

İNVAZİF ASPERGİLLÖZÜN

MİKÖLOJİK TANISI

Dr Süleyha HİLMİÖĞLU POLAT

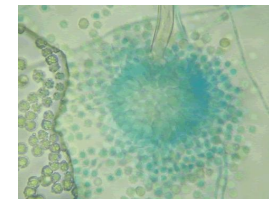
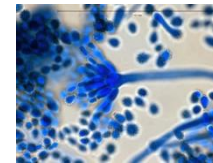
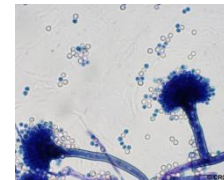
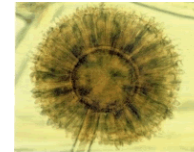
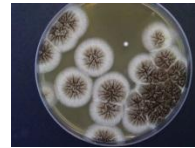
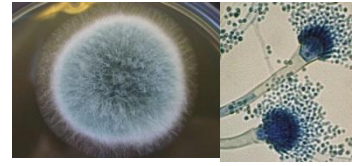
Ege Üniversitesi Tıp Fakölesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Aspergillus türleri

Doğada yaygın - 325 tür

- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus terreus*
- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus nidulans*
- *Aspergillus glaucus*
- *Aspergillus lentulus*
- *Aspergillus tanneri*

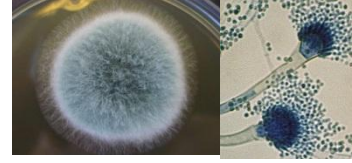


Aspergillus türleri

İnvazif aspergillozda en sık etken

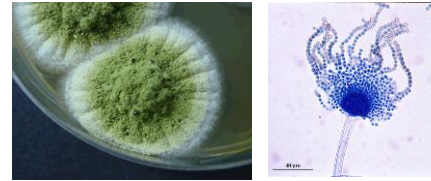
- *Aspergillus fumigatus*

- Doğada en yaygın tür
- Sporları küçük → hava yollarına kolay ulaşım
- 37°C'de üreyebilme



- *Aspergillus flavus*

- Akciğer dışı hastalıklarda !
- Gelişmekte olan ülkelerde !

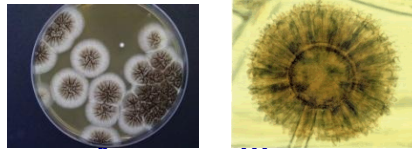


- *Aspergillus terreus*

- Bazı merkezlerde !



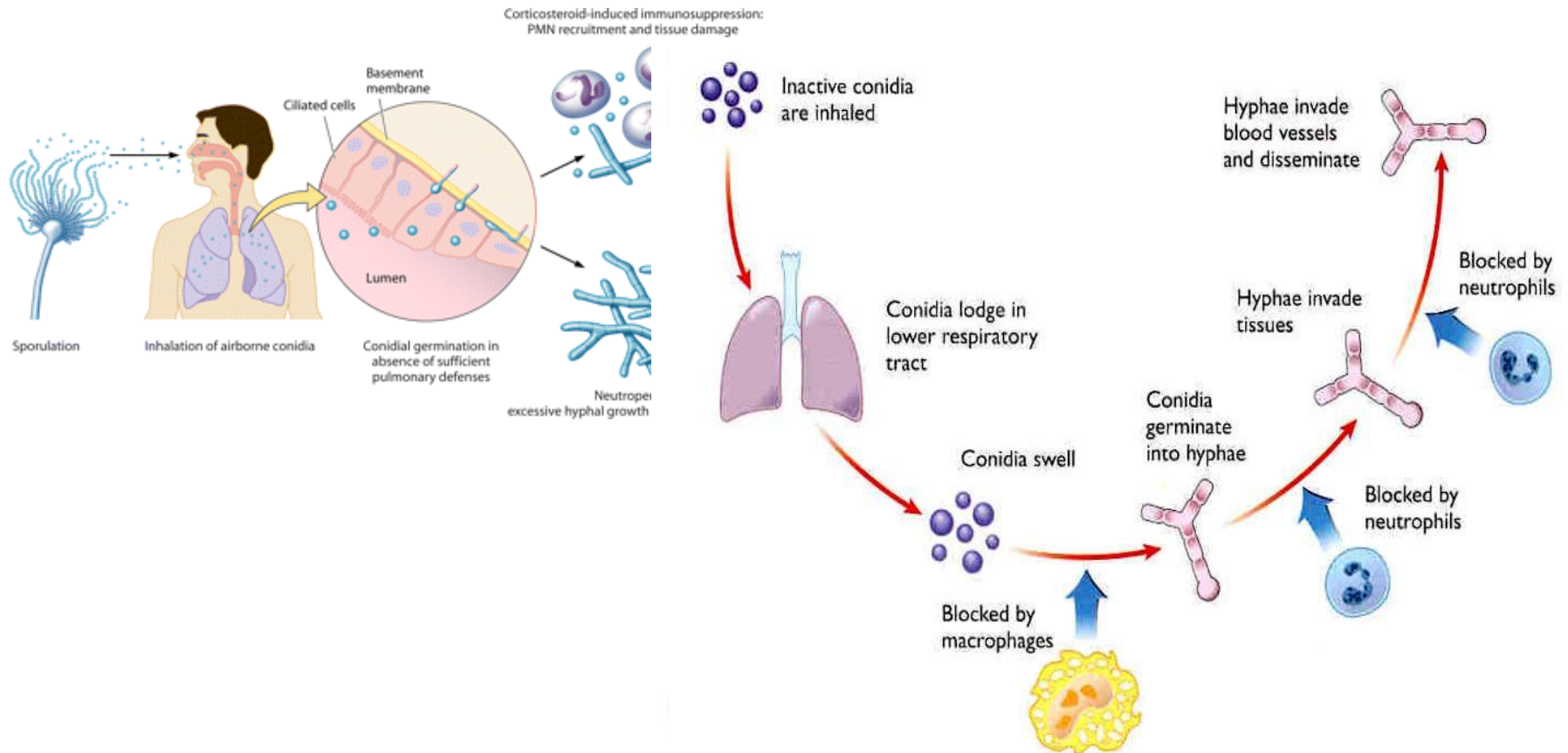
- *Aspergillus niger*



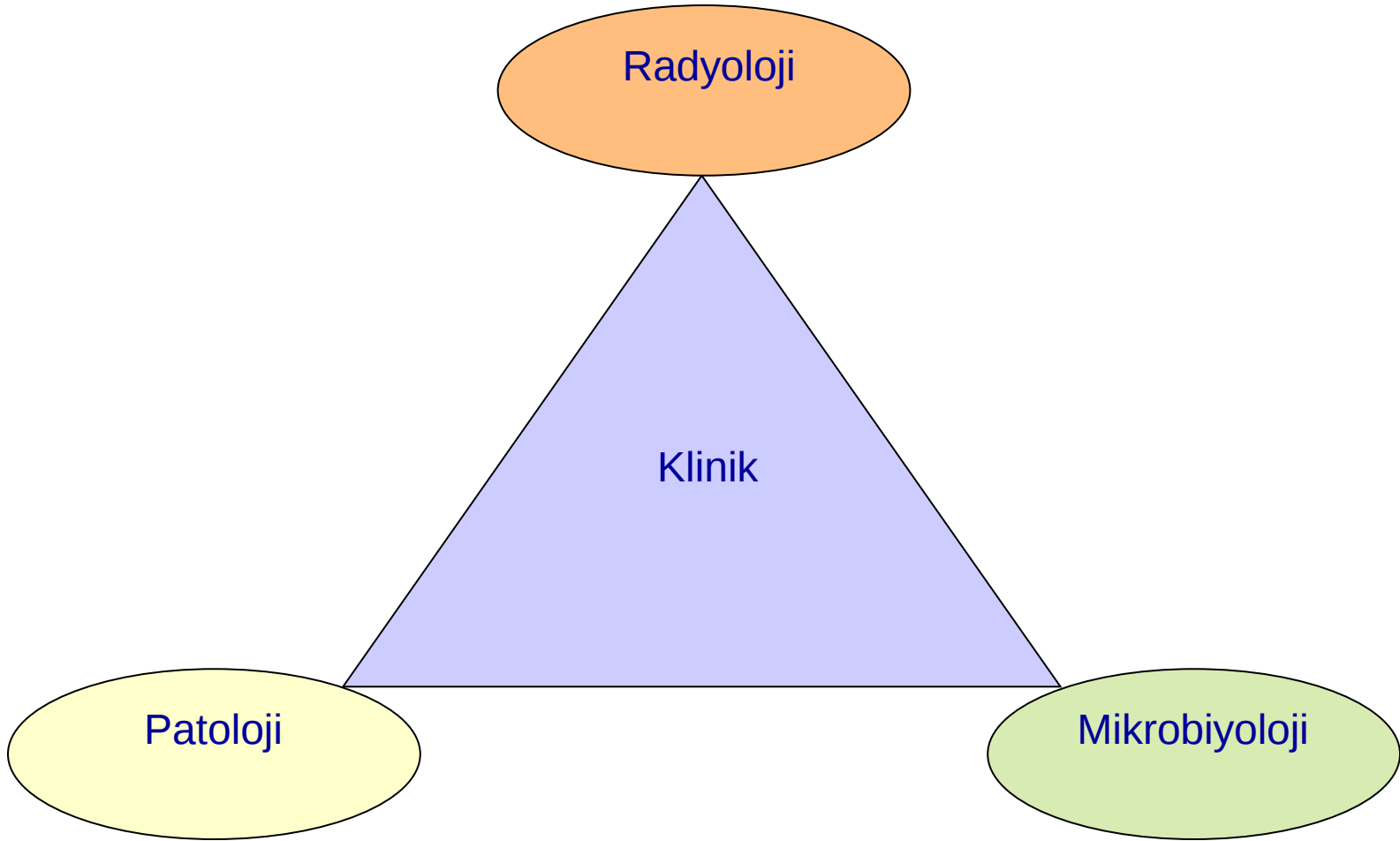
- Birbirine yakın türler – *Aspergillus ... complex* – DNA dizi analizi
- Antifungal duyarlılıkları farklı

Aspergillozun patogenezi

- Hava ⇨ Solunum
- Su ⇨ Aerosol ⇨ Solunum (Hastanede)



Tanı

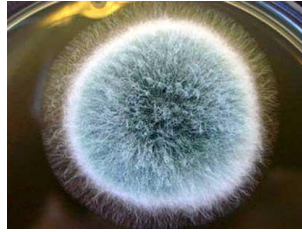


Mikolojik Tanı



1- Mikroskopik inceleme

- Doku
- İndirekt klinik örnekler (balgam, BAL, diğer)



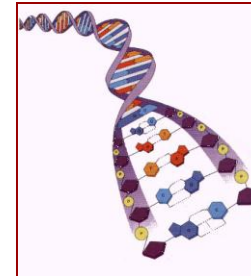
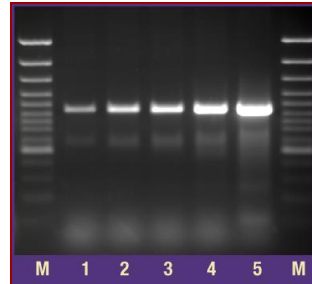
2- Kültür



3- Serolojik testler

- Galaktomannan
- B-D-glukan

4- Moleküler yöntemler



Tanı testinin performansı

- Hasta popülasyonu
- Örneğin alınma zamanı - hastalığın evresi
- Önceki antifungal profilaksi veya tedavi
- Örnekler antifungal tedavi öncesi alınmalı
- Anaerobik taşıma besiyeri kullanılmamalı
- Örnek formol içinde gönderilmemeli

Mikolojik tanı için klinik örnek

DOKU > BAL > DTA > Balgam

Sorun

Konağın durumu, invaziv girişimlerin uygulanmasına çoğunlukla izin vermez (trombositopeni, hipoksi, genel durum bozukluğu..)

Histopatolojik inceleme

Doku → Biyopsi /otopsi materyali

İnvazyonu gösterir

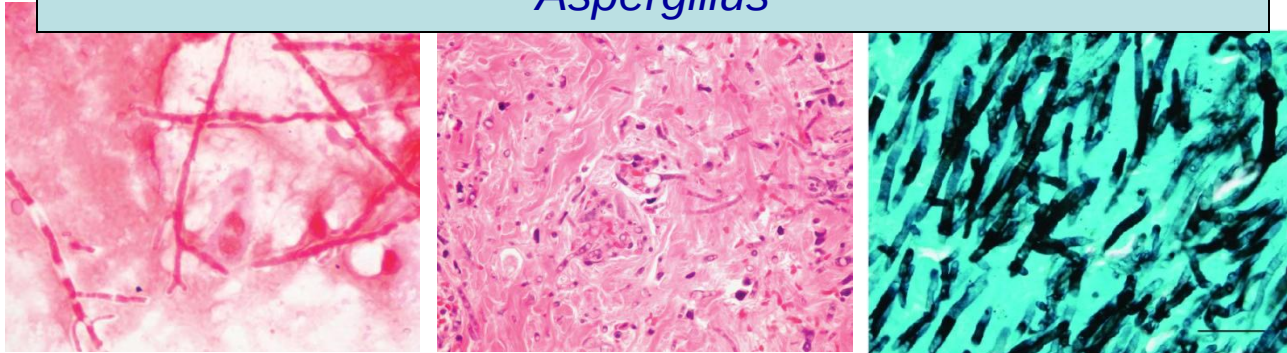
Kültürde üreme olursa → İnvazif hastalık kanıt !

HE, PAS, Grocott gümüşleme

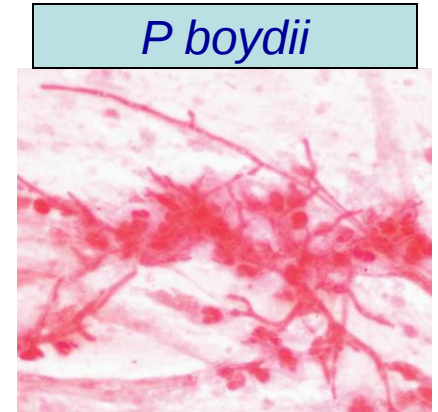
Düzgün, bölmeli, dar açı ile dallanan hifler

(Diğer hiyalen küfler !!!!)

Aspergillus

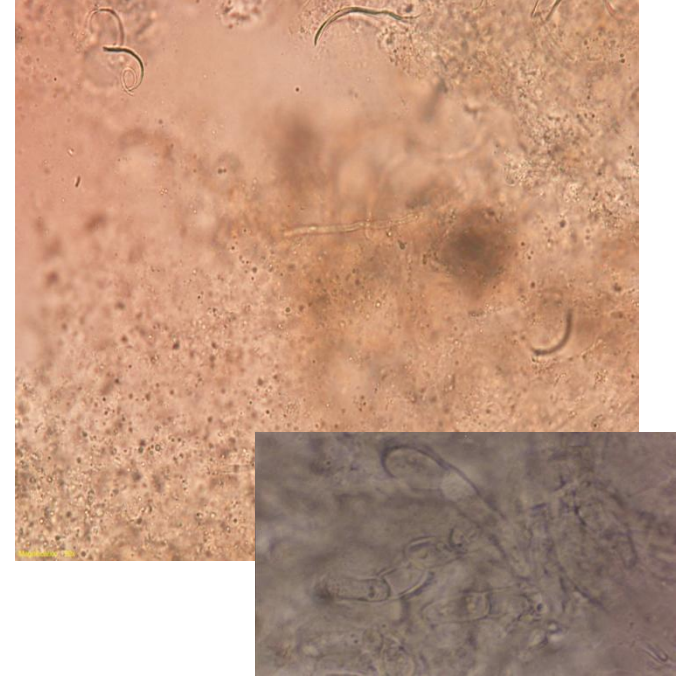


P boydii



Mikolojik tanı -Mikroskopik inceleme

- Duyarlılığı düşük
- Deneyim gerektirir
- Örnekte mantar yoğunluğu!

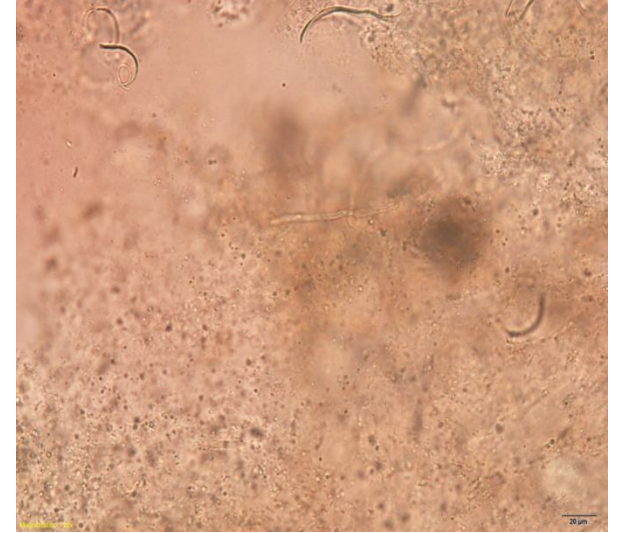


- **Düzgün, bölmeli, dar açı ile dallanan hifler → Diğer hiyalen küflerden ayrılamaz !**

Mikroskopik inceleme

Mikroskopik inceleme

- **Doku**
- **İndirekt klinik örnekler**
(balgam, BAL, diğer)



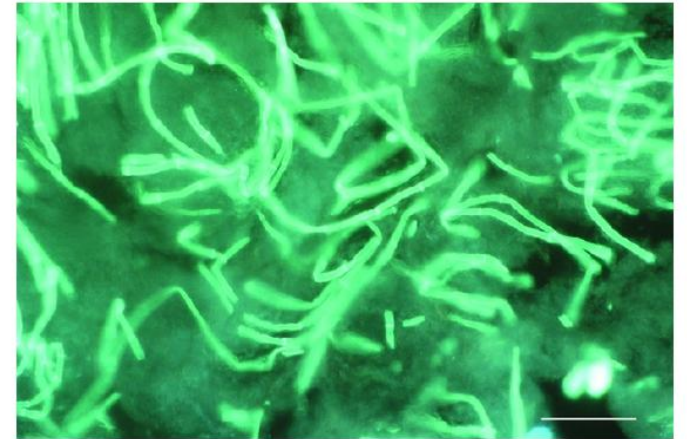
KOH

Floresan parlaticılar

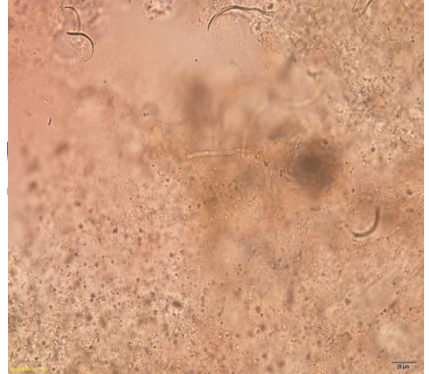
-Kalkoflor beyazı,

- Blankofor –

duyarlılık ve hızı artırır



Mikroskopik inceleme

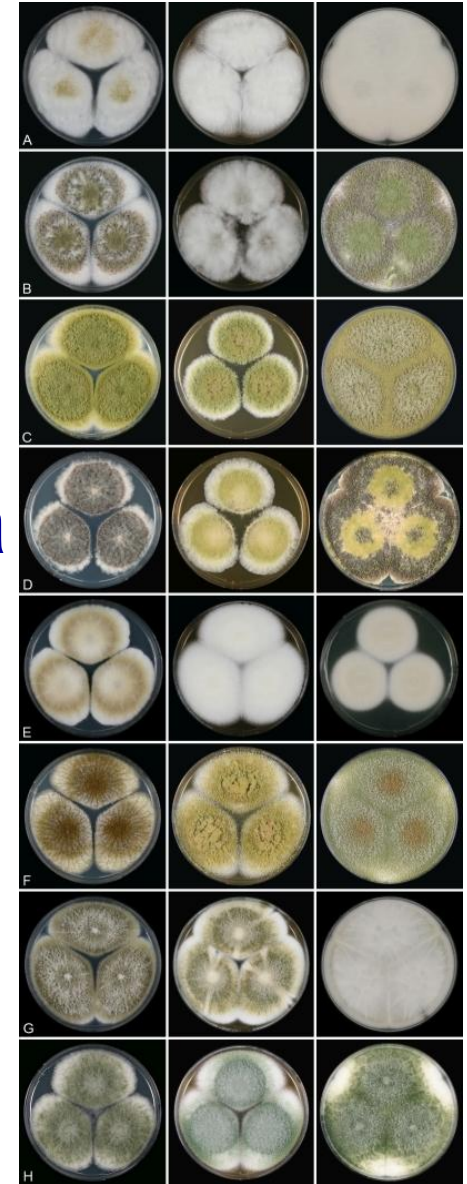
- En basit, hızlı ve ucuz yöntem
 - Kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı
 - Örnekte hif görülmesi → erken uyarı
 - Bağışık sistemi baskılanmış hastada mikroskopi → daha iyi sonuç !
- 
- BAL örneklerinde mikroskopi > kültür
Mantar infeksiyonu için daha erken tanı !
Fakat mikroskopi ile kültürü karşılaştıran çalışmalar ?!

Kültür

- Örnekler:

Doku > BAL > DTA > Balgam

- Cins ve tür düzeyinde tanımlama
- Türe özgü olası direnci belirleme
- Antifungal duyarlılık testi



Kültür

- Kültürde üreme: 2-5 gün (tedavi baskısı altında daha uzun)
- Kültürden tanımlama: 2-3 gün (deneyim gerektirir)
- *Aspergillus fumigatus* – atipik formlarda yanlış tanımlama

A lentulus

A novofumigatus

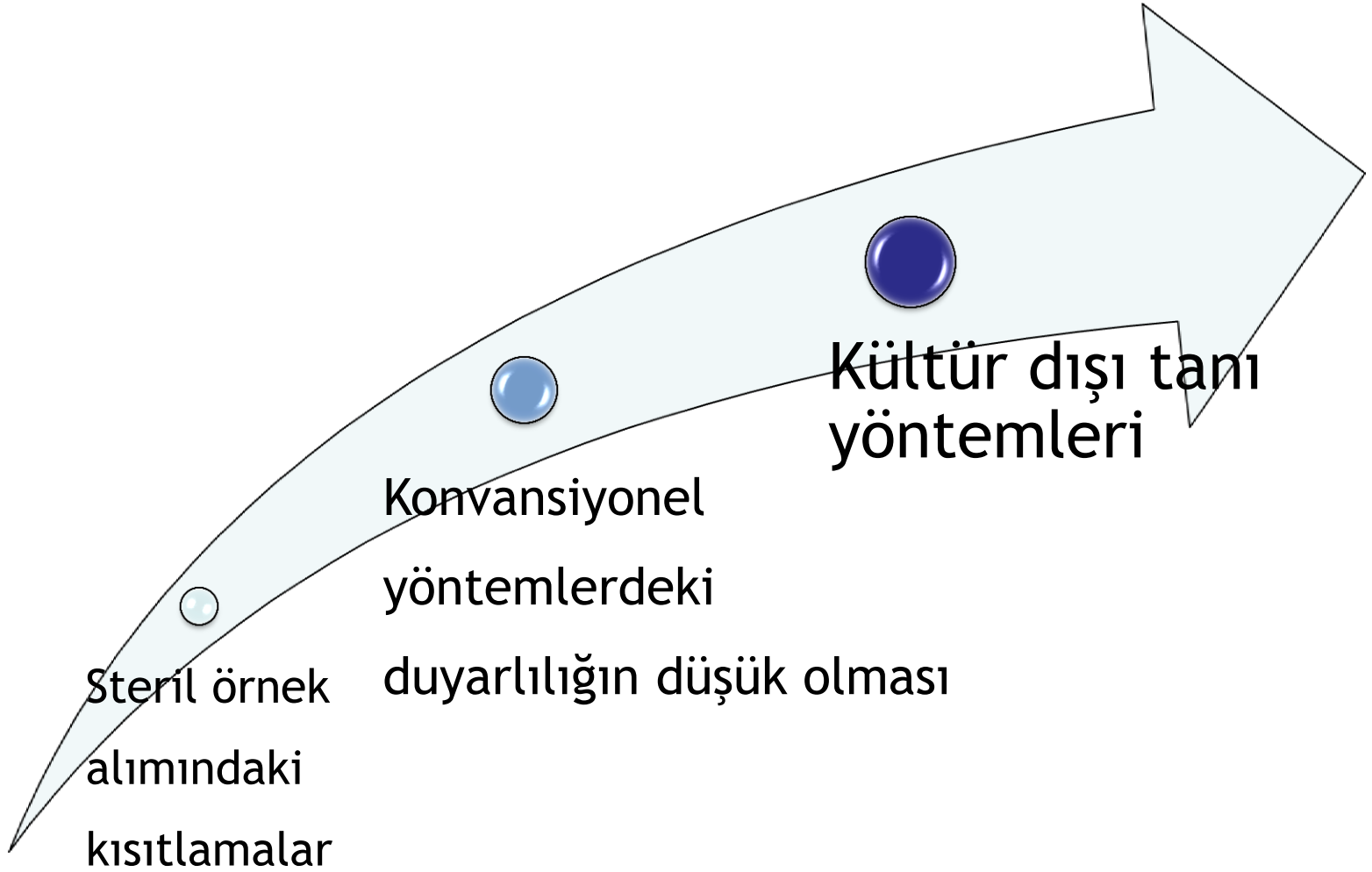
A fumigatiaffinis

Kültür

- Üreme olan örneklerde değerlendirme güç
Kontaminasyon ?
Kolonizasyon ?
İnfeksiyon ?

Kültür

- Örneğin direkt mikroskopik incelemesinde hif - anlamlı!
- Ardışık örneklerde ≥ 3 örnekte !!
eş zamanlı alınan farklı örneklerde aynı etken !!
- Kültür olumluluğu diğer verilerle (klinik, radyolojik) daha anlamlı!
- EORTC kriterlerine göre:
Konağın durumu + radyolojik bulgular + solunum örneği kültüründe üreme → İnvazif mantar infeksiyonu



Mikolojik tanı – Serolojik testler

Serolojik testler

- B-D-glukan
- Galaktomannan
- Lateral Flow !!!

1,3 β -D Glukan

- β -D-glukan, mantar hücre duvarında, polisakkarit
- *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türlerinde yok veya düşük düzeylerde
- Hücre dışına salınır.
- Bazı bakterilerde de (+)
- Virüsler ve insan hücrelerinde beta glukan bulunmamasına rağmen bazı sağlıklı bireylerin serumlarında az miktarda saptanabilir.

1,3 β -D Glukan

- Yoğun bakım hastaları dahil tüm hasta gruplarında
- Kolorimetrik, kinetik bir test
- 2008 yılında, “The European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group”
EORTC/MSG tanı kriterleri

1,3 β -D Glukan

Kit	Üretici firma	FDA onayı	Yengeç türü	Cut-off değeri
Fungitel (Glucatell)	Associates of Cape Cod (U.S.)	Var	<i>Limulus polyphemus</i> (kolorimetrik)	60-80 pg/ml
Endosafe-PTS glucan	Charles River Laboratories (U.S.)	Yok	<i>Limulus polyphemus</i> (kolorimetrik)	10-1000 pg/ml
Fungitec G-MK	Seikagaku Biobusiness (Japan)	Yok	<i>Tachypleus tridentatus</i> (kolorimetrik)	20 pg /ml
β -glucan test	Wako Pure Chemical Industries (Japan)	Yok	<i>Tachypleus tridentatus</i> (turbidimetrik)	11 pg /ml
BGSTAR β -glucan test	Maruha (Japan)	Yok	<i>Tachypleus tridentatus</i> (kolorimetrik)	11 pg / ml

1,3 β -D Glukan

- Panfungal
 - Nadir görülen türler dahil invazif mantar infeksiyonu tanısında
 - Zygomycetes* ve kriptokok infeksiyonları (?)
 - Pnömosistoz; duyarlılık; %92-100; >500 pg/ml
- Duyarlılık % 55 - 100
- Özgüllük % 87 - 93
- PPD %40-84
- NPD %75-100
 - Bakteri infeksiyonları sırasında özgüllük %58-%77

Beta glukan testinin performansı
seçilen pozitiflik kriterine göre
değişken!

• Hematolojik maligniteli
(n: 100)

• tanı öncesinde %78 hastada BG (+)

Table 4. Performance of the BG assay

Values shown are for BG concentration in pg ml^{-1} . All values are %.

	1 value ≥ 60	2 values ≥ 60	1 value ≥ 80	2 values ≥ 80	1 value ≥ 100	2 values ≥ 100
Sensitivity	97.4	92.1	94.7	86.8	89.5	81.6
Specificity	28.6	61.9	45.2	76.2	57.1	83.3
False positives	71.4	38.1	54.8	23.8	42.9	16.6
False negatives	2.6	7.9	5.3	13.2	10.5	18.4
PPV	55.2	68.6	61	76.7	89.5	81.5
NPV	92.3	89.7	90.5	86.5	85.7	83.3
Accuracy	61.3	76.3	68.8	81.3	72.5	82.5

Ellis M, al-Ramadi B, Finkelman M, Hedstrom U, Kristensen J, Ali-Zadeh H, Klingspo L. Assessment of the clinical utility of serial B-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol.* 2008; 57; 287-295.

1,3 β -D Glukan

- Klinik olarak mantar infeksiyonu tanısından ortalama 4-12 gün önce (+)
- Yüksek riskli pediyatrik hastalarda; tomografi ve kültür sonuçlarından önce test (+)
- Empirik antifungal kullanımı testi etkilememektedir
- Testin 2 saat içinde sonuç vermesi bir tarama testi olarak kullanılabileceğini düşündürmekte

1,3 β -D Glukan-kısıtlılıklar

- Beta glukan testinin tanı spektrumunun geniş olması avantajı, ancak tür belirleyememesi dezavantajıdır
- Testin **yalancı pozitiflik** gösterdiği çok sayıda durum mevcut
 - Kontaminasyona açık (Gazlı bez, filtreler gibi tıbbi malzemeler ve çevresel pek çok kaynak glukan içermekte)
 - Bakteriyemili olgularda
 - Albumin, IG kullanımı veya hemodiyaliz
 - *Bazı antibiyotiklerin kullanımında (Sefepim, piperasilin tazobaktam, amoksisilin klavulonat, meropenem, trimetoprim-sulfametaksazol, ertapenem, sefazolin, sefotaksim, kolistin)
- Mevcut verilerle test ümit vaat etmektedir. Daha geniş çaplı ileriye yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

•Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C et al. Detection and investigation invasive mold disease *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 15-24.

•Koo S, Bryar JM, Page JH et al. Diagnostic performance of the (13)-b-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1650-9.

•Obayashi T, Negishi K, Suzuki T et al. Reappraisal of the serum (13)-b-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections—a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1864-70.

*Hsu JL, Ruoss SJ, Bower ND, Lin M, Holodniy M, Stevens DA. Diagnosis invasive fungal disease in critically ill patients. *Critical Reviews in Microbiology*. 2011; 37: 277-312

Galaktomannan

- *Aspergillus* türlerinin hücre duvarından salınan heteropolisakkarit
- Mantarın üremesi veya doku invazyonu sırasında, özellikle **hiflerin** doku içinde gelişimi sırasında salınır
- Serumda 0.5-1 ng/ml GM saptama
- Sonuçlar; GMI ile ifade edilmekte
- 2003 yılında FDA onay, **Sandviç ELISA** (Platelia *Aspergillus*, BioRad, Fransa)
- Başlangıçta üretici firma; pozitiflik ≥ 1.5 ng/ml
 - ABD ve Avrupa'da
 - Pozitiflik 0.5-1.5 ng/ml
 - Günümüzde üretici firma, FDA, ABD, Avrupa
 - GMI (+) sınır değeri ≥ 0.5 ng/ml

Galaktomannan

- ❖ Testin performansı birçok faktörden etkilenmekte
 - ✓ Seçilen hasta grubuna
(nötropenik, nötropenik olmayan)
 - ✓ Altta yatan hastalığın ciddiyetine
(Hematolojik malignite, KİT, SOT)
 - ✓ Etkenin invazyonuna (damar duvarı, apse, kavite)
 - ✓ Etkenin türüne (*A. fumigatus*)
 - ✓ Antifungal kullanımına
 - ✓ Alınan örneğe (kan, BAL)
 - ✓ Alınan örnek sıklığına (haftada bir, iki, diğer)
 - ✓ Kaç olumlu örneğin **olumluluk** kabul edileceğine (tek, ardışık iki) göre değişir.
- ❖ Serumlar biriktirilerek çalışılıyor

En az 2 örnekte
pozitiflik

BG > GM

GM: 414 serum
BG: 409 serum

İA: 22
Diğer küf enf: 17
Kandidemi: 23

	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
GM (cut off: 0.5)				
<i>A. fumigatus</i> (n:69)	13	99	90	66
<i>A. fumigatus</i> dışı türler (n: 39)	49	99	95	86
Diğer küfler (n: 77)	6	99	83	62
BG (cut off: 80)				
<i>A. fumigatus</i> (n:69)	61	88	75	79
<i>A. fumigatus</i> dışı türler (n: 39)	64	88	64	88
Diğer küfler (n: 77)	47	88	72	72

Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) β -D-glukan in diagnosis of invasive fungal infections: Low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. J Clin Microbiol. 2009; 47; 129-133.

Galaktomannan

Yanlış pozitif sonuç:

- Antibiyotik kullanımı (ampisillin, piperasillin tazobaktam, amp-sulbaktam, penisillin G, seftiakson, sefepim, imipenem, klaritromisin, siprofloksasin, vankomisin, gentamisin, TMP-SMX, ornidazol)
- *Bifidobacterium bifidum* → çapraz reaksiyon
- Bakteremi - sepsis
 - *Listeria monocytogenes*
- GM salan diğer mantarlar

Galaktomannan

Aspergillus dışındaki küfler ve diğer mantarlar da GM salıyor

Acremonium türleri

Alternaria alternata

Botritis tulupae

Cladosporium cladosporioides

Cladosporium herbarum

Cryptococcus neoformans

Fusarium oxisporum -(*Fusarium solani* salmaz)

Geotrichum capitatum

Paecilomyces variotii

Penicillium chrysogenum

Penicillium digitatum

Penicillium marneffe

Rhodotorula rubra

Trichophyton rubrum

Trichophyton interdigitalis

Wallemia sebi

Walngiella (Exophiala) dermatitidis

Galaktomannan

GM suda çözünür → diğer vücut sıvılarına da geçer

Yoğun Bakım
hastalarında
duyarlılık

Serum X BAL

%44-47 X %89-100

BAL'da özgüllük;
%87

İA riskli hastalarda öneriliyor

- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, Spriet I, Verbeken E, Wijngaerden EV. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J respir Crit Care Med* 2008; 177: 27-34
- Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der SC, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan Detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological Patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003; 121: 448-457.
- Wheat LJ et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 245-251.

Galaktomannan

11 IA'lu hasta

119 akciğer nakilli (takip)

66 diğer organ nakilli (tanı amaçlı)

56 sağlıklı kontrol

Cutoff 0.5 ve 1

IA
Duyarlılık
%81.8

Performans benzer
(serum ve BAL)

Duyarlılık BAL'da daha yüksek!

Cut-off 1 iken özgüllük ↑

TABLE 3. Predictive values of GM detection and culture and/or histopathology in BAL

% Prevalence	Control category	GM								Culture and/or histopathology			
		0.5 cutoff				1.0 cutoff							
		% Sensitivity	NPV	% Specificity	PPV	% Sensitivity	NPV	% Specificity	PPV	% Sensitivity	NPV	% Specificity	PPV
5	Diagnostic	81.8	98.7	72.7	13.6	81.8	98.9	87.9	26.2	72.7	98.27	81.8	17.37
	Surveillance	81.8	99.0	95.8	50.6	81.8	99.0	96.6	55.9	72.7	98.41	89.1	25.98
	Both	81.8	98.9	87.6	25.8	81.8	99.0	93.5	39.8	72.7	98.37	86.5	22.08
10	Diagnostic	81.8	97.3	72.7	25.0	81.8	97.8	87.9	42.9	72.7	96.42	81.8	30.74
	Surveillance	81.8	97.9	95.8	68.4	81.8	98.0	96.6	72.8	72.7	96.71	89.1	42.56
	Both	81.8	97.7	87.6	42.3	81.8	97.9	93.5	58.3	72.7	96.61	86.5	37.44

Husain S, Clancy CJ, Nguyen MH, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte AM, Durkin MM, Knox KS, Hage CA, Bentsen C, Singh N, Wingard JR, Wheat LJ. Performance characteristics of the Platelia Aspergillus Galactomannan Antigen in Bronchoalveolar Lavage fluid. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15; 1760-1763

Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan detection for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease

XIAO-BIN ZHANG^a, GONG-PING CHEN^a, QI-CHANG LIN^a, XIAO LIN^a, HONG-YING ZHANG[†]
& JI-HONG WANG[‡]

^aDepartment of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Laboratory of respiratory diseases in Fujian Medical University, [†]Section II Department of Internal Medicine, Fuzhou Chest Hospital, and [‡]Department of Respiratory Medicine, Fujian Provincial Hospital, People's Republic of China

Table 3 Performance of GM detection for diagnosis of IPA in BALF and serum.

Sample GM cut-off value	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
Serum GM ≥ 0.5	90.9 (85.0–96.8)	66.3 (56.6–76.0)	27.0 (23.0–31.0)	98.1 (95.3–100)
BALF GM ≥ 0.5	90.9 (85.0–96.8)	62.5 (52.6–72.4)	25.0 (21.1–28.9)	98.0 (95.1–100)
Serum GM ≥ 1.0	45.5 (34.8–55.2)	97.5 (94.3–100)	71.4 (67.2–75.6)	92.9 (91.5–94.3)
BALF GM ≥ 1.0	90.9 (85.0–96.8)	95.0 (90.5–99.5)	71.4 (67.2–75.6)	98.7 (96.4–100)

GM, galactomannan; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Galaktomannan

PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag

96 TESTS

62794

**THE PLATELIA™ ASPERGILLUS Ag IS AN IMMUNOENZYMATIC
SANDWICH MICROPLATE ASSAY FOR THE DETECTION OF
ASPERGILLUS GALACTOMANNAN ANTIGEN IN SERUM AND
BRONCHOALVEOLAR LAVAGE (BAL) FLUID**

Galaktomannan - öneriler

- Nötropenik hastalarda HRCT ile birlikte;
 - Tek örnekte GMI > 0.7 veya iki örnekte GMI > 0.5
- Nötropenik çocuk hastalarda tanı ve takipte yararlı
- Erişkin ve çocuk hastalarda
 - serum GMI > 1 ise; tedavi başarısızlığı
- Nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda,
 - BAL GMI > 1, BOS GMI > 0.5

Moleküler yöntemler

Çok sayıda çalışma var !

- DM ve kültüre göre duyarlılıkları yüksek (%63-100)
- Doku, kan, BAL vb klinik örnek çeşitlerine uygulanabilir
- DNA ekstraksiyonu için optimum yöntemi
- Onay almış standart test yöntemi yok!

Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the paediatric and neonatal population: diagnostics and management issues. *CMI*. 2009; 15; 613-624.
Xavier MO, Oliveria FM, Severo LC. Laboratory diagnosis of pulmonary mycose. *J Bras Pneumol*. 2009; 35; 907-919

Sonuç

Tek cepheden tanı olasılıklı değil

Kaostan kurtulmanın yolu işbirliği