyon
- Eskiden zigomikoz olarak isimlendirilmekteydi.
- Mukormikozda en sık izole edilen tür ***Rhizopus arrhizus***'tur.
- *Rhizopus*, *Lichtheimia* ve *Mucor* dünyadaki olguların **yaklaşık %75'inden** sorumludur.



Mucormycosis is caused by molds belonging to the order Mucorales, most commonly *Rhizopus species*. Other causative species include *Mucor species*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces species*, and *Lichtheimia* (formerly *Absidia*) species.

Mukormikoz Tanısı Neden Zor?

- Hızlı progresyon
- Kültür negatifliği
- Yanlış örnekleme
- Antifungal başlanmış olgular
- Serolojik test yok
- galaktomannan / β -D-glukan negatif
- Non-spesifik görüntüleme
- Multidisipliner tanı yaklaşımı gerektirir

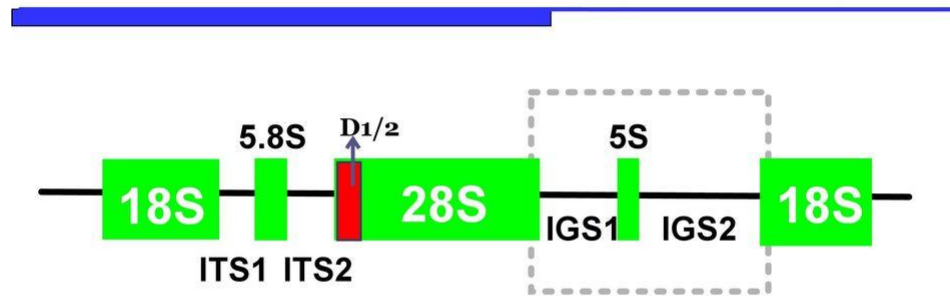


Doğru tanı = Doğru örnek + Doğru zaman + Doğru yöntem

Laboratuvar Tanısı

- Direkt mikroskopik inceleme
- Kültür
- MALDI-TOF MS
- Moleküler yöntemler

rDNA gen bölgesi



ITS : Internal Transcribed Spacer
IGS : Intergenic Spacer

8,188 bp

Uygun Örnek Tipleri

- **Kutanöz** lezyonlardan cilt kazıntıları,
- **Rinoserebral** tutulumda nazal akıntılar,
- Sinüslerden kazıntı ve aspirat örnekleri,
- Pulmoner lezyonlarda **bronkoalveoler lavaj ve iğne biyopsileri**,
- Gastrointestinal hastalığı olan olgularda **biyopsi** dokuları,

Mucorales'in histopatolojik incelemede diğer filamentöz küflerden ayırt edilmesi zor olabileceği için uygun klinik örneklerin **çok sayıda ve doğru şekilde toplanması** önemlidir.

Uygun Örnek Tipleri

- **Kutanöz** lezyonlardan cilt kazıntıları,
- **Rinoserebral** tutulumda nazal akıntılar,
- Sinüslerden kazıntı ve aspirat örnekleri,
- Pulmoner lezyonlarda **bronkoalveoler lavaj ve iğne biyopsileri**,
- Gastrointestinal hastalığı olan olgularda **biyopsi** dokuları,
- **Otopsi** örnekleri



ORIGINAL ARTICLE SAGE

The Postmortem Features of Mucormycosis

Tracy S. Halvorson , Alexandra L. Isaacson , Bradley A. Ford, and Dennis J. Firchau

ABSTRACT

Mucormycosis is a rare and severe invasive fungal infection caused by ubiquitous fungi of the order Mucorales. Infection often occurs in immunocompromised hosts and includes cutaneous, pulmonary, gastrointestinal, rhinocerebral, and disseminated forms of disease. Although the clinical characteristics of mucormycosis are well established, infection can be difficult to diagnose antemortem, resulting in frequent postmortem diagnoses. Despite this, the gross appearance of mucormycosis at autopsy has not been well described. In the present report we illustrate the

Uygun Örnek Gönderimi

- Mukormikoz şüphesinde laboratuvar önceden bilgilendirilmeli.
- **Soğukta gönderilmez.** İdeali oda ısısında, mümkünse hemen
- Steril kapta serum fizyolojik ile nemlendirilmiş gazlı bez içinde
- Kurutulmadan
- Formalin eklenmeden gönderilir.
- Laboratuvarda homojenizasyon yapılmaz.
- Dilimleme yada parçalama sonrası Saboraud dekstroza ekim yapılır.



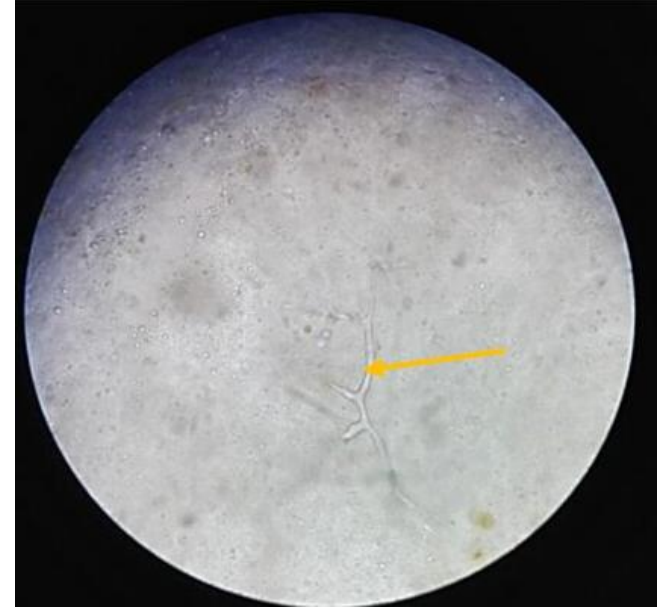
Eksüda ve nekrotik dokuda; canlı organizma sayısı azdır.

Bu örneklerde yoğun inokülasyon gereklidir.

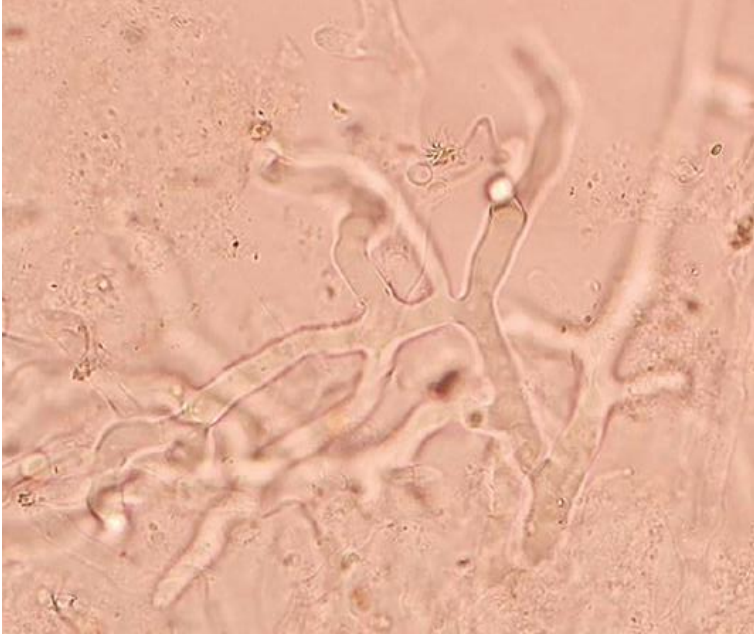
Direk Mikroskopik İnceleme

- *Mucorales* takımına ait
- Hyalin küf,
- geniş (6-25 μm) çaplı,
- **septasız**, düzensiz, şerit benzeri,
- **geniş açıyla (90°) dallanan** hif yapılarının görülür.
- Ucuz ve hızlı ancak negatifliği enfeksiyonu dışlamaz (**duyarlılık %70-80**).

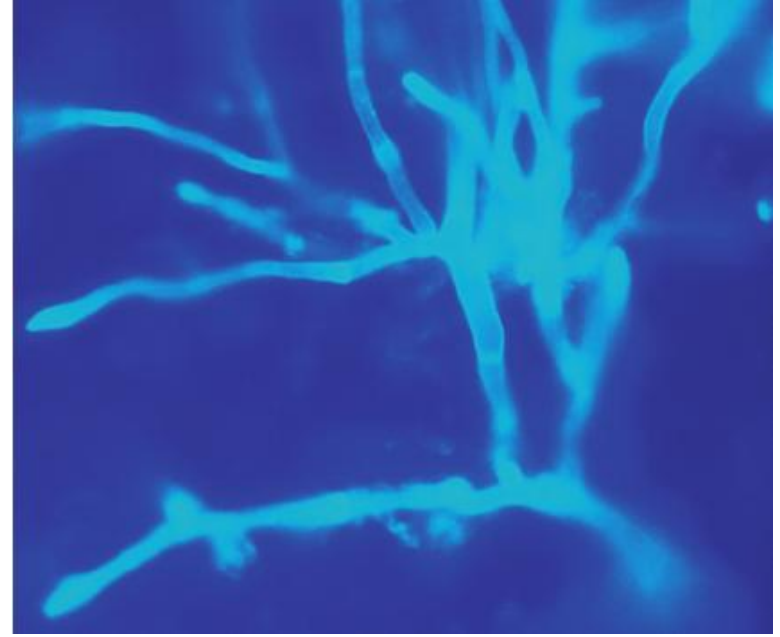
Aspergillus ve diğer hiyalen küflerden ayrımı antifungal tedavi seçiminini etkilediğinden klinik açıdan önemlidir.



Direk Mikroskopik İnceleme



%10'luk KOH



Calcofluor beyazı

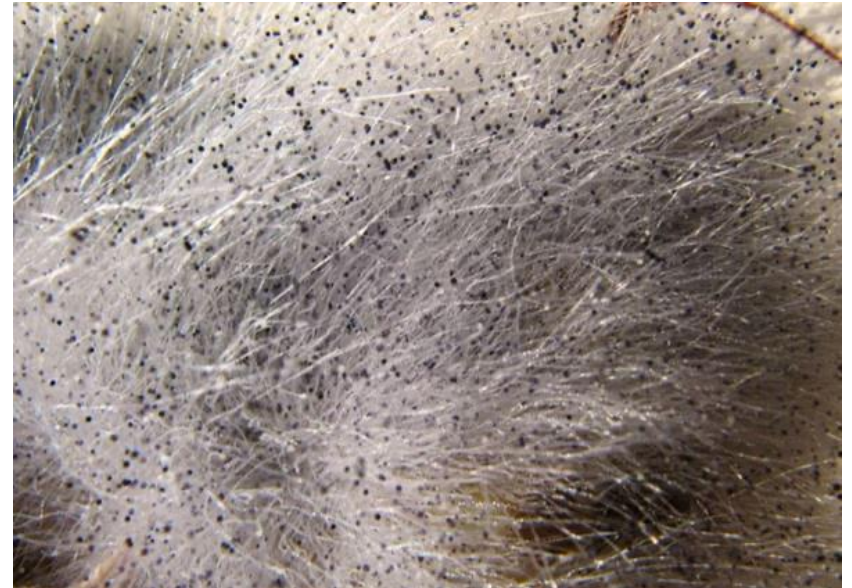
- Doku biyopsisi, endoskopik sinüs örneği, orbital doku, BAL
- **Kültür negatif olarak sonuçlansa dahi özellikle steril bir bölgeden alınan biyopsi örneğindeki pozitif doğrudan mikroskopik inceleme sonucu dikkate alınmalıdır.**

Kültür

- Kesin tanı etkenin kültürde üretilmesi ile konur.
- *Mucorales* takımı mantarlar Sabouraud dekstroz (antibiyotikli), PDA, BHI agarda **28-30°C'de hızlı üreme (24-72 saat)** özelliğindedir.
- Pamuksu, beyaz-gri koloniler oluştururlar.
- Petri kutusunu dolduran **yünümsü koloniler** oluştururlar.
- Kültürde üretildikten sonra identifikasyon yapılabilir.



Lid Lifter



Kültür

- Pozitifliği çok değerli ancak negatifliği mukuru dışlamaz.
- *Mucorales*, biyopsi ve laboratuvarıda doku ezme işlemleri sırasında kolayca hasar gören ilkel koenositik hiflere sahiptir.
- Bu nedenle mikroskopide görülmelerine rağmen kültürde üremeyebilirler.
- Mukormikoz şüphesi varlığında doku örneklerinin ezilmeden ekimi önemlidir.
- Fungal kültürler olguların yalnızca %15-25'inde pozitiftir.



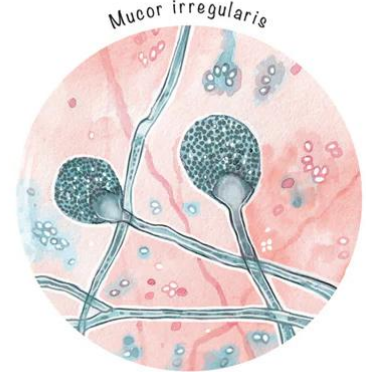
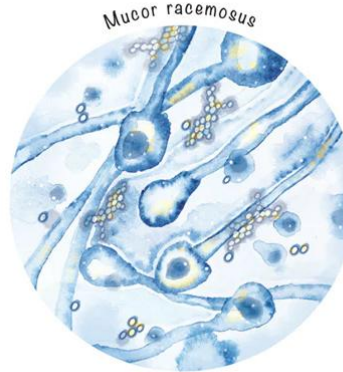
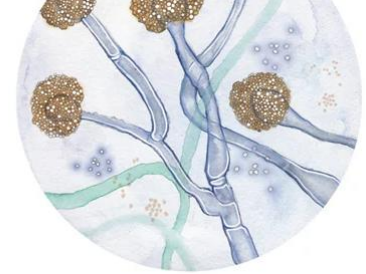
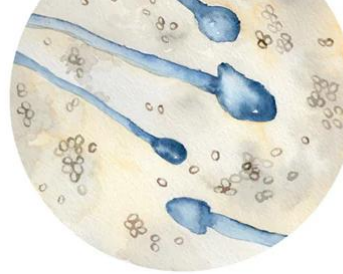
Tuz karabiber görünümü



Pamuk görünümü

Kültür

- Negatif kültür $\neq$ Mukormikoz yok
- Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan kültürlerdeki pozitiflik tek başına tanı koydurucu değildir çünkü *Mucorales* çevrede yaygın bulunur.
- Kültürde *Mucorales* üreyen örneklerin yalnızca %7,6'sının gerçekte enfekte hastalara ait olduğu gösterilmiştir.
- Torres ve arkadaşlarının çalışmasında lösemili hastalarda *Mucorales* izolasyonunun pozitif prediktif değeri %88 bulunmuştur.

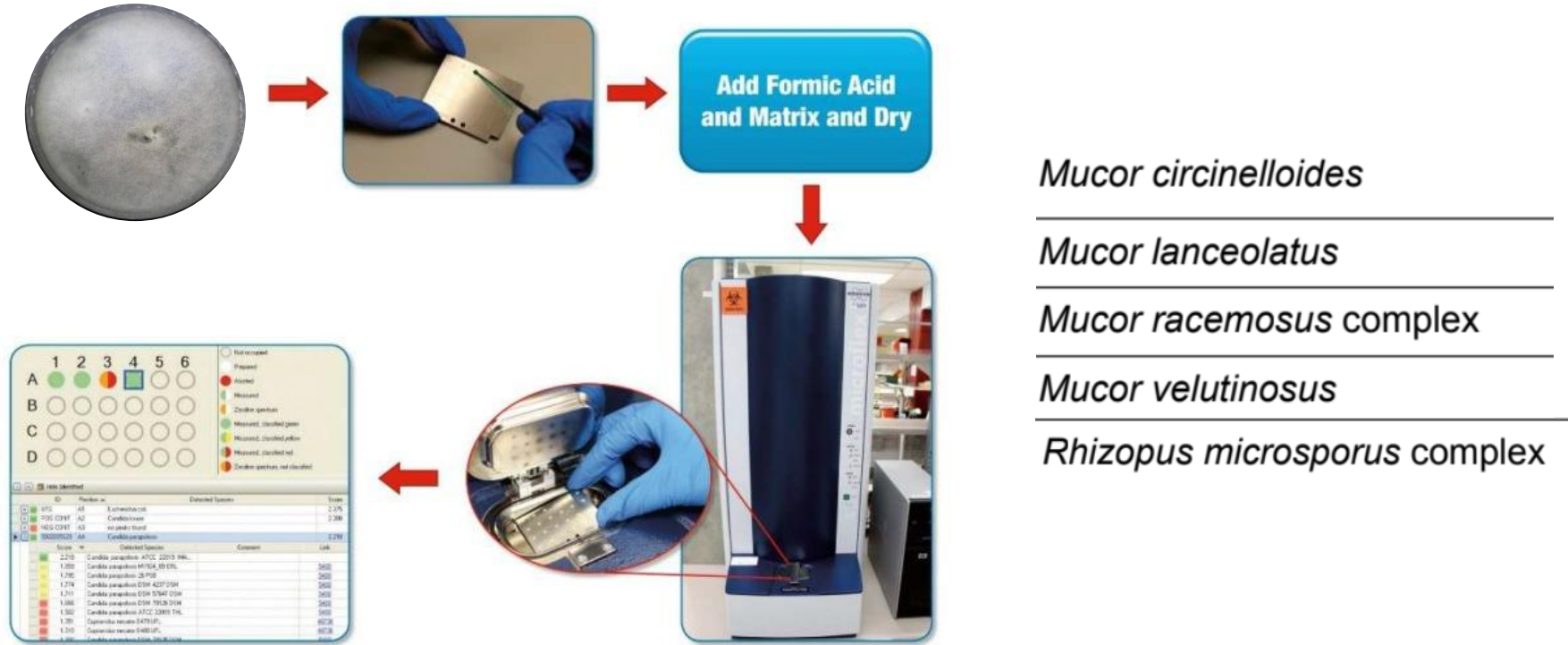


MALDI-TOF MS

- Avantajları (hız, doğruluk)
- Düşük maliyet, kolay uygulanabilirlik
- Dezavantajları (veritabanı bağımlılığı)



MALDI-TOF MS



- Filamentöz mantarlar için MALDI-TOF MS ticari kütüphanelerindeki **fungal** **spektrum çeşitliliği** görece sınırlıdır.
- *Mucorales* takımında **hif kompozisyonu heterojen**, **mutlaka mekanik ve kimyasal ön ekstraksiyon** gerekir.



Comparison of the Filamentous Fungi Library v4.0 MALDI Biotyper Platform vs MSI-2 performance for identifying filamentous fungi from liquid cultures

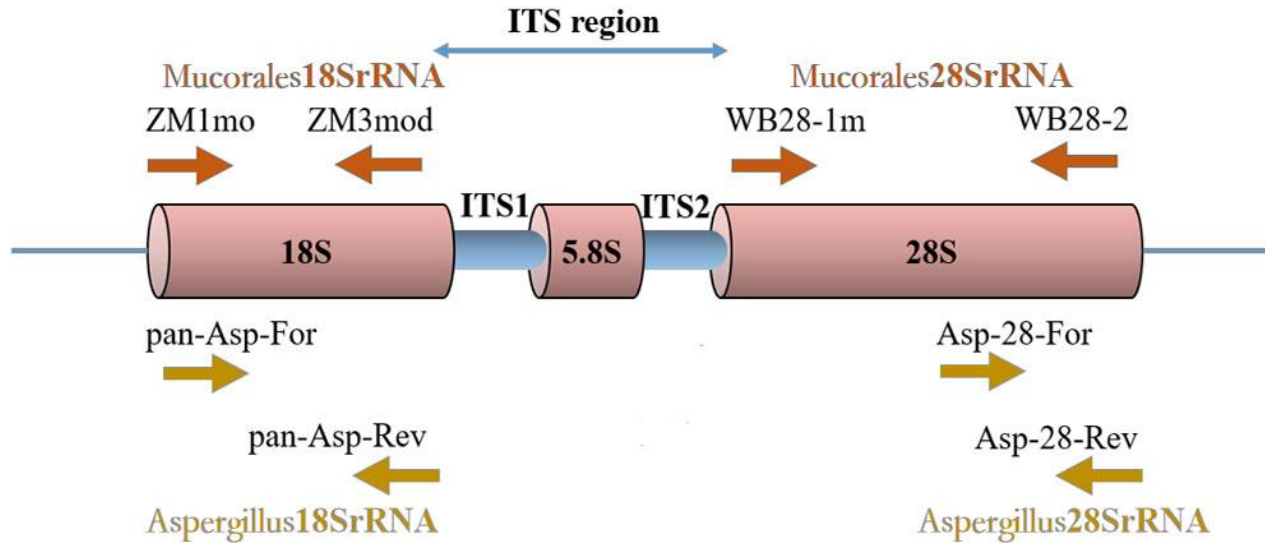
María F. Gonzalez-Lara,¹ Carla M. Román-Montes,¹ Paulette Díaz-Lomelí,¹ Winston Hernández-Ceballos,^{1,2} Lizeth Morales-Camilo,¹ Axel Cervantes-Sánchez,¹ Andrea Cordero-Rangel,¹ Jazmín Tejeda-Olán,³ Alexandro Bonifaz-Trujillo,³ Alfredo Ponce-de-León,¹ Areli Martínez-Gamboa¹

- 2 farklı MALDI-TOF MS'in filamentöz mantarları tanımlama performansının referans yöntem olan dizi analiziyle karşılaştırıldığı çalışmada;
- Genel doğruluk: %96 - %78,5
- *Mucorales* takımında: %88,9 - %55,5

Section	FFL v4.0				MSI2			
	Correct section/SC/genus level ID (%)	Correct species level ID (%)	Non-ID (%)	MisID at species level (%)	Correct section/SC/genus level ID (%)	Correct species level ID (%)	Non-ID (%)	MisID at species level (%)
Genus								
<i>Mucorales</i> (45)	43 (95.5)	40 (89)	2 (4)	0	26 (58)	25 (55.5)	19 (42)	1 (2)

Moleküler Yöntemler

- PCR tabanlı tanı (ITS, IGS)
- Sekans temelli yaklaşımlar: ITS geninin dizi analizi
- Real-time PCR: Hızlı, kantitatif sonuç
- Multiplex PCR paneller: Aynı anda birçok patojen tespiti



Moleküler Yöntemler

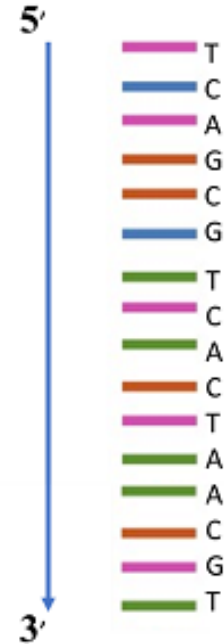
- **MucorGenius** (PathoNostics, Netherlands),
- Fungiplex **Mucorales** RUO Real-Time PCR Kit (Bruker, Germany),
- MycoGENIE ***Aspergillus-Mucorales* spp.** (Ademtech, France)
- Kan, bronkoalveolar lavaj, biyopsi örnekleri



Aspergillus spp./Mucorales

Moleküler Yöntemler

- Sekans temelli yaklaşımlar:
- Mantar sistematğinde en çok tercih edilen: ITS



- ITS bölgesi 500-800 bp uzunluğundadır ve evrensel primerler kullanılarak kolaylıkla PCR ile çoğaltılabilir.
- LSU locus, β -tubulin gen dizileri, *translation elongation factor 1 alpha* (TEF-1 α) ve IGS de kullanılabilir.

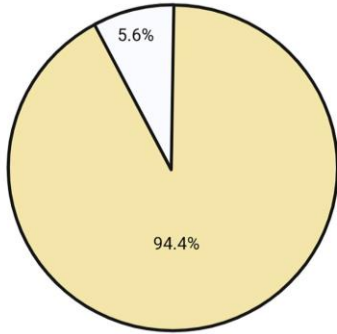
Mucorales PCR Testing in Respiratory and Biopsy Samples From Immunocompromised Patients With Invasive Pulmonary Aspergillosis and Other Mold Infections: Results From a Multicenter ECMM Study

Sarah Sedik,^{1,✉} Robina Aerts,^{2,3,✉} Katrien Lagrou,^{2,3,✉} Yuri Vanbiervliet,^{2,3,✉} Johan A. Maertens,^{2,3} P. Lewis White,⁴ Raquel B. Posso,⁴ Silke Schelenz,⁵ Alireza Abdolrasouli,⁵ Jochem B. Buil,^{6,7,✉} Karl Dichtl,⁸ Harald H. Kessler,⁸ Juergen Prattes,^{1,✉} and Martin Hoenigl^{1,✉}

- Çalışmada immünsüprese hasta grubunda invaziv pulmoner aspergilloz, mukormikoz ve invaziv küf enfeksiyonu tanısında **solunum ve biyopsi örneklerinde MucorGenius PCR testinin performansının** değerlendirilmesi amaçlanmıştır.
- Bu çok merkezli kohort çalışmada Avusturya, Belçika ve Birleşik Krallık'taki 4 merkezden **114 hastaya ait 132 örnek** alınmıştır.

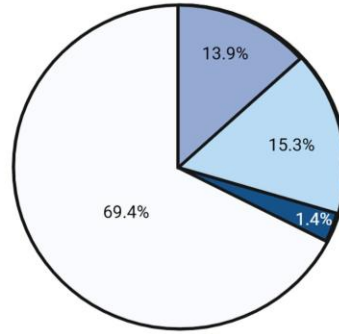
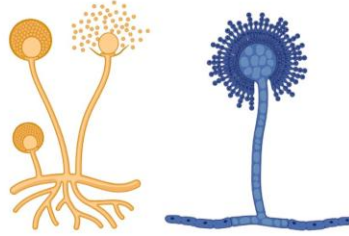
Moleküler Yöntemler

High Sensitivity for Mucormycosis



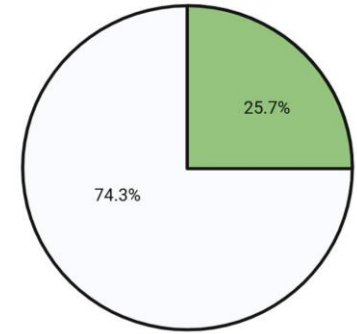
■ MucorGenius® PCR detected Mucorales DNA in 17/18 patients with proven/probable mucormycosis
□ MucorGenius® PCR resulted negative in 1/18 patients with proven/probable mucormycosis

Detection of Co-Infections



■ Co-infections with Mucorales spp. in 10/72 patients with probable/proven IPA in clinical routine and positive MucorGenius® PCR
■ Co-infections with Mucorales spp. in 11/72 patients with probable/proven IPA exclusively by MucorGenius® PCR
■ Co-infections with Mucorales spp. in 1/72 patients with probable/proven IPA diagnosed exclusively in clinical routine (negative MucorGenius® PCR)
□ 50/72 probable/proven IPA patients without co-infections

Additional diagnostic benefit in possible IMI



■ Possible IMI patients (9/35) tested positive by MucorGenius® PCR
□ Possible IMI patients (26/35) tested negative by MucorGenius® PCR

- MucorGenius PCR, standart fungal tanı yöntemleri ile karşılaştırılmış.
- Kanıtlanmış/olası mukormikoz olgularının **%94,4'ünde (17/18) pozitif.**

Development and evaluation of a Pan-Mucorales Real-time PCR and a multiplex Real-time PCR for detection and identification of *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, and *Mucor* spp. in clinical specimens

Helen M. Tang¹, Sharon C.-A. Chen^{1,2,3}, Kerri Basile¹, Catriona L. Halliday ¹

- *Mucorales*'in doğrudan klinik örneklerden hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlamak için mütipleks gerçek zamanlı PCR kiti geliştirilmiş.
- Öncelikle Pan-*Mucorales* PCR ile tarama, ardından *R. arrhizus*, *R. microsporus* ve *Mucor* spp.'yi hedefleyen gerçek zamanlı multipleks PCR
- Tanısal performansı 166 klinik örnekte (70 *Mucorales*-pozitif ve 96 negatif) değerlendirilmiş.

Development and evaluation of a Pan-Mucorales Real-time PCR and a multiplex Real-time PCR for detection and identification of *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, and *Mucor* spp. in clinical specimens

Helen M. Tang¹, Sharon C.-A. Chen^{1,2,3}, Kerri Basile¹, Catriona L. Halliday ¹

- Pan-Mucorales PCR'nin, %98,6 duyarlılık ve %100 özgüllük gösterdiği belirlenmiş.
- Multiplex tür/cins PCR testi;
- *R. arrhizus* için %93,8,
- *R. microsporus* için %70,8 ve
- *Mucor* spp. için %75 duyarlılık ve her biri için %100 özgül

Riskli hastalarda kanda *Mucorales* PCR

Medical Mycology, 2024, **62**, myae030

<https://doi.org/10.1093/mmy/myae030>

Original Article

Advance access publication date: 26 March 2024



OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Use of the *Mucorales* qPCR on blood to screen high-risk hematology patients is associated with better survival

Anne-Pauline Bellanger^{ID 1,2} Houssein Gbaguidi-Haore^{ID 2,3} Ana Berceanu⁴ Laura Gouzien⁵
Chaima El Machhour¹ Damien Richard⁶ Fanny Lanternier⁷ Emeline Scherer^{1,2}
and Laurence Millon^{ID 1,2,*} French Mycoses Study Group

- Yüksek riskli hematoloji hastalarında **haftada 2 kez serumda *Mucorales* qPCR** ile mukormikoz taranmasının prognoza etkisi araştırılmış.
- 6 yıllık sürede **7825 serum *Mucorales* qPCR testi yapılmış**; en az bir pozitif *Mucorales* qPCR'li **(164 pozitif örnek) olan 107 hasta** tespit edilmiş.
- pozitif çıkan hastalar; kanıtlanmış, olası, sadece PCR pozitif olarak sınıflandırılmış.

Riskli hastalarda kanda *Mucorales* PCR

Medical Mycology, 2024, **62**, myae030

<https://doi.org/10.1093/mmy/myae030>

Original Article

Advance access publication date: 26 March 2024



OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Use of the *Mucorales* qPCR on blood to screen high-risk hematology patients is associated with better survival

Anne-Pauline Bellanger^{ID 1,2} Houssein Gbaguidi-Haore^{ID 2,3} Ana Berceanu⁴ Laura Gouzien⁵
Chaima El Machhour¹ Damien Bichard⁶ Fanny Lanternier⁷ Emeline Scherer^{1,2}
and Laurence Millon^{ID 1,2,*} French Mycoses Study Group

- 60 hastaya ait 70 örnek (median Cq= 40); kolonizasyon, yalancı pozitiflik
- 6 hasta sınıflandırılmayan
- 41 hastanın 82 örneği (median Cq= 35); mukormikoz tanısı
- Cq düştükçe fungal yük artar ve mukormikoz tanısı daha olası
- Fransa ulusal RESSIF kohortu kıyaslandığında: **1 aylık tüm nedenlere bağlı mortalite %48 daha düşük** (p = 0,03)

Proaktif tarama = erken tanı = daha erken tedavi → **daha iyi sağkalım**

ECMM Mycoses Study Group Görüşleri

THE LANCET
Infectious Diseases

Review

Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium



Oliver A Cornely, Ana Alastruey-Izquierdo, Dorothee Arenz, Sharon C A Chen, Eric Dannaoui, Bruno Hochhegger, Martin Hoenigl, Henrik E Jensen, Katrien Lagrou, Russell E Lewis, Sibylle C Mellinghoff, Mervyn Mer, Zoi D Pana, Danila Seidel, Donald C Sheppard, Roger Wahba, Murat Akova,

- Mukormikoz tanısında kültür şüpheli vakaların yaklaşık %15-25'inde pozitiftir.
- Vakaların bir kısmında tanı postmortem süreçte konur.
- antijen testi (GM / BDG negatif) ve serolojik testler yok
- sendromik panel testler yok

ECMM Mycoses Study Group Görüşleri

THE LANCET
Infectious Diseases

Review

Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium



Oliver A Cornely, Ana Alastruey-Izquierdo, Dorothee Arenz, Sharon C A Chen, Eric Dannaoui, Bruno Hochhegger, Martin Hoenigl, Henrik E Jensen, Katrien Lagrou, Russell E Lewis, Sibylle C Mellinghoff, Mervyn Mer, Zoi D Pana, Danila Seidel, Donald C Sheppard, Roger Wahba, Murat Akova,

- Tanıda **özellikle *Mucorales* PCR testlerinin rolü giderek artıyor.**
- “Mucorales PCR, şüpheli vakalarda histopatoloji ve kültürün tamamlayıcısı olarak değerlendirilmelidir ve **tanısal algoritmalara eklenmelidir.**”
- PCR testleri yüksek riskli hastalarda, kültür negatif olgularda ve kanıtlanmış/olası IPA hastalarında mukormikoz tanısını hızlandırabilir ve hastalığın yönetimine katkı sağlar.

Yeni Yaklaşımlar



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.org



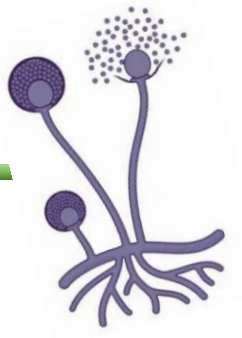
Narrative Review

Laboratory innovations to diagnose invasive mould infections—what is relevant, what is not?

Yuri Vanbiervliet^{1,2}, Robina Aerts^{2,3}, Lenn Maessen^{2,4}, Joost Wauters^{2,5},
Johan Maertens^{1,2}, Katrien Lagrou^{2,6,*}

- Mukormikoz tanısı için **ticari bir antijen testi yok**.
- Mucorales PCR testleri tanıda devrim niteliğinde. Özellikle negatifliği enfeksiyonu dışlamak açısından önemli.
- Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (**LAMP**) testleri
- Yeni tanı hedefleri: **sideroforlar**
- *Mucorales*-Spesifik T Hücrelerinin tespiti (ELISPOT)

Teşekkür ederim



- Tanıda multidisipliner iş birliği gerekir.
- Enfeksiyon Hastalıkları
- Mikrobiyoloji
- Radyolojik bulgular
- Histopatoloji

