İnfektif Endokarditin Histopatolojik ve Mikrobiyolojik Tanısı: «Testi Yapmak Değil Doğru Yapmak Önemli»

İnfektif Endokarditin Tanısında Kanda ve Dokuda Moleküler Yöntemler: Ne Kadar Yararlı?

Prof. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İbn-i Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı

İnsidans: ~3,6/100.000, E/K>2/1, Mortalite ~%16

Erişilebilen en eski bildiri
- **1554:** Jean François Femel, Fransa: Endokarditin klinik bulgularına dair ilk bildiri

Otopsi bulguları ve Vejetasyon teorileri
- **1646:** Lazare Riviere, Fransa: Otopside aort kapağında fındık büyüklüğünde büyümeler
- **1799:** Xavier Bichat, Fransa: "Doku inflamasyonu"
- **1806:** Jean Nicolas Corvisart, Fransa: "Vejetasyon" teriminin kullanılması
- **1809:** Allan Burns, İngiltere: Vejetasyonların "büyüme" değil "yumru" olduğu

Hastalığın isminin ve kliniğinin tanımlanması
- **1835:** Jean-Baptiste Bouillaud, Fransa: "Endokardiyum" ve "endokardit" isimlendirmesi, semptomların tanımlanması

"Lokal" enfeksiyondan "Sistemik" enfeksiyona geçiş
- **1852:** Willian Senhouse Kirkes, İngiltere: Dolaşıma geçen vejetasyon parçalarının uzak organlara ulaşmasıyla ortaya çıkan semptomlar
- **1858-1871:** Rudolph Virchow, Almanya: "Embolizm" teriminin kullanılması ve fibrin vejetasyonun mikroskopta incelenmesi

Endokarditin etkeni "öldürücü bir zehir"
- **1861:** Jean-Martin Charcot ve Alfred Vulpian, Fransa: Organizmalar bilinmiyor. Hastanın "tifoidal" semptomlarından endokardda devamlı üretilen "öldürücü zehir" sorumlu

1. Parazitik organizmalar 2. Giriş kapısı 3. Dolaşımla yayılma
- **1869:** Emmanuel Winge, Norveç: "Parazitik organizmalar" ciltten girip kanla kalbe ulaşır.
- **1872:** Hjalmar Heiberg, Norveç: Puerperal endokarditte "vibrio"ların giriş yeri uterus
- **1878:** Edwin Klebs, Almanya: Tüm endokarditler enfeksiyöz orijinlidir

Kapak lezyonlarının predispozan faktör olarak tanımlanması
- **1878:** Karl Koester, Almanya: Uzun süre anormal mekanik saldırılara maruz kalan kapakçıklar, bakteriler için elverişli bir yatak oluşturur

Deneysel endokardit modelleri oluşturulması
- **1878:** Ottomar Rosenbach, Polonya: İlk endokardit hayvan modeli
- **1886:** Vladmir Wyssokowitsch ve Johannes Orth, Almanya: Hasarlı kapakçıkları olan hayvanlarda kana verilen bakteriler endokardite neden olabilir

Kan kültürleri
- **1881-1886:** Arnold Netter ve Joseph Grancher, Fransa: Aseptik kan örneklemesi ve kültürü. Otopside kan kültürleri ve vejetasyonlarda aynı organizmaların üretilmesi. Grancher'ın hastalığı "infektif endokardit" olarak isimlendirmesi

Hastalığın tüm yönleriyle tanımlanması
- **1885-1908:** William Osler, Kanada: Endokarditin "isim babası". Vejetaasyonun non-bakteriyel trombotik çekirdeğini ve etken çeşitliliğini açıkladı. Endokarditi, kardiyak ve sistemik klinik semptomları ile tanımladı.
- **1909:** Thomas Horder, İngiltere: Valvulopati varlığı, oral-intestinal giriş kapıları, mikotik anevrizmalar, streptokokların hakimiyeti

Tanı kriterleri
- **1981:** Von Reyn ve ark.: Beth Israel Kriteleri
- **1994:** Durack ve ark.: Duke Kriterleri
- **2000:** Li ve ark. Modifiye Duke Kriterleri

1554 — 1865 — 1909 — 1950 — 2000

- **1648:** Anton von Leeuwenhoek: Mikroskobun icadı
- **1816:** Theophile Laennec: "silindirik" steteskopun icadı
- **1865:** Louis Pasteur, Fransa: "Jerm teorisi" Mikroplar, enfeksiyon hastalıklarını neden olur ve yayılırlar. **1865:** Robert Koch, Almanya: "Koch postülatları" Spesifik mikroplar spesifik hastalıklar oluştururlar
- **1882:** Hans Christian Gram, Danimarka: Gram boyama yöntemi
- **1890:** Louis Malasez, Fransa: Cam enjektörün icadı
- **1953:** DNA'nın ikili sarmal yapısının keşfi
- **1967:** Thomas Brock: Ekstremofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'un izolasyonu
- **1976:** *T. aquaticus*'un termostabil DNA polimerazının isolasyonu (Taq polimeraz)
  1977: Sanger sekanslama yönteminin tanımlanması
- **1982:** Mikroarray teknolojisi kullanılarak yapılan ilk çalışma yayımlandı
  1983: Kary Mulis PCR tekniğini keşfetti
  1985: PCR tekniğini kullanan ilk çalışma Science dergisinde yayımlandı.
- **Moleküler Tanı Kriterleri Eklensin mi????**

Habib G. Infective Endocarditis; Springer International 2016'dan uyarlanmıştır

Etkenler

Dün…

- Viridans streptokoklar %17-41
- *S. aureus* %15-23
- *Streptococcus bovis* %5-15
- *E. faecalis* %5-10
- KNS %3-8

Bugün…

- *S. aureus* %25-31
- Viridans streptokoklar %30
- KNS %11
- *E. faecalis* %10
- HACEK %3

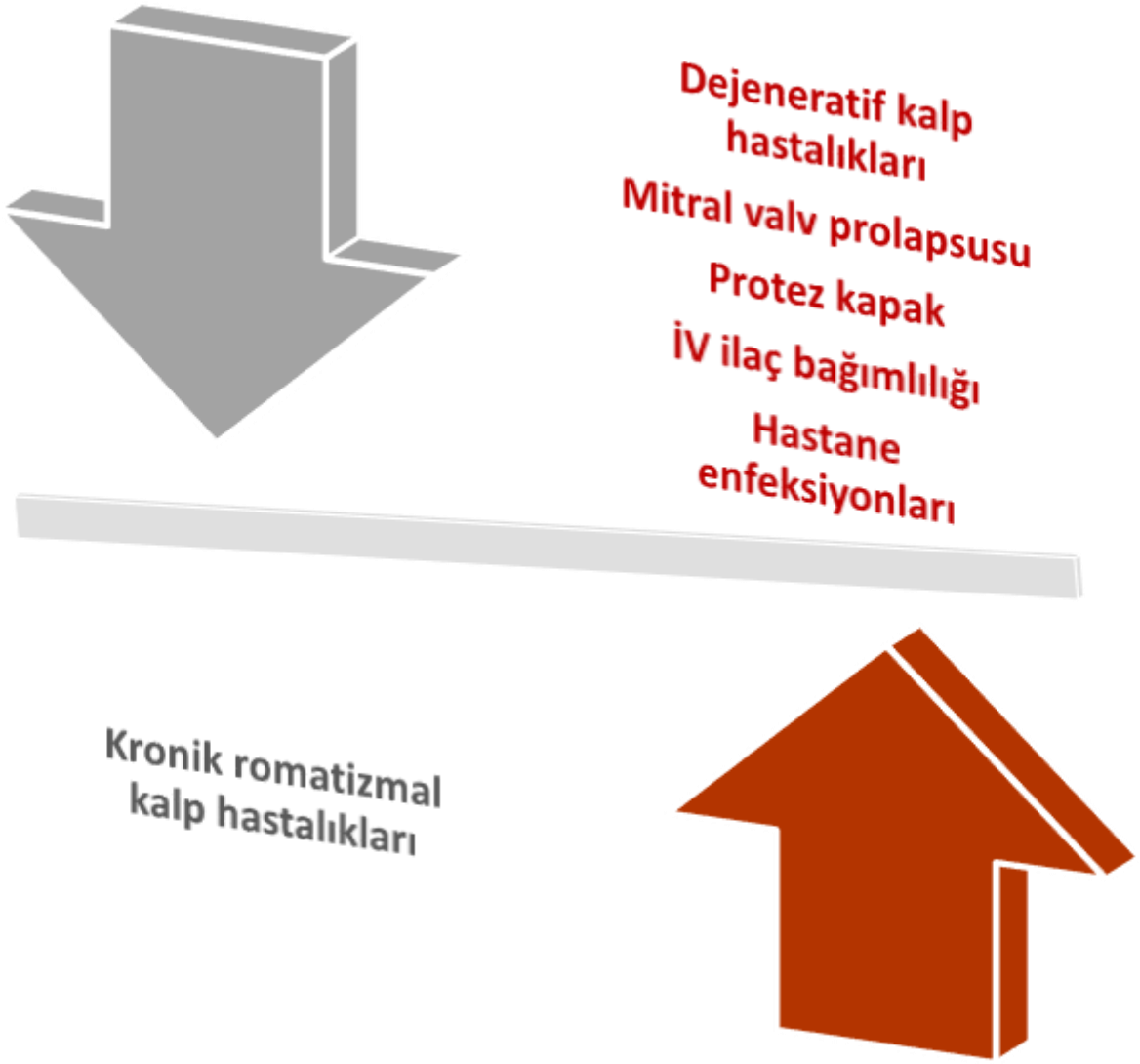
Tablo 1. Türkiye'de 1974-2017 Yılları Arasında İzlenmiş İnfektif Endokardit Olgularını İçeren Çalışmaların Özellikleri

Araştırmacılar	Dönem	Şehir	Olgu Sayısı	Yaş*	Erkek (%)	ARA (%)	Yapay Kapak (%)	IVDU (%)	CIED (%)	Diyaliz (%)	Stafilokok (%)	*Staphylococcus aureus* (%)	MRSA (%)	Streptokok (%)	Enterokok (%)	*Brucella* spp. (%)	Kan Kültürü Negatif (%)	Ameliyat (%)	Nozokomiyal (%)	Kesin İE† (%)	Mortalite (%)
Işık *et al.* (126)	1997-2001	İstanbul	14	41	70	61	23				24			24			54	100		70	
Küçükateş *et al.* (46)	2005-2010	İstanbul	22	47	55	55	41	0			36			27	9	9	50	100			18
Kaya *et al.* (47)	2005-2012	Şanlıurfa	24	41	50		13		4	8.3	21			17	4	33	21	37			8
İnanç *et al.* (49)	2006-2007	Kayseri	27	47	63	67	41				33	11		4	11	4	45	19			15
Çaylan *et al.* (48)	1997-2001	Trabzon	32	47	73		22				37	22		19	9		78	25			41
Zencir *et al.* (33)	2000-2015	Aydın	59	59	43		32					39						27		100	27
Tuğcu *et al.* (34)	2000-2007	İstanbul	68	51	59	40	56		3	12	41	28	4	25	1.5	0	21	59	28	84	25
Sucu *et al.* (35)	1997-2007	Gaziantep	72	45	57	36	29			3	27	10		23	4	4	36	28		100	15
Heper ve Yorukoglu (36)	1995-1999	Ankara	74	25	66	66	14				44	21		29	15	7	11				18
Cancan-Gursul *et al.* (32)	2006-2013	İzmir	80	51	70		12	0	22.5	7.5	49	27	2.5	20	17	12	51	56			15
Agca *et al.* (37)	2009-2014	Bursa	85	52	56	22	40		13		27	8	2	11	5	6	32	27		100	36
Taşbakan *et al.* (38)	2007-2017	İzmir	100	52	65		13	3	42.5			18		32	11		26				14
Erbay *et al.* (39)	2002-2008	Ankara	107	45	71		44										34				27
Akıl *et al.* (40)	2005-2012	Çok Merkezli	112	45	50	18	17	8		5.4	50	35		29	16		16	13		90	29
Şimşek-Yavuz *et al.* (50)	2015-2016	Çok Merkezli	112	55	70	12	33	4	8	13	31	15	3.5	22	8	1	29.5	56	35	77	28
Adademir *et al.* (41)	1997-2004	İstanbul	119	39	69	39	20		2		24	22	11	9	3	3	57	76		100	
Çay *et al.* (42)	2008-2011	Ankara	121	55	53	14	42		10	18	33	16		21	7	6	29	38		100	24
Turak *et al.* (43)	1997-2012	Ankara	157	59	55	15	42		9		30	13		22	7	6	29	39		100	26
Leblebicioğlu *et al.* (30)	2002-2012	Çok Merkezli	158	47	51	39	0				28		6	11	11	6	34	51			31
Özveren *et al.* (44)	1985-2011	İstanbul	174	39	79		15				15		2	29		6	47	100			16
Kocabaş *et al.* (45)	2009-2012	İzmir	194	48	66	22	12		3.1	6	30			16	6		43	52		100	20
Cetinkaya *et al.* (29)	1974-1999	Ankara	228	36	55	64	20	0	0.4		27	24		14	6	5.7	50	37	12	53	23
Elbey *et al.* (31)	2005-2012	Çok Merkezli	248	47	55	28	30		6		29	21	6	11	11	5	37.5	54		100	33
Şimşek-Yavuz *et al.* (4)	2004-2015	İstanbul	325	47	58	34	44	1	5.6	3	36	20	2	19	7	5	22	52	23	86	27
Toplam	1974-2017	Türkiye	2712	47	61	37	27	2	7	9	31	21	5	19	9	7	37	50	25	90	24

Şimşek Yavuz S. ve ark. İnfektif Endokardit Ulusal Uzlaşı Raporu. KLİMİK Derg 2019; 32(Suppl 1): 2-116

Risk Faktörleri

- Konjenital kalp hastalıkları
- Romatizmal ateş
- Majör dental tedaviler
- Açık kalp ameliyatı
- Genitoüriner müdahaleler
- Sosyal davranış değişiklikleri:
  - Piercing
  - Aşırı alkol tüketimi
  - İv ilaç bağımlılığı



Nadir Etkenler ↑↑↑(%2,5~31)

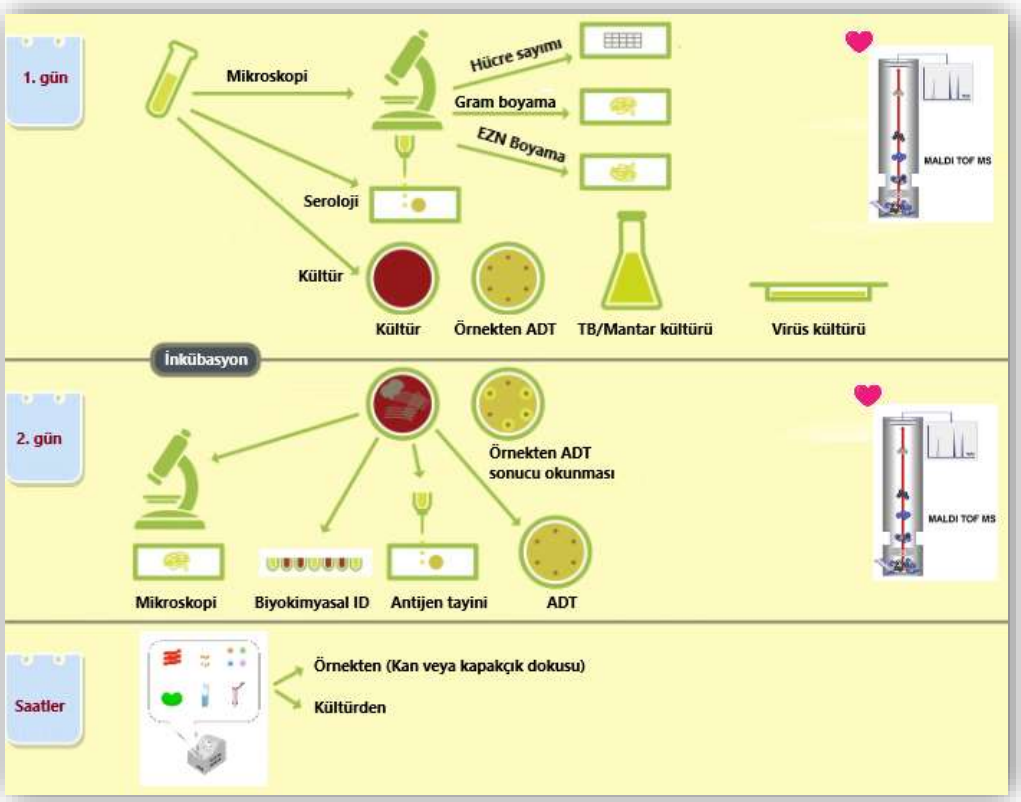
- *Coxiella burnetii* (%37)
- *Brucella spp.* (Bizde: %5-33)
- *Bartonella spp.* (%12)
- *Tropheryma whipplei* (%2-3)
- HACEK (%1-3)
- Mantarlar (%1-2)
  - *Candida* spp, *Histoplasma* spp., *Aspergillus* spp.
- Enterobacteriaceae
- *Chlamydia spp.* (<%1)
- *Mycoplasma spp.* (<%1)
- *Legionella spp.* (<%1)
- *Mycobacterium* spp. (<%1)
  - *M. chimaera* salgınları!!!!
- Nutrisyonel varyant streptokoklar
  - *Abiotrophia*, *Granulacitella*
- Aneroblar
  - *Cutibacterium acnes*

Tanı: Modifiye Duke Kriterleri (>1994-2000)

- **Patoloji kriterleri**
  - **Vejetasyon/intrakardiyak apse kültüründe mikroorganizma üremesi veya histolojik incelemede mikroorganizma/aktif endokardit bulguları olması**
- **Majör kriterler**
  - **Pozitif kan kültürleri [En az iki ayrı kan kültüründe endokardit etkeni tipik mikroorganizmaların üretilmesi/ İE uyumlu MO'ların sürekli üretilmesi]**
  - ***C. burnetii* tek şişe kültür pozitifliği veya seropozitifliği [anti-Faz I IgG titresi ≥1:800 olması]**
  - **Endokardiyal tutulum gösterilmesi**
- **Minör kriterler**
  - **Predispozan kalp hastalığı**
  - **>38 °C ateş**
  - **Vasküler olaylar**
  - **İmmünolojik olaylar**
  - **Mikrobiyolojik kanıt (kültür/seroloji)**
  - **Şüpheli ekokardiyografi**

Mikrobiyolojik Tanı İçin Elimizde Ne Var?

- Kültür
  - Kan kültürü
  - Kapakçık dokusu kültürü
- Seroloji
- Moleküler tanı
  - Kandan, kültürden, kapakçık dokusundan
  - Geniş menzilli, etkene özgül PZR
  - Prob hibridizasyon…



Kan Kültürü

%40-60 vakada POZİTİF

- **Tanıda altın standart**
- **ideali 24 SAAT içinde FARKLI VENLERDEN alınan ÜÇ SET**
  - **Önceki haftalarda antibiyotik kullanım öyküsü olan hastalarda daha fazla set!!!**
  - **Antibiyotik tedavisi başlamadan önce!!! (veya kesildikten 7-10 gün sonra!!!)**
  - **Her sette bir aerobik ve bir anaerobik şişe**
  - **Her şişede TAM 10 ml kan**
  - **Setler arasında özellikle beklemek gerekmez!!!**

*Prendergast BD. Heart 2006; 92: 879-885
**Liesman et al. J Clin Microbiol 2017; 55: 2599-2608
***Tattevin et al. Medecine et maladies infectieuses 2015; 45: 1-8

Kültür-negatif Endokardit (%2-40→%71)

- **Kültür alınmadan önce antibiyotik kullanımı (%50)**
- **Nazlı/zor üreyen/üreme için özel gereksinimleri olan/üretilemeyen mikroorganizmalarla enfeksiyon (%20)**
  - ***Coxiella burnetii* (%28-37), *Bartonella* spp. (%12-28), *Tropheryma whipplei* (%6)**
  - ***Chlamydia/Chlamydophila* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp. (çok nadir)**
  - ***Brucella* spp. (%5-33), *Neisseria* spp., *Nocardia* spp., *Mycobacterium* spp. (çok çok nadir)**
  - **HACEK, Nutrisyonel varyant streptokoklar, Anaeroblar (*C. acnes*), Mantarlar**

Kültür-negatif Endokardit (%2-40→%71)

- **Kana az sayıda mikroorganizma karışması**
- **Pre-analitik/Analitik hatalar:**
  - **Yanlış zamanlama/ yetersiz hacimde kan/ yetersiz sayıda kültür/ sette yetersiz şişe/ uygun olmayan transport şartları/ yetersiz inkübasyon/uygun pasaj yapılmaması/ yetersiz tanımlama…**
- **Non-infeksiyöz endokardit**
  - **Neoplastik, otoimmün, alerjik (%3)**

Mikrobiyolojik Tanı Neden Önemli?

- **Tedavinin doğru yönlendirilmesinde mikrobiyolojik tanı önemli!!!**
- **Mikrobiyolojik tanı olmadığında/geciktiğinde morbidite ve mortalite ↑**
  - **%52,4 vs %19,6 ($p<0,05$)***
- **Kültür-negatif İE hastalarının ~1/3'ü tanı konduktan sonraki yıl içinde ex!**

Murashita et al. Eur J Cardiothorac Surg 2004; 26: 1104-1111.

Kültür-negatif Endokarditte Tanı

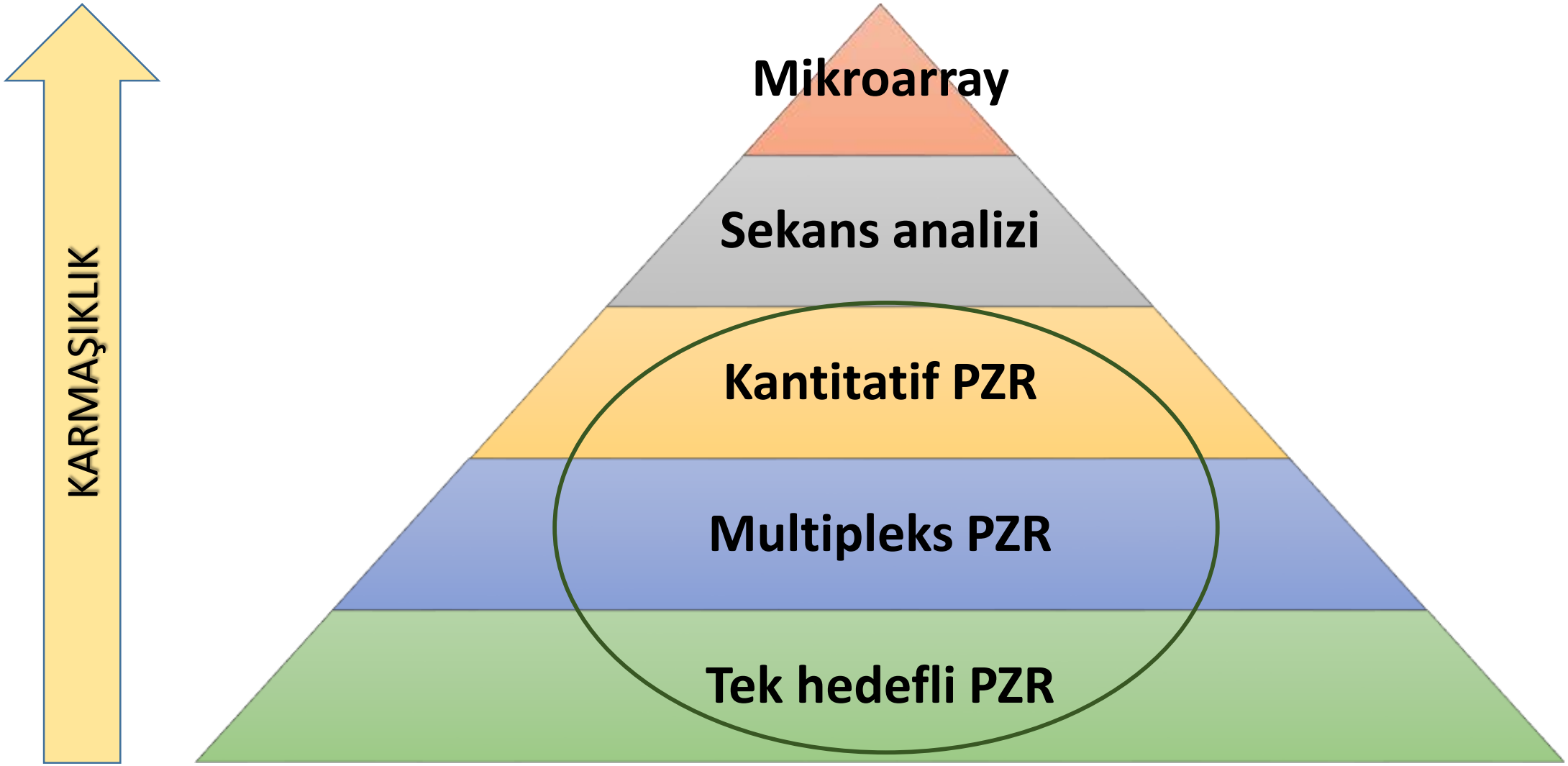
- SEROLOJİ
  - *Coxiella burnetii, Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Aspergillus* spp.
  - *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia/Chlamydophila* spp.→ Kanıt YOK
- **MOLEKÜLER TESTLER**
  - **Kandan/kan kültüründen/kapakçık dokusundan çalışılabilir**
  - **PZR (16S rDNA analizi veya etkene özgül konvansiyonel veya gerçek zamanlı PZR analizi)**
- HİSTOPATOLOJİK İNCELEME
  - Kapakçık dokusundan

Moleküler Testler

- Endokardit şüpheli hastada rutin kan kültürleri/seroloji ile sonuç alınamadığında MOLEKÜLER YÖNTEMLER güvenilir tanı sağlar
  - Özellikle antibiyotik tedavisi alanlarda ve nazlı üreyen organizmaların tanımlanmasında
- Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek
- Tespit sınırı ~1-10 kopya
- Kandan/ kapakçık dokusundan (taze/frozen/parafin blok)/ kültürden/ vejetasyonlardan/ trombüsten/ emboli dokusundan çalışılabilir
- Geniş menzilli PZR + sekans analizi veya organizmaya özgül PZR
  - Kapakçık dokusunda organizmaya özgül PZR duyarlılığı > geniş menzilli PZR

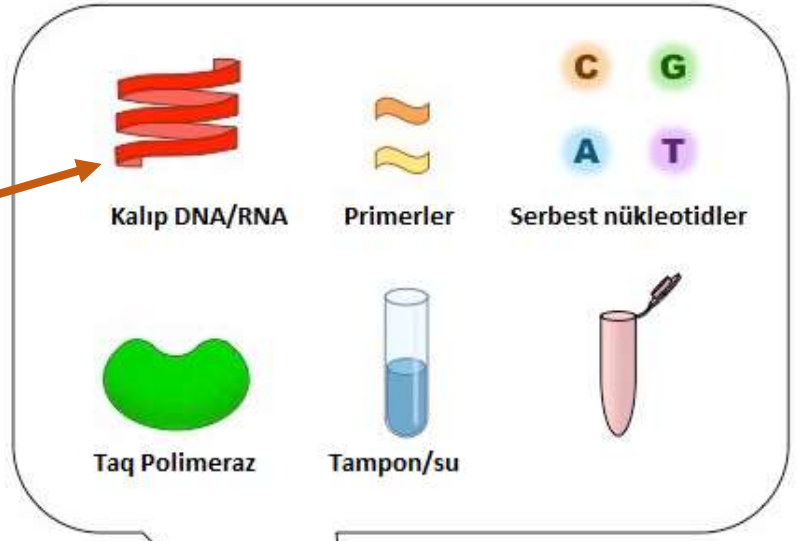
Liesman et al. J Clin Microbiol 2017; 55: 2599-2608
Millar et al. Heart 2016; 102: 796-807

Moleküler Testler

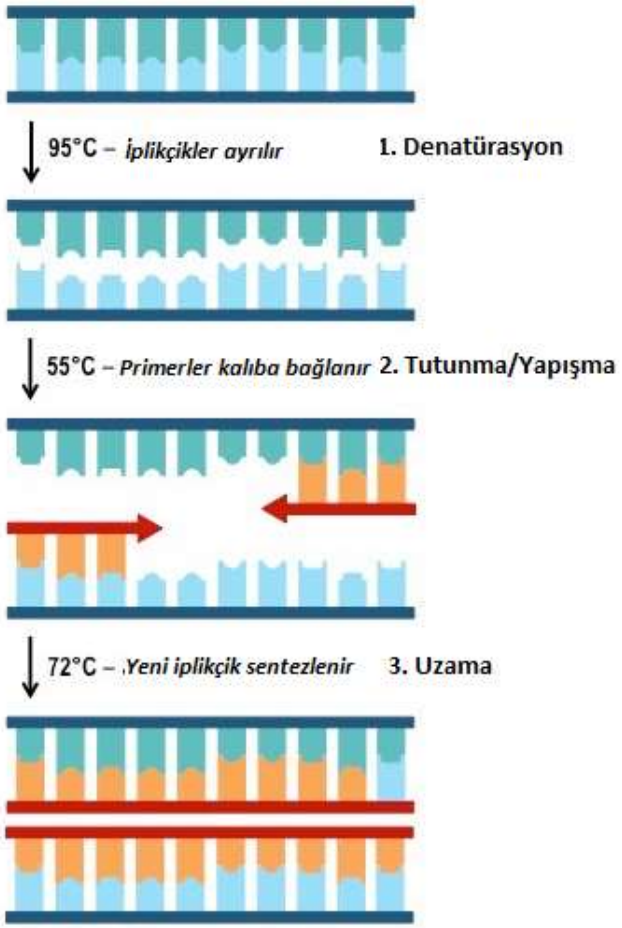


PZR

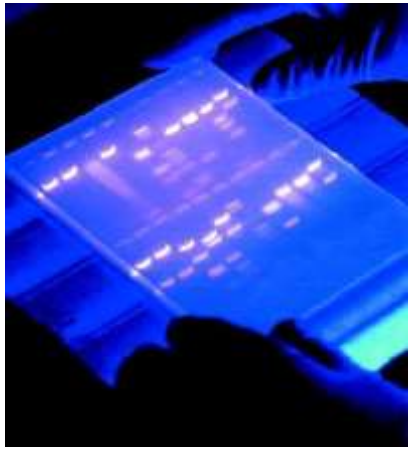
Nükleik asit ekstraksiyonu



PZR döngüsü

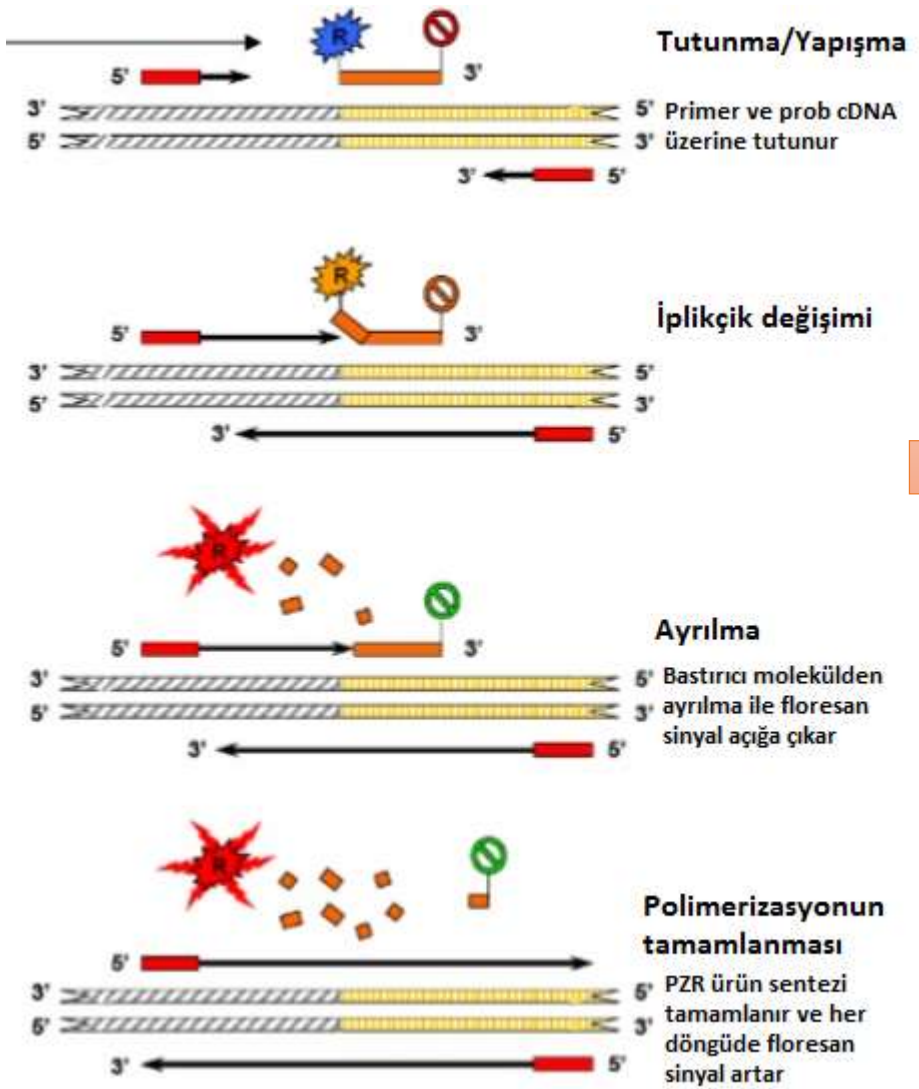


Jel Elektroforezi

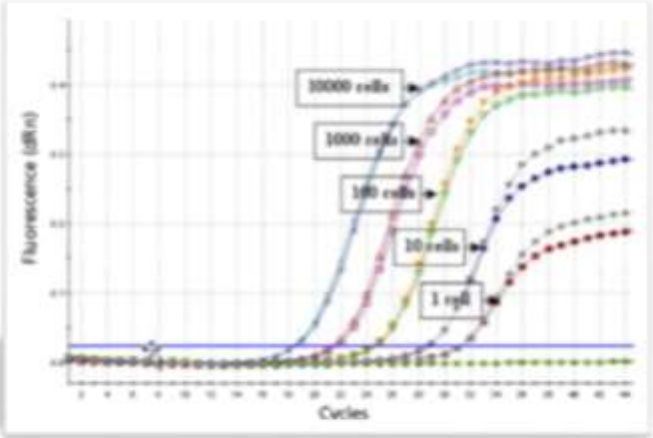


SÜRE: 4-6 saat

Gerçek Zamanlı (Kantitatif) PZR



C_T is inversely related to the number of target bacteria.



Cycle threshold (C_T) is the number of PCR cycles for the fluorescent signal to reach a threshold value.

SÜRE: 1-4 saat

Sekans Analizi

PZR

Ürün saflaştırma

"Cycle sequencing"

Ürün saflaştırma

Sekans analizi

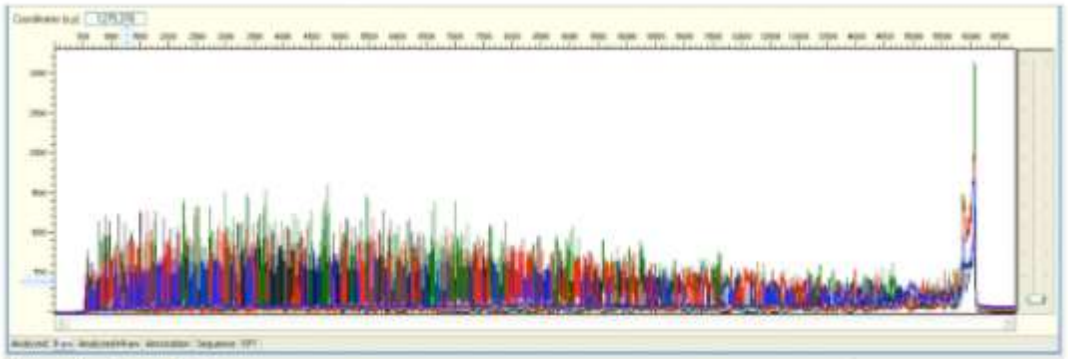


Figure 1: Raw Data

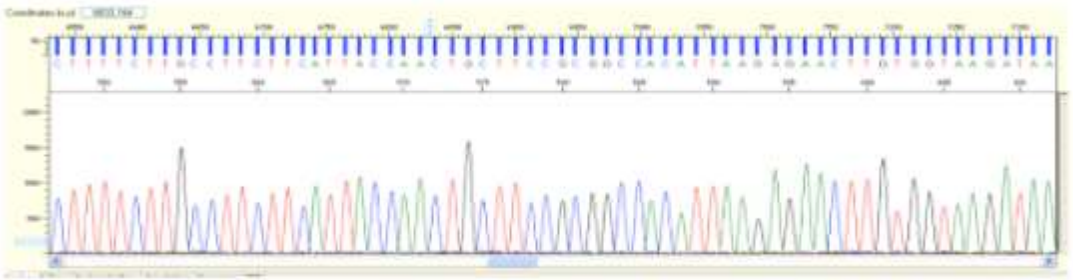
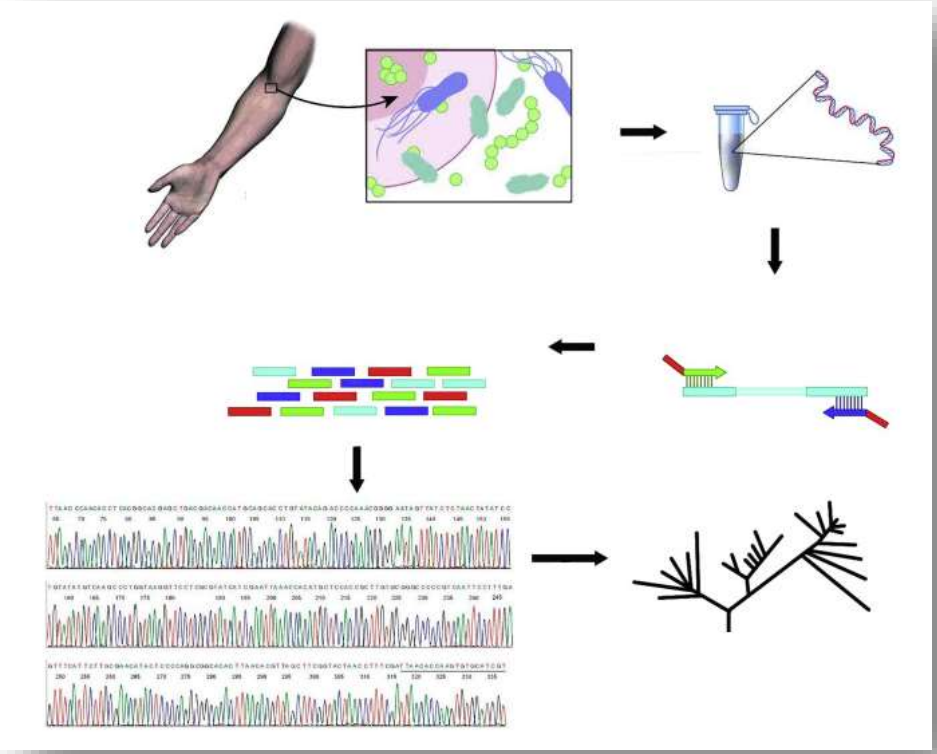


Figure 2: Analysed data

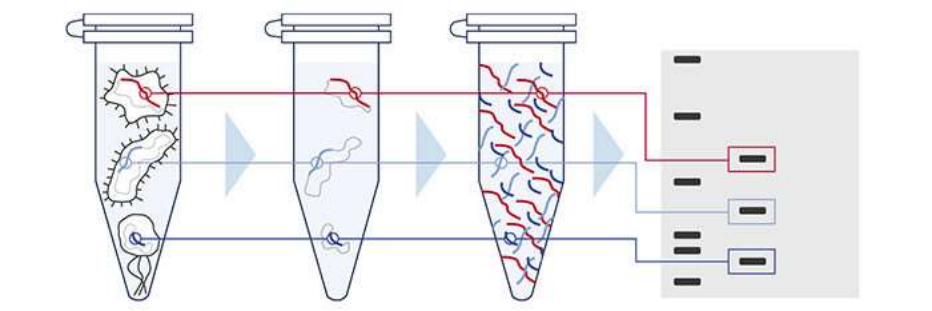
SÜRE: 12-24 saat

Endokarditte Moleküler Tanı

- **Geniş menzilli PZR + sekans analizi**
  - **16S rDNA, 23S rDNA, 16S-23S IS, *rpoB*, ITS-18S rDNA, 28S rRNA, 5.8S rRNA**
    - **Korunmuş bölgelerle sınırlı → Universal primerler kullanılabilir**
    - **Yeterince dizi çeşitliliğine sahip → Tür düzeyinde ayırıcı tanı yapmak mümkün**
    - **GenBank üzerinde erişime açık geniş bir sekans veri tabanı mevcut**



- **Organizmaya özgül PZR**
  - ***C. burnetii*, *Bartonella* spp., *T. whipplei***



Geniş menzilli PZR? Organizmaya özgül PZR?

Geniş menzilli PZR + sekans analizi

- **Bakteri: 16S rDNA**
  - **Kapakçık dokusunda duyarlılık > kan**
    - **Kapakçık duyarlılık %41-96, özgüllük %95-100**
    - **Kan duyarlılık %14, özgüllük %77-100**
- **Mantar: 18S rDNA, ITS bölgesi**
  - **Özgüllük %13 (tespit edilen mantarların yaklaşık %50'si kontaminant!!!)**

Organizmaya özgül PZR

- **Kanda duyarlılığı>geniş menzilli PZR**
- **Kapakçık dokusunda duyarlılık >kan**
  - ***C. burnetii***
  - ***Bartonella* spp.**
  - ***T. whipplei***
  - ***Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., *Brucella* spp., *C. acnes*, …**

Kan mı? Kapakçık dokusu mı?

Prospektif tanı

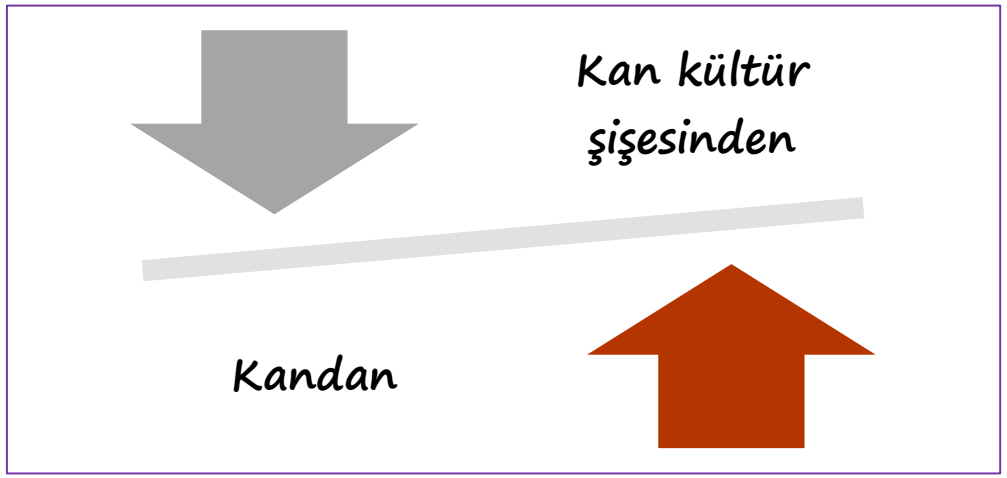
Duyarlılık ve özgüllük<kapakçık

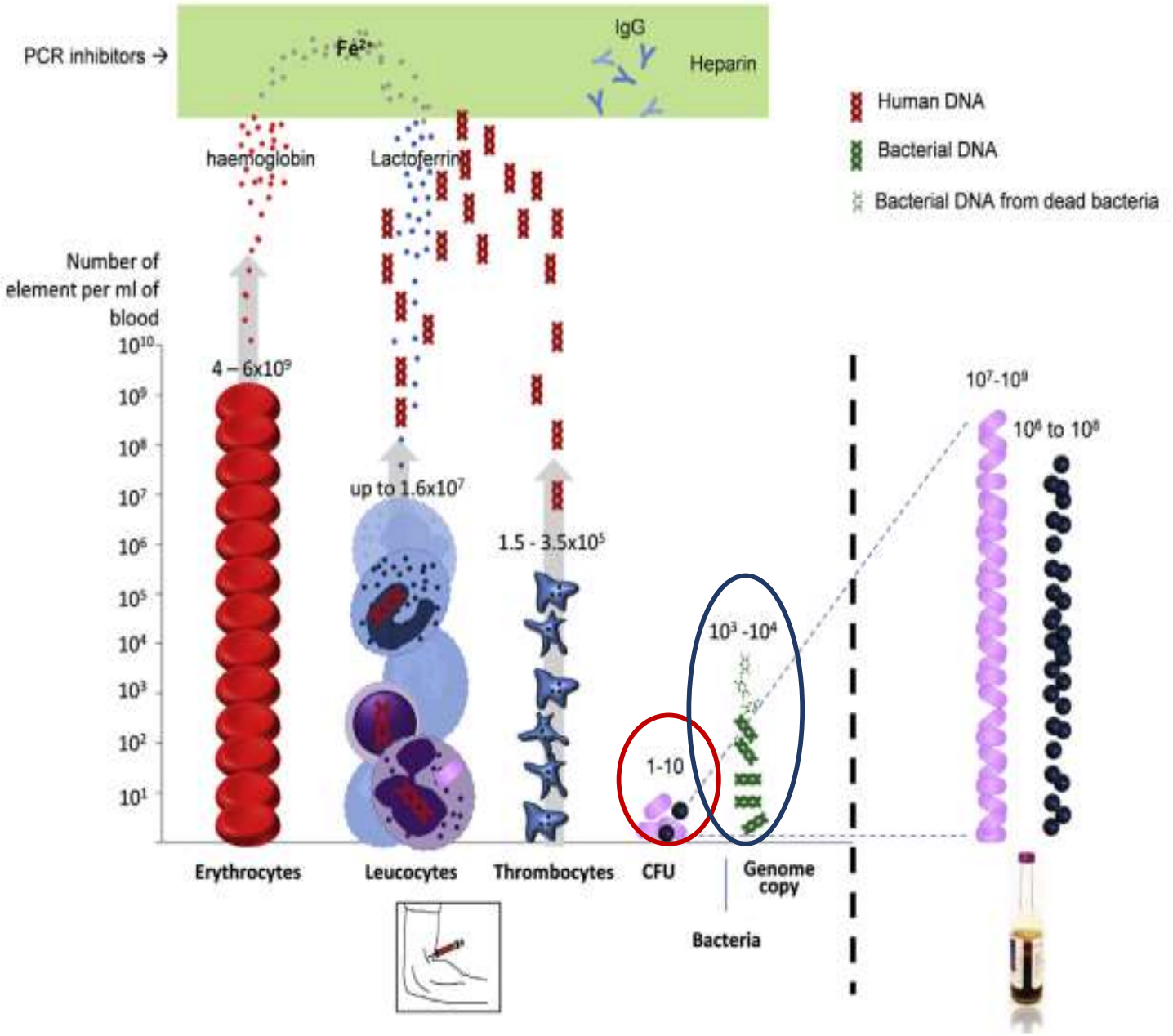
Retrospektif tanı

Duyarlılık ve özgüllük>kan

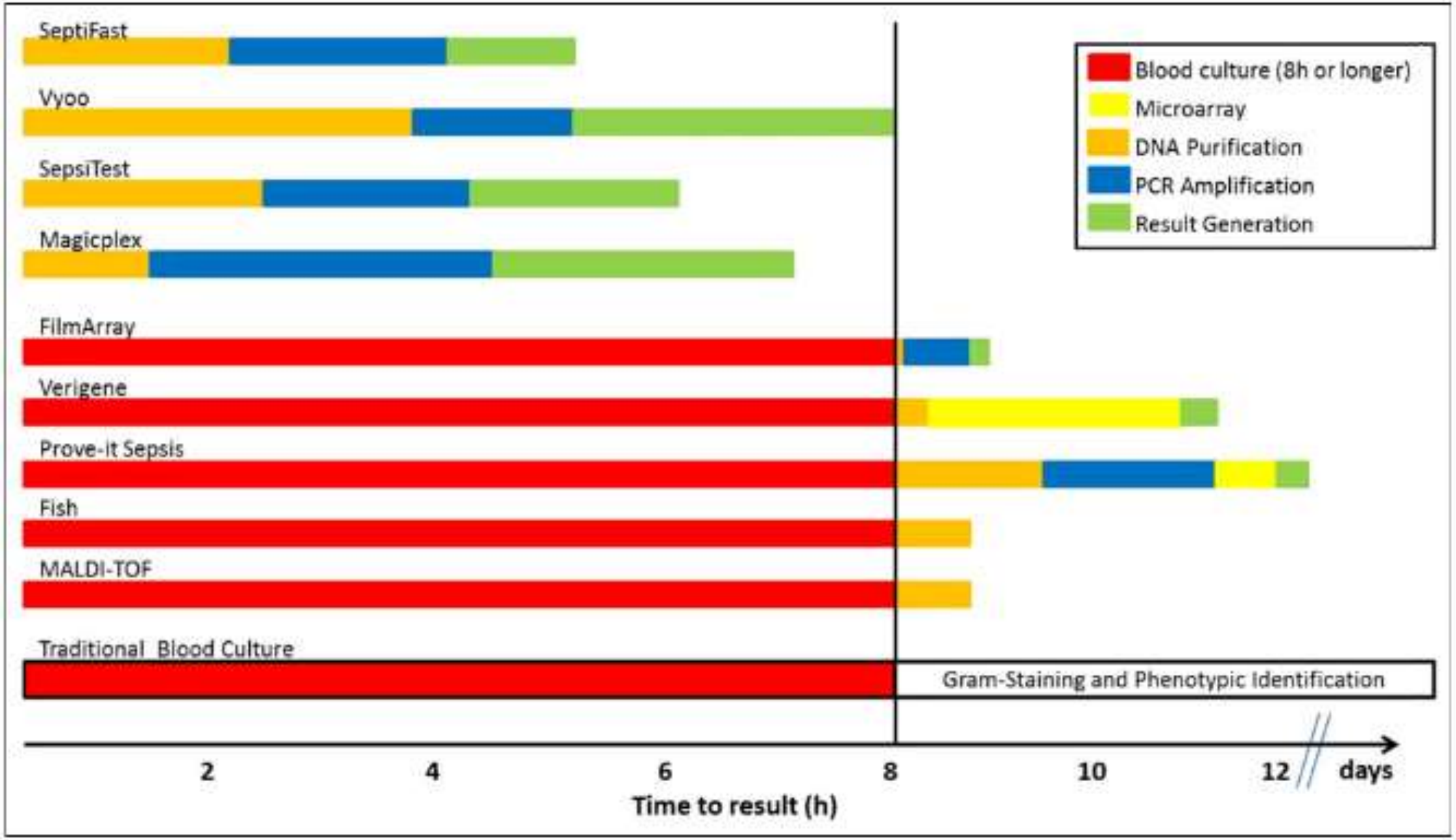
Kandan Direkt Tanı

- «In-house» PZR
- Ticari yöntemler
  - Hedefler???





Opota et al. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 323–331



Eur J Microbiol Immunol 2014; 1: 1-25

LightCycler® SeptiFast Test MGRADE (CE-IVD)

LightCycler® Septi*Fast* Test MGRADE (CE-IVD)

LightCycler® Septi*Fast* Test MGRADE, kana karışmış patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların (Sepsis) hızlı, güvenilir ve erken tanısına imkan veren bir testtir. Sepsisin etkin tedavisi ancak sebep olan patojenin erken ve kesin identifikasyonu ile mümkündür. Günümüz koşullarında kullanılan kültür yöntemleri hem geç hem de çoğunlukla Negatif sonuç verdikleri için özellikle kritik hastaların tedavisinde uygun ve erken tedaviye yönlendirmekte yetersiz kalabilmektedir.

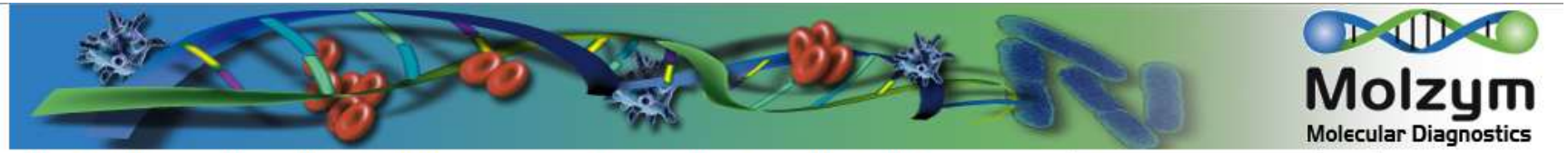
Patojenlerin LightCycler® Septi*Fast* Test MGRADE testi ile 6 saat içerisinde tesbit edilebilmesi, bakteriemi/fungeminin hızlı ve erken tanısının konmasına yardımcı olur, erken dönemde uygun antibiyotik tedavisine geçilmesini sağlar ve gereksiz geniş spektrumlu antibiyotik kullanımını engellemiş olur.

LightCycler® Septi*Fast* Test MGRADE testi, hastane kaynaklı Sepsise sebep olan ve en sık görülen 25 patojeni 6 saatten kısa sure içerisinde sadece 1,5ml K-EDTA kandan tesbit etmektedir.

Gram (-)	Gram (+)	Fungi
• *Escherichia coli*	• *Staphylococcus aureus*	• *Candida albicans*
• *Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)*	• CoNS (Coagulase negative *Staphylococci)**	• *Candida tropicalis*
• *Serratia marcescens*	• *Streptococcus pneumoniae*	• *Candida parapsilosis*
• *Enterobacter (cloacae / aerogenes)*	• *Streptococcus spp.***	• *Candida krusei*
• *Proteus mirabilis*	• *Enterococcus faecium*	• *Candida glabrata*
• *Pseudomonas aeruginosa*	• *Enterococcus faecalis*	• *Aspergillus fumigatus*
• *Acinetobacter baumannii*		
• *Stenotrophomonas maltophilia*		

**S. epidermidis, S. haemolyticus* ***S. pyogenes, S. agalactiae, S. mitis*

LightCycler® SeptiFast Test MGRADE



Molzym
Molecular Diagnostics

▸ Products

Molecular Diagnosis

Whole Blood

Sepsis

Mycobacteraemia

Body Fluids/Swabs/Tissues

Universal Microbe Detection

Microbe Differentiation

Automated Molecular Diagnosis

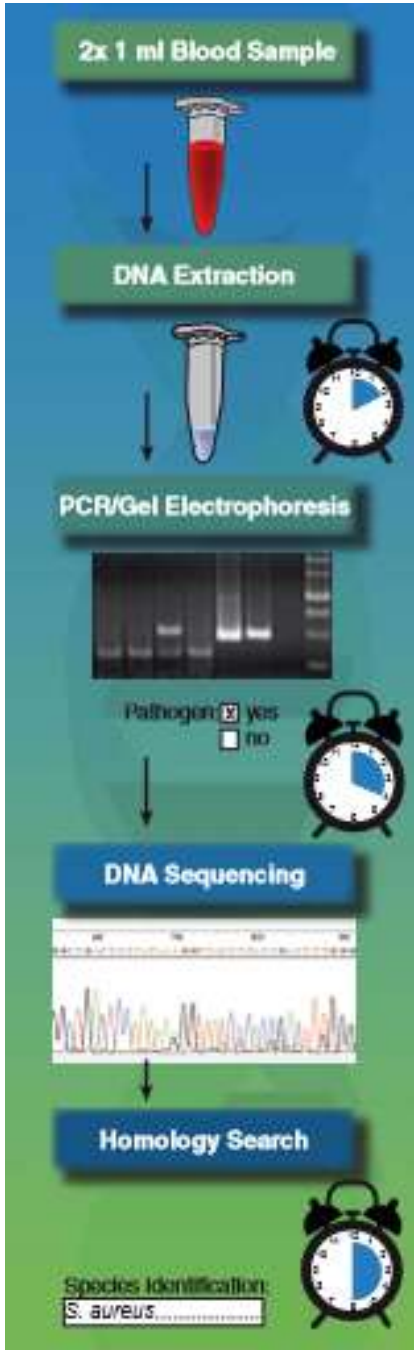
Sample Storage

Technology and References

Sepsis-causing strains among the >345 microorganisms detectable by SepsiTest™ *

Bacteria						Yeasts
Gram-negative	Species	Gram-negative	Species	Gram-positive	Species	
Achromobacter	1	*Methylobacterium*	1	*Actinomyces*	1	*Candida albicans*
Acinetobacter	5	*Moraxella*	2	*Aerococcus*	1	*Candida glabrata*
Actinobacillus	2	*Morganella*	1	*Arthrobacter*	1	*Candida krusei*
Aeromonas	7	*Neisseria*	2	*Bacillus*	20	*Candida parapsilosis*
Aggregatibacter	3	*Ochrobactrum*	2	*Clostridium*	2	*Candida tropicalis*
Alcaligenes	2	*Pantoea*	2	*Corynebacterium*	2	*Cryptococcus neoformans*
Alteromonas	1	*Pasteurella*	1	*Enterococcus*	7	
Anaplasma	1	*Photobacterium*	1	*Erysipelothrix*	1	
Bacteroides	2	*Plesiomonas*	1	*Exiguobacterium*	1	
Bifidobacterium	9	*Proteus*	2	*Geobacillus*	2	
Brevibacterium	1	*Pseudomonas*	18	*Frankia*	1	
Brevundimonas	2	*Rahnella*	1	*Kocuria*	1	
Burkholderia	6	*Ralstonia*	3	*Lactobacillus*	28	
Butyrivibrio	1	*Riemerella*	1	*Lactococcus*	3	
Campylobacter	2	*Salmonella*	2	*Leifsonia*	1	
Chlamydophila	2	*Serratia*	4	*Leuconostoc*	2	
Citrobacter	1	*Shewanella*	3	*Microbacterium*	2	
Comamonas	1	*Sphingomonas*	1	*Micrococcus*	1	
Delftia	1	*Stenotrophomonas*	1	*Mycobacterium*	10	
Ehrlichia	2	*Vibrio*	7	*Nocardia*	3	
Enterobacter	6	*Xanthomonas*	1	*Paenibacillus*	3	
Escherichia	1	*Yersinia*	2	*Pediococcus*	2	
Flavobacterium	3			*Propionibacterium*	1	
Haemophilus	4			*Rhodococcus*	3	
Hafnia	1			*Staphylococcus*	19	
Helicobacter	1			*Streptococcus*	6	
Klebsiella	2			*Streptomyces*	2	
Leptospira	5			*Weissella*	2	
Megasphaera	1	**Sum:**	**114**	**Sum:**	**128**	

* the complete list of species is available on request



BIOMÉRIEUX

YOUR CHALLENGES | SOLUTIONS | PRODUCTS | RESOURCES | ABOUT US

Home › FilmArray® multiplex PCR system

ALL PRODUCTS FOR: Antimicrobial Resistance Management Bacteria FilmArray Fungi GI pathogens Sepsis Management Bacterial infections Molecular diagnostics Multiplex testing Real-time amplification Centralized testing Fungal infections GI infections Sepsis

FilmArray® multiplex PCR system

Multiplex PCR system for fast, easy and comprehensive testing

The FilmArray® system is an FDA, CE-IVD, and TGA certified multiplex PCR system that integrates sample preparation, amplification, detection and analysis.

- **Simple**: 2 minutes of hands-on time
- **Easy**: No precise measuring or pipetting required
- **Fast**: Turnaround time of about an hour
- **Comprehensive**: Tests for a variety of pathogens that cause respiratory, bloodstream, gastrointestinal infections and meningitis-encephalitis as well antimicrobial resistance genes

For In-vitro Diagnostic Use

27 Targets — Simultaneous Identification of 27 Targets

The FilmArray Blood Culture Identification (BCID) Panel tests for a comprehensive list of 24 pathogens and 3 antibiotic resistance genes. The FilmArray instrument integrates sample preparation, amplification, detection and analysis into one simple system that requires two minutes of hands-on time and has a total run time of about an hour.

Simple: 2 minutes of hands-on time

Easy: No precise measuring or pipetting required

Fast: Turnaround time of about 1 hour

Comprehensive: 27 target BCID Panel

FilmArray® Blood Culture Identification Panel

1 Test. 27 Targets. All in about an hour.

Gram-Positive Bacteria

Enterococcus
Listeria monocytogenes
Staphylococcus
Staphylococcus aureus
Streptococcus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

Gram-Negative Bacteria

Acinetobacter baumannii
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacteriaceae
Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae
Proteus
Serratia marcescens

Yeast

Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis

Antibiotic Resistance Genes

mecA – methicillin resistant
vanA/B – vancomycin resistant
KPC – carbapenem resistant

Kapakçık Dokusunun İncelenmesi

- HİSTOPATOLOJİK İNCELEME
- KÜLTÜR
  - Duyarlılık (%8-33) ve özgüllüğü (%56-94) düşük
  - Vakaların %6-26'sında pozitif
  - Yalancı pozitiflik (kontaminasyon) oranları çok yüksek (%28-36)
  - Endokardit şüphesi haricinde kapakçık kültürü YAPILMAMALI!!!
  - Mümkünse KÜLTÜR yerine MOLEKÜLER testlere öncelik verilmeli!!!
  - Kan kültürü ile uyumsuz sonuçlarda KAN KÜLTÜRÜ sonuçları dikkate alınmalı!
- MOLEKÜLER İNCELEME

Moleküler Tanı~Avantajlar

- Hızlı sonuç
- Güvenilir tanı
  - Yüksek duyarlılık (%96-100)
  - Yüksek özgüllük (%95-100)
- Kandan/kültürden/dokudan çalışabilme
- Kültürü yapılamayan/zor yapılan organizmaları tanımlama

Table 2 The validity of PCR and real-time PCR methods were investigated in the studies.

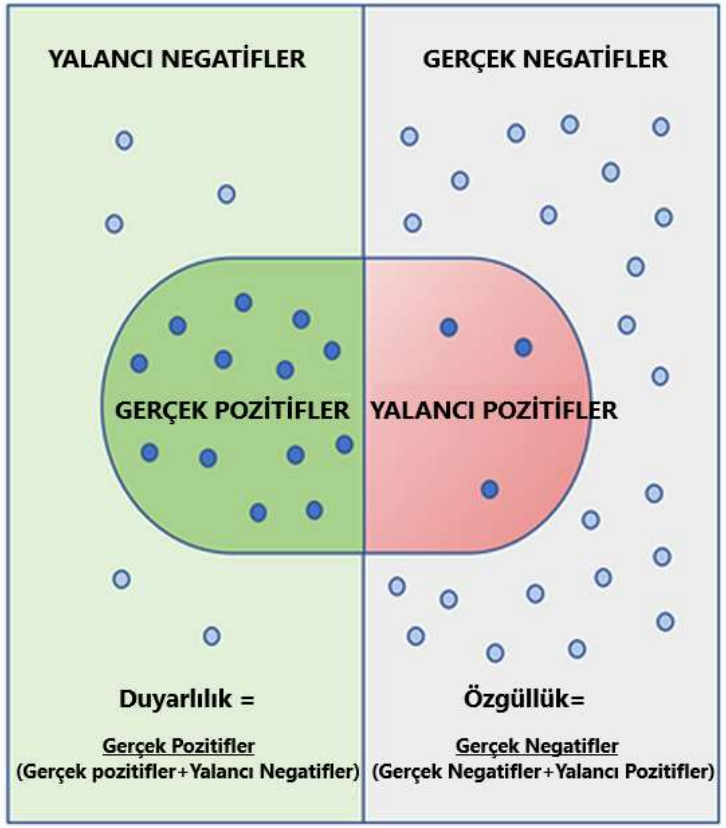
Author/Year	Validity test				n values
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	
Marín [36] 2007	96%	95.3%	98.4%	88.5%	177
Vollmer [35] 2010	80.6%	100%	100%	71%	357
Kuhn [44] 2011	85%	–	–	–	30
Harris [40] 2014	67%	91%	96%	46%	169
Miller [41] 2016	92%	77.8%	92%	77.8%	68
Vondracek [45] 2009	81%	100%	–	–	57
Voldstedlund [46] 2005	72%	100%	–	–	74
Bosshard [25] 2001	82.6%	100%	100%	76.5%	63
Breitkopf [39] 2004	41.2%	100%	100%	34.8%	52
Guern [47] 2014	72.7%	94.7%	–	–	82
El-Kholy [48] 2010	88.3%	92%	79.1%	95.8%	156
Greub [49] 2002	61%	100%	100%	74%	245

PPV = positive predictive value.
NPV = negative predictive value.

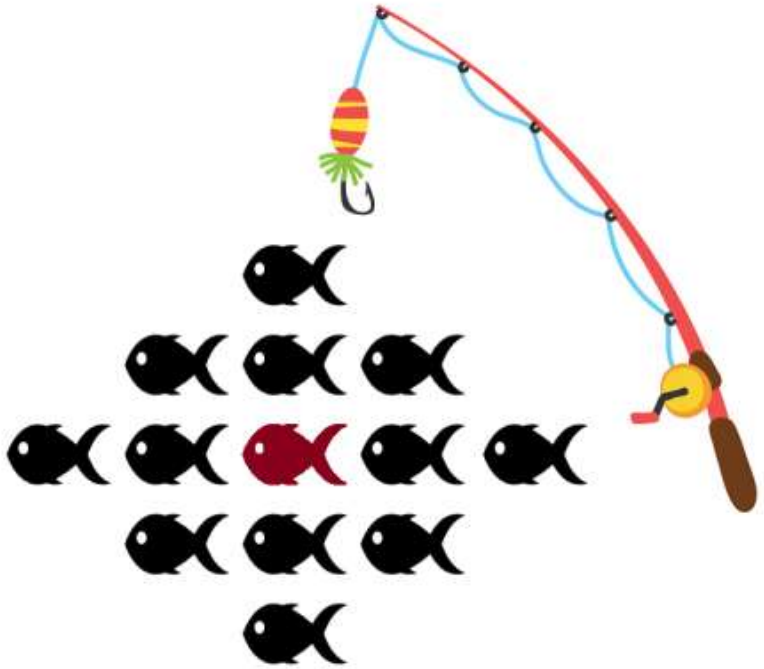
Faraji et al. Kaohsiung J Med Sci 2018; 34: 71-78.

Moleküler Tanı~Dezavantajlar

- Standardize DEĞİL
- Yalancı pozitiflik (kontaminasyon!)
- Yalancı negatiflik (inhibitörler!)
- Canlı/ölü mikroorganizma ayrımının yapılamaması
- Etken/kontaminasyon ayrımının yapılamaması
- Antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilememesi*
- Özel donanım ve eğitimli personel gerekmesi
- Yüksek maliyet



Yalancı Pozitiflik Nedenleri

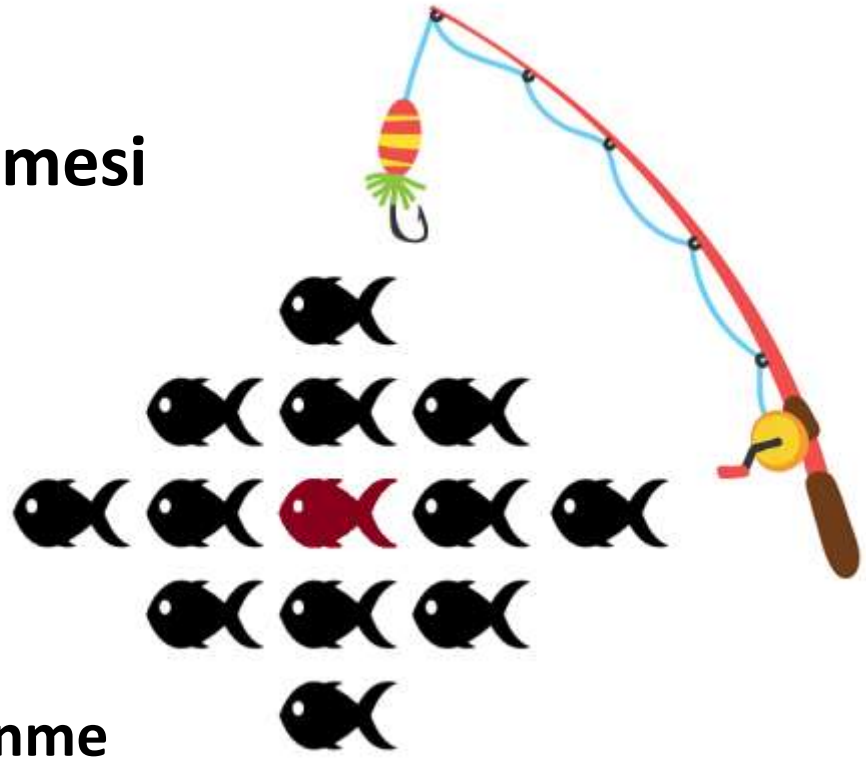


- **Kontaminasyon**
  - **Flora ile**
  - **Çevresel**
- **Ölü bakteriler**
  - **Kapakçık dokusunda bakteriyel DNA varlığının aylar/yıllar sebat etmesi**
    - ***S. pneumoniae* → 7 yıl; *C. burnetii* → 16 yıl**
  - **Histolojik bulgusu olmayan dokuların %23'ünde PZR pozitif**
  - **Özellikle antibiyotik tedavisi alanlarda sık!**

Millar et al. Heart 2016; 102: 796-807

Yalancı Negatiflik Nedenleri

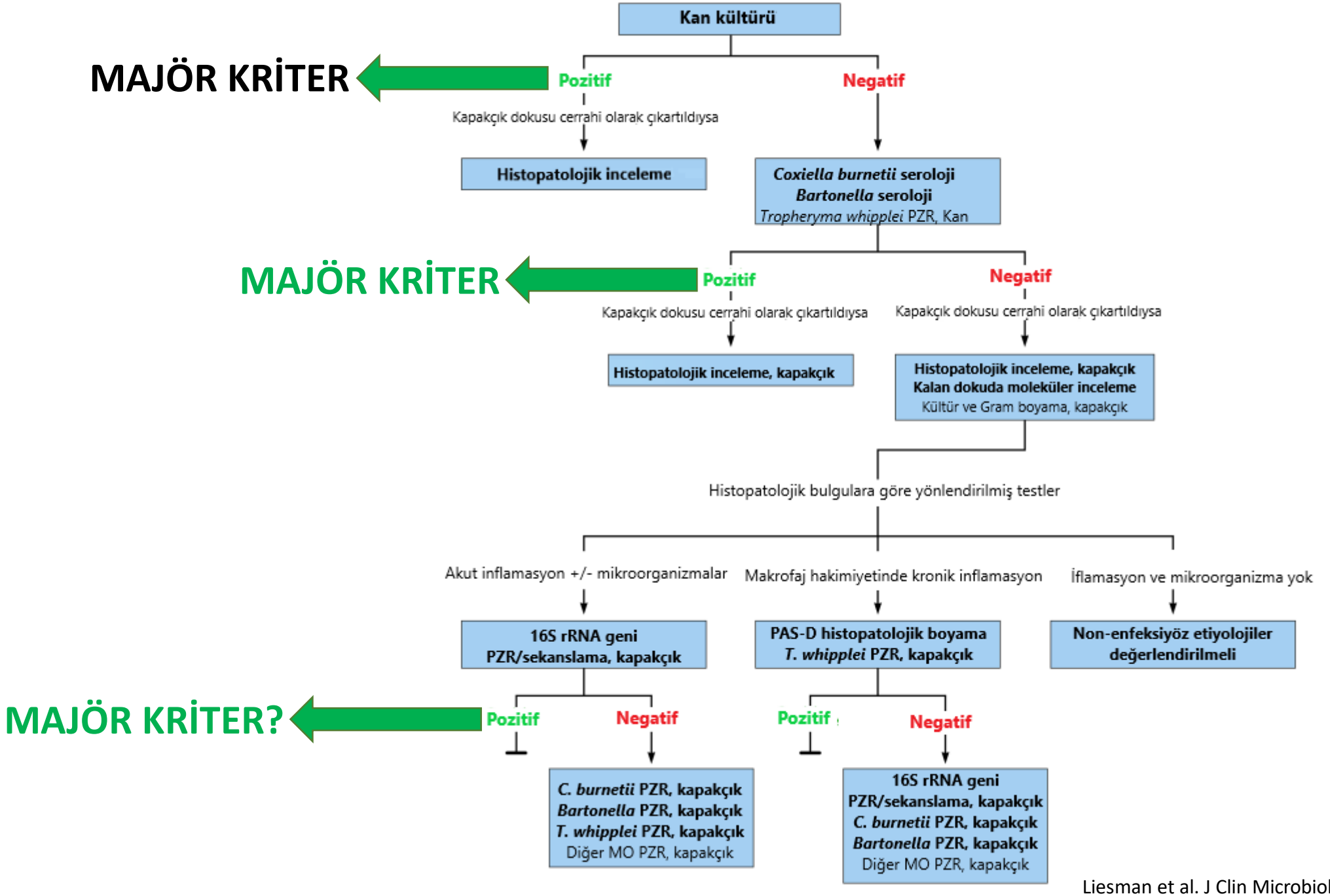
- PZR için uygun kapakçık kısmının örneklenmemesi
- PZR inhibitörleri
- Teknik hatalar
  - Ekstraksiyon sorunları/DNA'nın düşük kalitede olması/diğer bakteriler ve ökaryotik DNA ile kirlenme
  - PZR komponenetleri/şartlarının uygun olmaması
  - Jel elektroforezi hataları



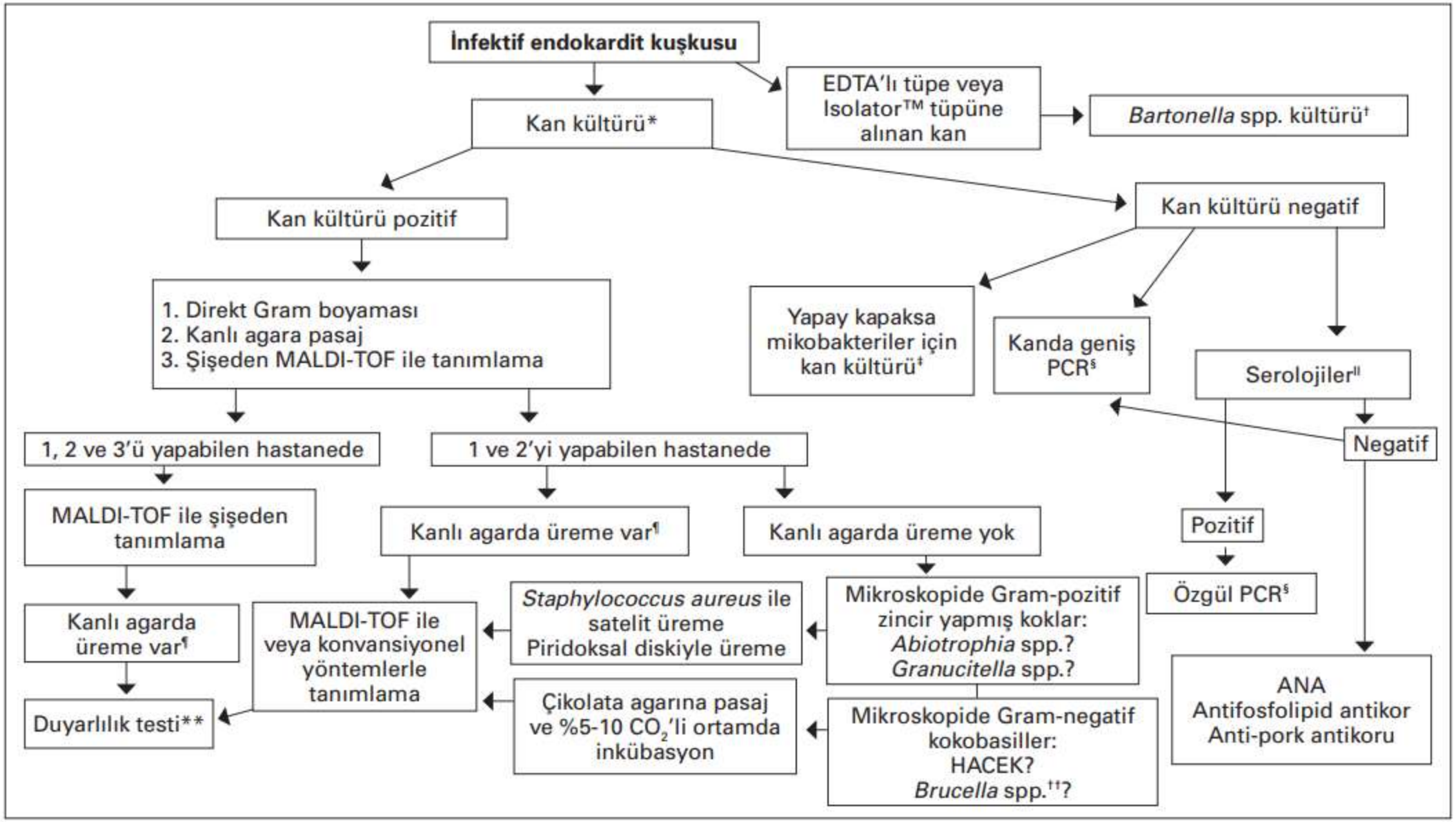
Duke Kriterlerine Eklenmesi Önerilen Parametreler

- **Mikrobiyolojik:**
  - **Seroloji:**
    - ***Bartonella* spp. seroloji pozitifliği**
    - ***Chlamydia* spp. seroloji pozitifliği**
  - **Moleküler:**
    - **Kan veya kapakçıkta bakteriyel veya fungal DNA varlığı (majör kriter)**
- **Biyokimyasal:**
  - **CRP > 100 mg/L**
  - **ESR'nin normalin ≥1,5 katı olması**
    - **<60 y için >30 mm/sa**
    - **>60 y için >50 mm/sa**

(Millar & Moore. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1110-1116)



Liesman et al. J Clin Microbiol 2017; 55: 2599-2608

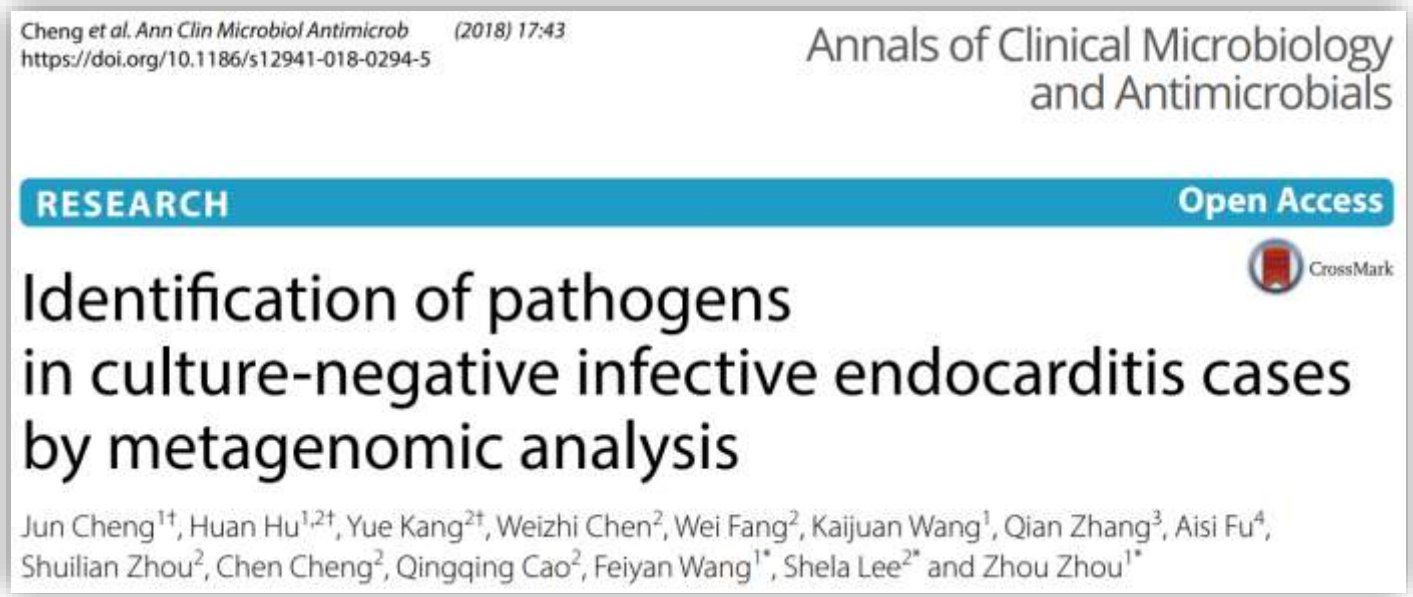


Şekil 4. İnfektif endokarditli hastada etkenin belirlenmesi için yapılacak mikrobiyolojik incelemeler için akış şeması.

Şimşek Yavuz S. ve ark. İnfektif Endokardit Ulusal Uzlaşı Raporu. KLİMİK Derg 2019; 32(Suppl 1): 2-116

Gelecek…

- Yeni yöntemler…
- Kandan direkt tanı…
- Daha az örnekten tanı…
- Daha hızlı tanı…
- Universal hedefler…
- Standardizasyon…



Cheng et al. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2018) 17:43
https://doi.org/10.1186/s12941-018-0294-5

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials

RESEARCH Open Access

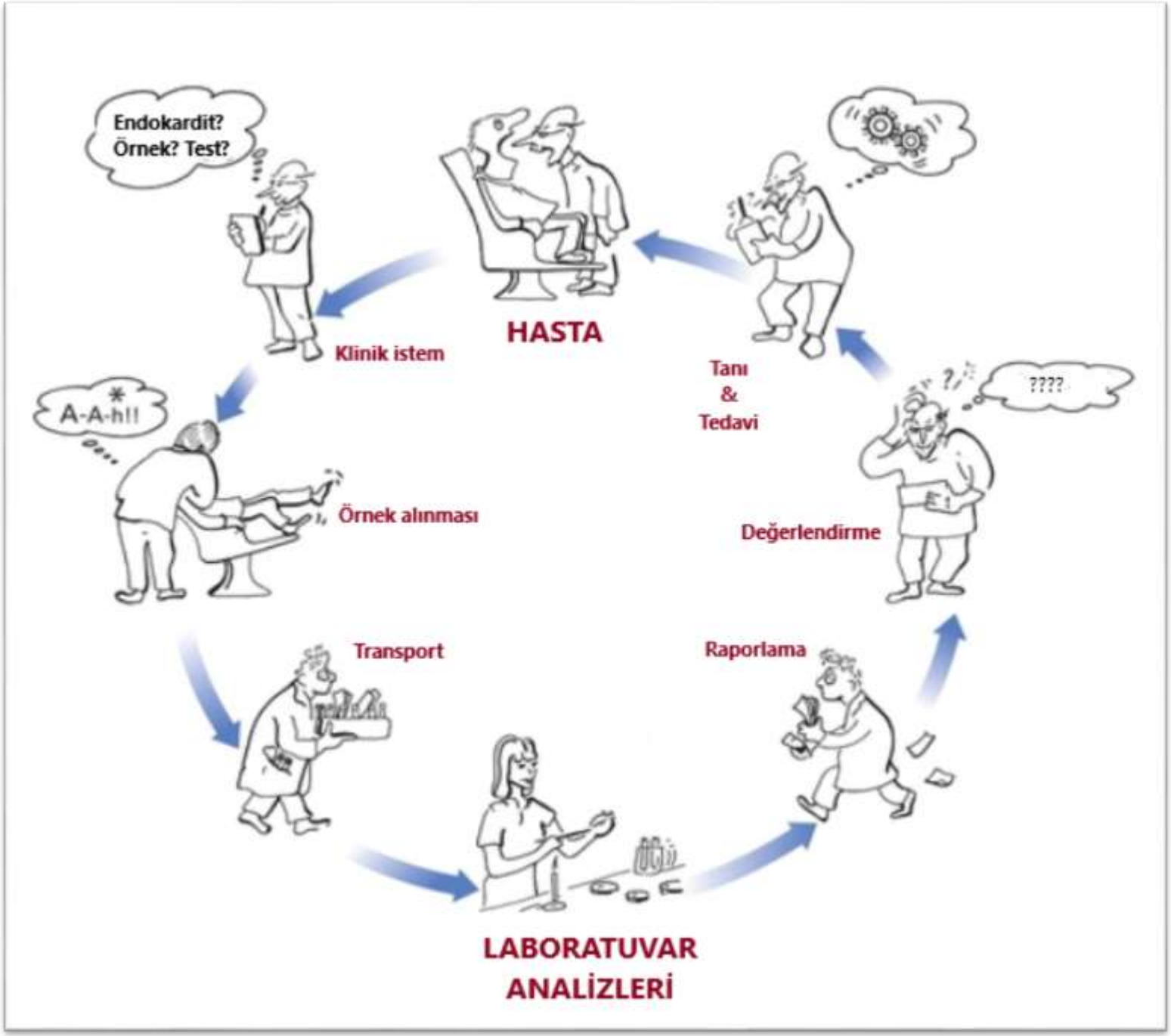
Identification of pathogens in culture-negative infective endocarditis cases by metagenomic analysis

Jun Cheng[1†], Huan Hu[1,2†], Yue Kang[2†], Weizhi Chen[2], Wei Fang[2], Kaijuan Wang[1], Qian Zhang[3], Aisi Fu[4], Shuilian Zhou[2], Chen Cheng[2], Qingqing Cao[2], Feiyan Wang[1*], Shela Lee[2*] and Zhou Zhou[1*]

YENİ KRİTERLER?!?

Son Söz…

- İE tanısı multidisipliner yaklaşım gerektirir: Tıbbi mikrobiyoloji uzmanı mutlaka ekipte yer almalıdır!!!
- Mikrobiyoloji Laboratuvarı, hastanın endokardit şüphesi ile yatırıldığından mutlaka haberdar edilmelidir
- Tanıda kan kültürü ALTIN STANDARTTIR!!!
- Kültür-negatif endokarditte ÖNCE seroloji → SONRA moleküler tanı önerilir
- Moleküler testler yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir
- ANCAK moleküler testlerin de kısıtlılıkları olduğu unutulmamalıdır
- Moleküler test sonuçları MUTLAKA klinik uyum ile birlikte değerlendirilmelidir


Endokardit?
Örnek? Test?
HASTA
Klinik istem
A-A-h!!
Örnek alınması
Tanı
&
Tedavi
????
Değerlendirme
Transport
Raporlama
LABORATUVAR
ANALİZLERİ