

# **Aspergilloziste Erken Tanı ve Serodiagnoz**

**Dr Zekaver Odabaşı**  
**Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi**

# Aspergilloziste Mortalite Düzeyleri

Type/site of aspergillosis	Number of cases	% Total patients	Case fatality rates
<b>Pulmonary Aspergillosis</b>			
<b>Diffuse</b>	<b>1153</b>	<b>59.4</b>	<b>60.2</b>
Localized	203	10.5	29.5
Sinusitis	52	2.7	26.1
Tracheobronchitis	44	2.3	37.5
Multisite	115	5.9	66.7
<b>CNS and disseminated</b>	<b>175</b>	<b>9.0</b>	<b>88.1</b>
Cutaneous and others	199	10.3	25.0
<b>Total</b>	<b>1941</b>	<b>100.0</b>	<b>57.6</b>

# Antifungal Tedavi ve Mortalite

Antifungal treatment	Number of Patients	Case-fatality rates
AmB-D	559	64.8
<b>Lipid form Am-B</b>	<b>325</b>	<b>50.6</b>
Oral itraconazole	106	34.0
Any antifungal (kombinasyonlar dahil)	1102	55.2

# Aspergillozun Erken Tanısının Önemi

- **İnvazif aspergillozun erken tanısı ile buna yönelik erken antifungal tedavi başlanması**
  - Antifungal tedavinin başarı şansını artırır
  - Prognozu iyi yönde etkiler

Aisner, Ann Internal Med, 1977

Von Eiff, Respiration, 1995

Caillot, J Clin Oncol, 1997

# Tanı Yöntemleri

- **Histolojik tanı veya**
  - **Steril vücut sıvı / doku kültürü**
  - **Non-steril vücut sıvı / doku kültürü**
  - **Radyolojik görüntüleme; X-Ray, HRCT**
  - **Serolojik tanı yöntemleri;**
    - Galaktomannan antijen testi
    - Beta Glukan testi
    - PCR
- Altın Standart**

# Tanı Yöntemleri

- **Histolojik tanı veya steril / non-steril vücut sıvısı veya doku kültürü**
  - Trombositopeni nedeni ile biyopsi imkanları sınırlı
  - **Açık Akciğer biyopsisi**; Fungal infeksiyon düşündürten CT bulgusu olan vakalarda yapıldığında < %50 vakada İFİ pozitif
  - **Transbronşial biyopsi**; Trombosit sayısı >50 bin ise
  - **CT - USG guided Trans-Thorasic byiopsi**; fungal infeksiyonları göstermede duyarlılık %70, PPV %100 \*\*

\* Kim, Annals of Hematology, 2002

\*\* Nosari, Hematologica, 2003

# Tanı Yöntemleri

- **Histolojik tanı veya steril / non-steril vücut sıvısı veya doku kültürü**
  - **Kan kültürü**; Vakaların %5 'inde pozitif olabilir
  - **Balgam kültürü**; duyarlılığı düşük
  - **Brobkoalveolar Lavaj (BAL) kültürü**;  $\leq 50\%$  pozitif
  - **Respiratuar kültürler geç dönemde pozitifleşir !!!**
  - **Duyarlılık %56, PPV %63 (nötropenik hasta grubunda)**

Horwath J, Amer J Medicine, 1996

Singh N, Clin Infect Dis, 2001

# Tanı Yöntemleri

- **Radyolojik Görüntüleme**
- **Konvansiyonel X-Ray grafi**
  - Febril nötropenik hastalarda Akciğer PA grafi %10 vakada pozitif iken aynı anda çekilen Toraks CT' de %50 vakada bariz veya şüpheli lezyon tespit edebilir
- **HRCT (high resolution computed tomography)**

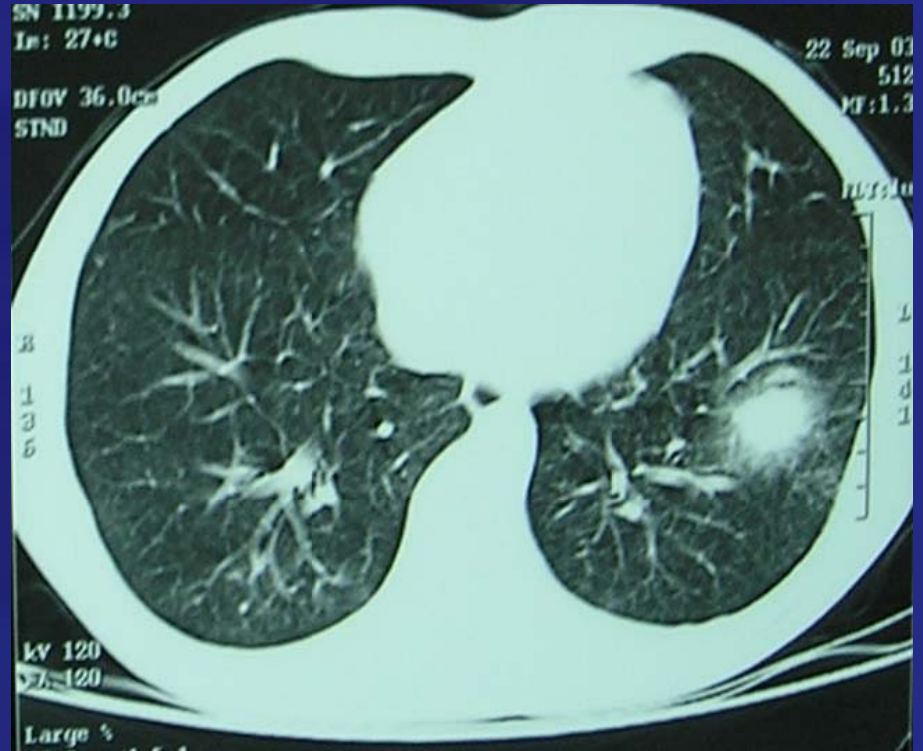
Nötropenik vakalarda empirik antibiyotiğe rağmen düşmeyen ateşin **72-96' ıncı saatinde** rutin öneriliyor



# HRCT & Pulmoner Aspergilloz

- **Halo sign**
- Erken dönem bulgusu
- Nodül ve onu çevreleyen buzlu cam manzarası

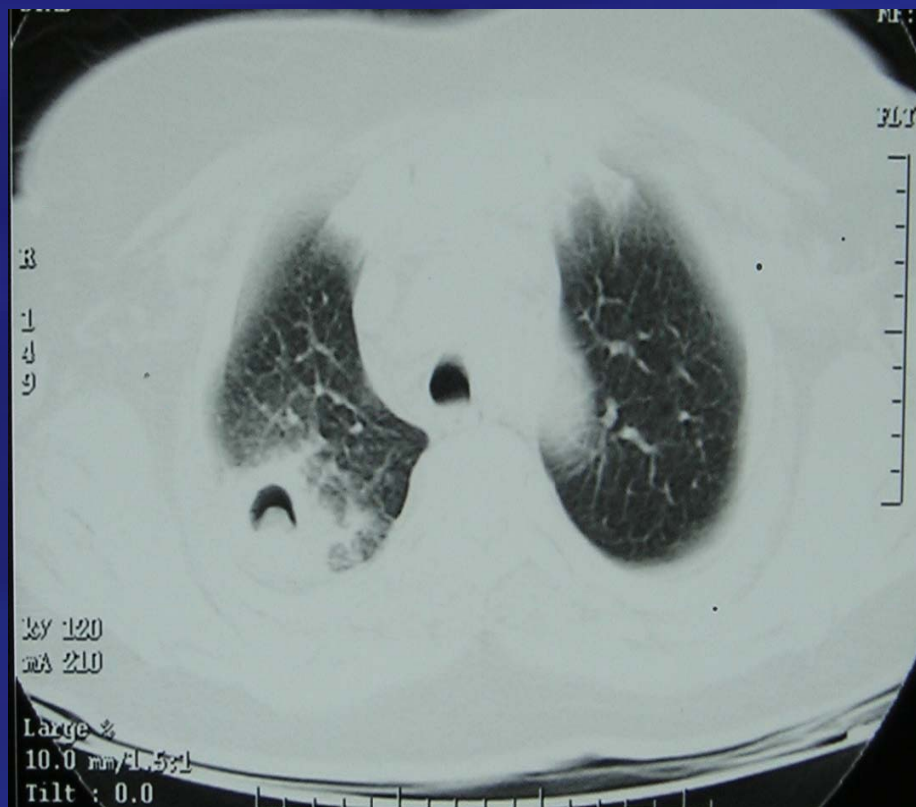
IPA / gün	Halo sign %
<b>3</b>	<b>68</b>
7	22
14	19



# HRCT & Pulmoner Aspergilloz

- **Air-crescent sign**
- Geç dönem bulgusu
- Nodülde gelişen kavitasyona bağlıdır

IPA / gün	Air- crescent sign %
3	8
7	25
<b>14</b>	<b>63</b>



- **Serolojik tanı yöntemleri;**
  - Galaktomannan antijen testi
  - Beta Glukan testi
  - PCR

# Galaktomannan Testi

- **Galaktomannan antijeni**, *Aspergillus* türleri ve diğer bazı küf mantarlarının hücre duvarında bulunur
- Aspergillus damar duvarlarını invaze etme eğiliminde olduğundan galaktomannan antijeni kana geçebilir
- GM antijeni **Latex Aglütinasyon** veya **ELISA** testi ile **serum, BAL, BOS, idrar**'da tespit edilebilmektedir
- ELISA yöntemini LA yöntemine göre daha etkindir

Verweij P, J Clin Microbiol, 1995

Stynen D, J Clin Microbiol, 1995

# Galaktomannan Testi

- ELISA testinde fare EB-A2 monoklonal antikoru ile GM yan zinciri **(1→5)-β-D-galactofuranose** tespit edilir
- Testin İnvazif Aspergillus infeksiyonlarında
  - Duyarlılığı % 67 – 100
  - Özgüllüğü % 81 – 99
  - Yalancı pozitiflik % 6 – 14 (yetişkinlerde),
  - Pediatrik vakalarda % 80'lere varan yalancı pozitiflik

Maertens J, J Clin Microb, 1999 - Maertens J, Blood, 2001 - Sulahian A, Cancer, 2001

Williamson E, J Clin Pathol, 2000 - Swanink C, J Clin Microb, 1997 - Rohrlich P, Pdiatr Inf Dis J, 1996

# Galaktomannan Testi

- Nötropenik vakalarda serumda **haftada iki kez** bakılması önerilmektedir
- İnvazif aspergillozun klinik bulguları ortaya çıkmadan ortalama **3-4 gün önce** pozitif sonuç verebilmektedir
- **Birden fazla sayıda pozitif ardışık serum örneği** olduğunda duyarlılık ve özgüllüğü oldukça artmaktadır
- İA'da serum GM düzey takibi, antifungal tedavinin başarısı ve prognoz açısından bilgi verebilir

# Galaktomannan Testi

- **Yalancı pozitiflik**

- GM çeşitli besinlerde (tahıllar, besin katkı maddeleri) bulunabilir
- Guar gum
- Bazı antibiyotiklerde (tazocillin)
- Barsaklardan translokasyon
- *Bifidobacterium* türleri (süt ve süt ürünleri) çocuklardaki yüksek yalancı pozitiflikten sorumlu

# Galaktomannan Testi

- **Yalancı Negatiflik**

- Anti-aspergillus antikor varlığı yalancı negatifliğe sebep olabilir
- Testin cutt-off değerlerinin düşürülmesi yalancı negatifliği azaltmaktadır
- $<1$  ng/ml = negatif,  $1-1.5$  ng/ml indeterminate,  $>1.5$  ng/ml ise pozitif
- Son önerilen pozitif cutt-off değeri **0.5-0.7 ng/ml**



# PCR

- PCR ile fungal DNA yapıları **serum, BAL** vb örneklerde tespit edilebilir
- Pan-fungal primerler (örneğin **18s ribozomal DNA**) ya da *Aspergillus* gibi belli bir türe yönelik primerler kullanılabilir
- Deneme sürecinde, henüz pratik kullanıma giren **standart bir PCR protokolü yok**
- PA tanısına yönelik çalışmalarda testin
  - **duyarlılığı %75-100,**
  - **özgüllüğü %90' ların üzerinde bulunmuştur**

Hebarth H, J Infect Dis, 2000

Lass-Flori C, Brit J Haematol, 2001

# PCR

- Haftada iki kez veya daha fazla sıklıkta serum örneği
- Klinik infeksiyon başlamadan ortalama **9 gün önce** testin pozitifleşmeye başladığı gösterilmiştir
- Yüksek yalancı pozitiflik ve düşük **PPV (%42-44)**
- Yalancı pozitiflik özellikle BAL'da fungal kolonizasyon nedeni ile daha sık olmaktadır
- Cansız Aspergillus hücreleri de yalancı pozitifliğe sebep olabiliyor
- RT-PCR yöntemi; fungal yük kantitatif ölçülebilir ancak yalancı pozitiflik sorunu devam ediyor

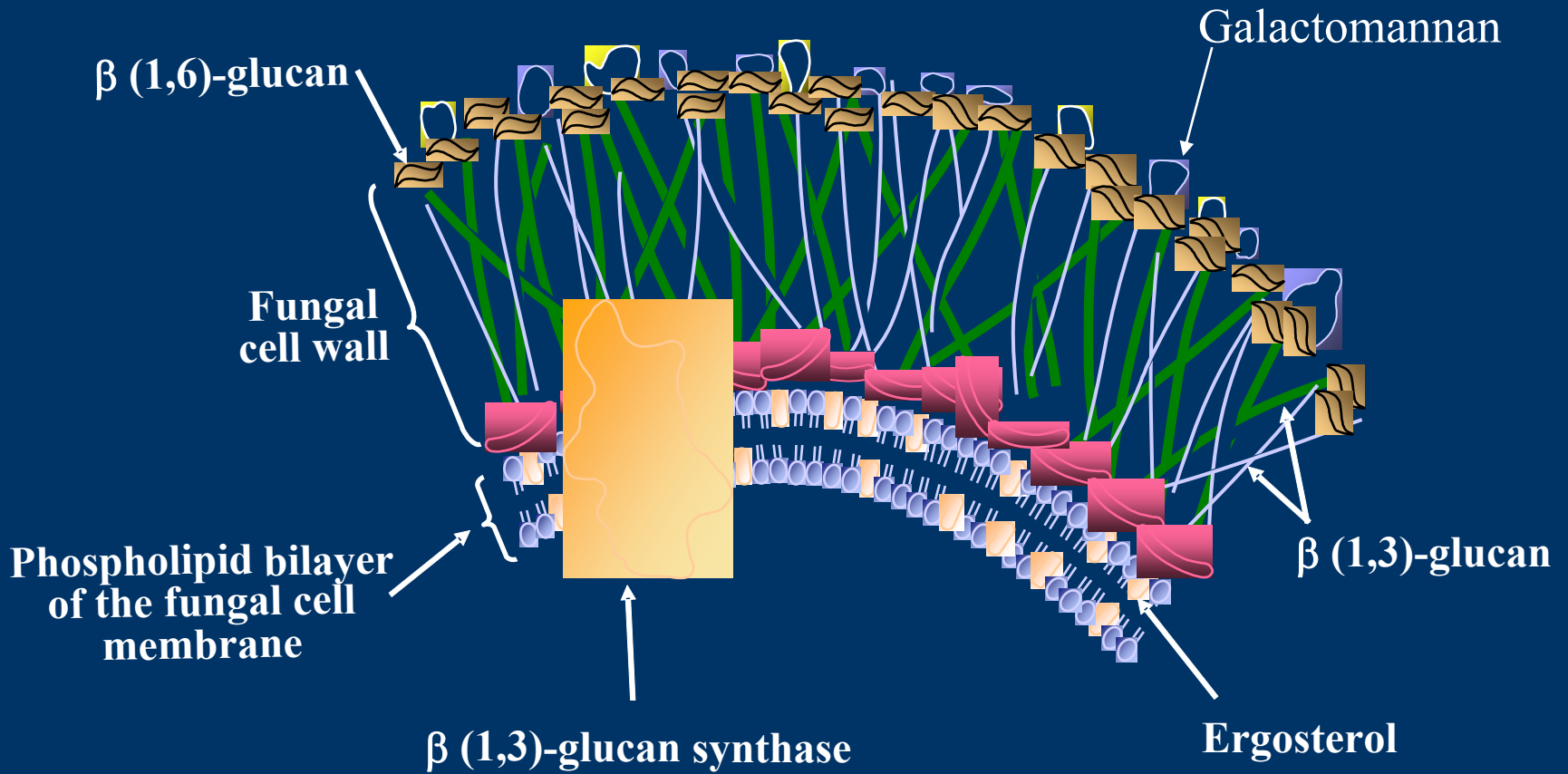
Raad I, Chest, 2002

Kami M, Clin Infect Dis, 2001

## Beta Glukan Testi

- **(1→3)-β-D-glucan** *Candida* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere bir çok maya ve küf mantarının hücre duvar yapısında bulunur

# Fungal Hücre Duvarı



# Beta Glukan Testi

- **Horseshoe crab** olarak bilinen deniz canlısının kan hücrelerinden (Amebocyte) elde edilen **Limulus lizat'** ın *beta* glukan ile reaksiyonu temeline dayanır
- Limulus lizat'da bulunan
  - Faktör B ve C endotoksinlerle reaksiyon verir
  - Faktör G ise beta glukanla reaksiyon verir

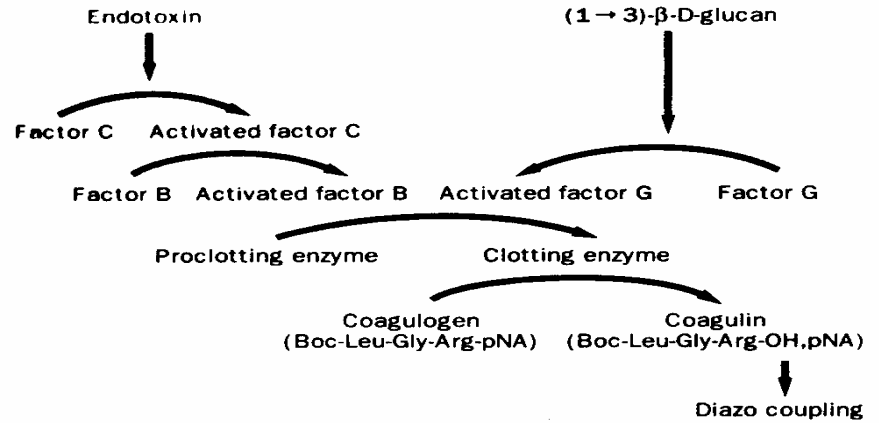
# Beta Glukan Testi



Horseshoe Crab



## Conventional limulus test



## G-test

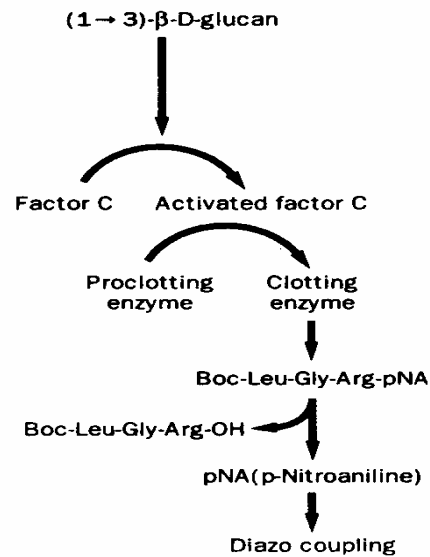


Figure 1: Principle of G test and conventional limulus test

Limulus test reacts to both endotoxin and (1→3)-β-D-glucan, whereas G test reacts to the glucan only.

# Beta Glukan Testi

## Diagnostik Spektrum; Maya Türleri

Isolates (n)	mean BG (pg/ml)	range of BG (pg/ml)
<i>C. krusei</i> (4)	3282	(2858-3666)
<i>C. glabrata</i> (5)	2939	(1544-3765)
<i>C. dubliniensis</i> (3)	2009	(849-3258)
<i>C. parapsilosis</i> (3)	1946	(1621-2222)
<i>Blastoschizomyces capitatus</i> (1)	1859	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (4)	1794	(1468-2336)
<i>C. tropicalis</i> (4)	1708	(1093-2283)
<i>C. albicans</i> (5)	1518	(1141-1992)
<i>Rhodotorula rubra</i> (3)	1392	(1174-1815)
<i>Trichosporon asahii</i> (3)	1316	(1130-1660)
<i>C. lusitaniae</i> (4)	1201	(414-3022)
<i>Hansenula anomala</i> (1)	670	
<i>Cryptococcus neoformans</i> (2)	209	(153-265)

# Diagnostik Spektrum; Küf Mantarları

species (n)	Mean BG	BG range (pg/ml)
<i>Bipolaris spicifera</i> (4)	3452	(2747-4389)
<i>Sporothrix schenckii</i> (3)	3138	(2891-3633)
<i>Penicillium marneffeii</i> (3)	2032	(1685-2297)
<i>Wangiella dermatitidis</i> (5)	2025	(1320-2774)
<i>Aspergillus</i> spp. (12)	1915	(1311-2480)
<i>Paecilomyces</i> sp. (4)	1729	(1199-2539)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (1)	1446	
<i>Basidiobolus ranarum</i> (1)	1418	
<i>Fusarium</i> spp. (6)	1415	(952-1860)
<i>Phialophora verrucosa</i> (5)	1140	(1062-1281)
<i>Acremonium</i> spp. (3)	1014	(625-1402)
<i>Exophiala jeanselmei</i> (5)	993	(593-1650)
<i>Madurella mycetomatis</i> (3)	634	(594-655)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (4)	551	(423-727)
<i>Scedosporium prolificans</i>	380	(231-652)
<i>Rhizomucor pusillus</i> (2)	302	(191-412)
<i>Scedosporium apiospermum</i> (4)	158	(118-188)
<i>Rhizopus arrhizus</i> (2)	149	(89-209)
<i>Pseudallescheria boydii</i> (4)	124	(139-174)
<i>Mucor</i> sp. (2)	121	(111-131)
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (4)	111	(91-127)
<i>Absidia corymbifera</i> (2)	47	(43-40)
RPMI+H <sub>2</sub> O	40	40



## Beta Glukan Testi

- İlk geliştirilen test Japonya orijinli **Fungitec-G™** beta glukan testidir (Seikagaku Corporation, Japan)
- Bu test ile 1995'te hematolojik maligniteli hastalarda yapılan bir çalışmada
  - **duyarlılığı %90**
  - **özgüllüğü %100**
  - **Japonya dışında kullanıma girmedi**

# Beta Glukan Testi

- ABD orijinli **GlucateLL™** (Associates of Cape Cod, US) ile AML grubu nütropenik hastalarda yapılan iki çalışmada
  - Duyarlılık %100
  - Özgüllüğü %80-94
  - NPV %100
  - İki veya daha fazla ardışık serum örneği pozitif ise özgüllüğü %100, PPV %98-100'e çıkmaktadır
  - Fungal infeksiyonların klinik tanısından **ortalama 4-12 gün önce** test pozitifleşmektedir
  - *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Trichosporon* spp gibi farklı etkenlere bağlı İFİ'ler gösterilebilmiştir.

# Beta Glukan Testi

## Beta G testi ve EORTC-MSG kriterlerinin Korelasyonu

IFI	Certainty	Organisms	BG (+)*	BG (-)
Fungemia (8)**	Proven	<i>C. glabrata</i> (4), <i>C. tropicalis</i> (1), <i>C. krusei</i> (1), <i>Fusarium spp.</i> (1) <i>T. beigelii</i> (1)	8	0
Pneumonia (2)	Probable	<i>Aspergillus terreus</i> and <i>C. albicans</i> (1), <i>Fusarium spp.</i> (1)	2	0
Pneumonia (15)	Possible	<i>C. glabrata</i> (1), <i>C. albicans</i> (1), <i>unknown etiology</i> (13)	9	6
none (73)	none		6	67

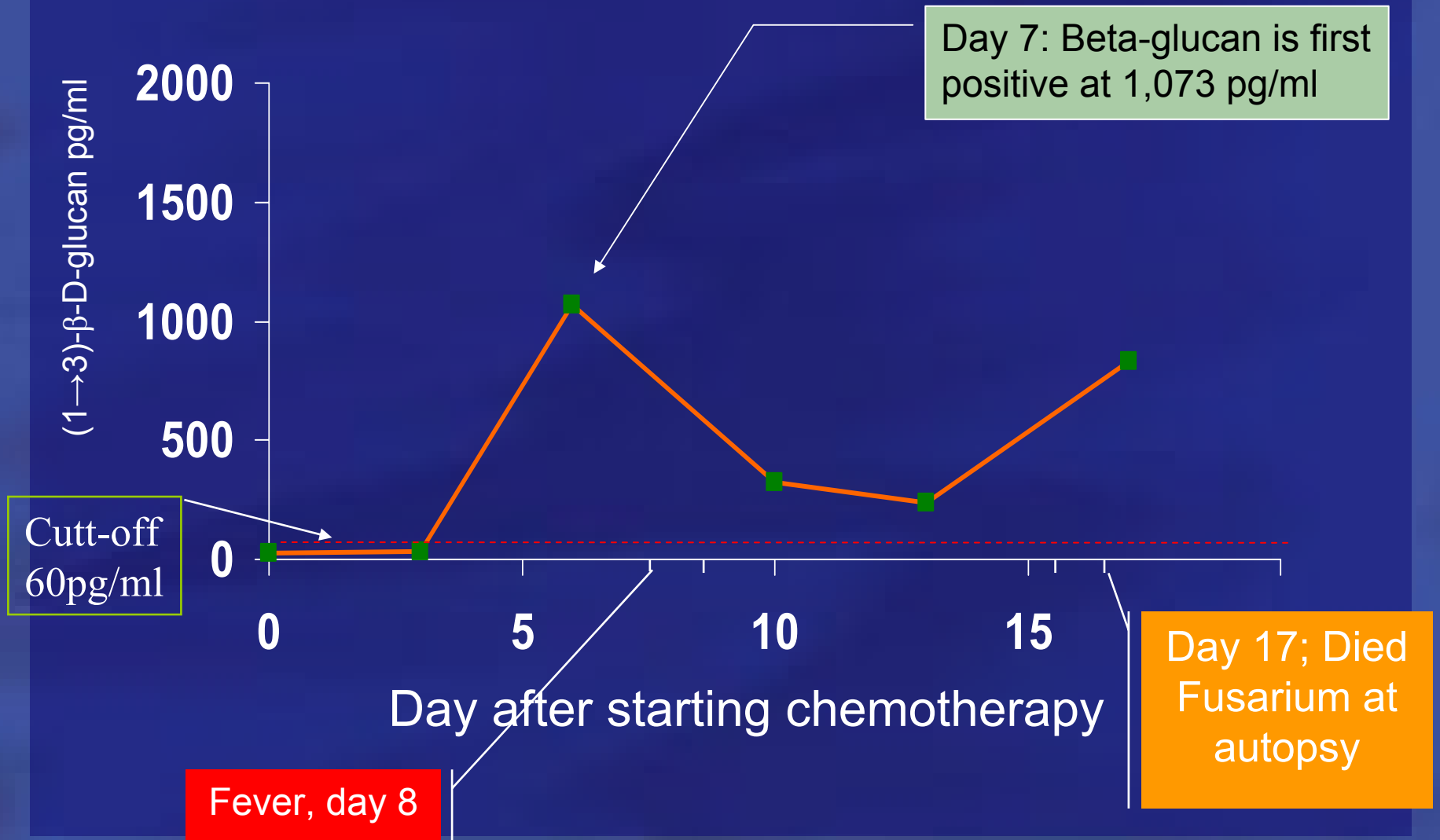
\* BG(+) - any beta glucan value of = or > 60 pg/ml

\*\* (n)-number of patients

## Beta Glukan Testi

- Yalancı pozitiflik deęerleri oldukça dūşüktür ( $\leq \%7$ )
- Test iki saatte 5 mikrolitre serum ile yapılabilmektedir
- Selüloz hemodiyaliz membranları ve İmmünglobulin preparatları yalancı pozitifliğe sebep olabilir
- Dezavantajı; bir mantar türüne **SPESİFİK olmaması**
- Hücre duvarlarında çok düşük düzeyde BG olan Zygomycetes ve Cyptococcus infeksiyonlarında test sonucu genelde negatiftir

# Beta Glukan Testi



# ÖZET

- Henüz yeterli klinik data olmasada serolojik testler invazif aspergillozun **ERKEN** tanısında ümit verici görünüyor
- Bu testlerin etkinliğini gösteren **PROSPEKTİF** çalışmalara ihtiyaç var
- Uzun vadede serolojik testler özellikle yüksek riskli hasta gruplarında “**DESTEKLEYİCİ**” tanı yöntemi olarak kullanıma girebilir

# **Aspergillus İnfeksiyonlarında Antifungal Duyarlılık Testleri**

# Antifungal Duyarlılık Testi

- **NCCLS M38-A** (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
- **Filamentous fungus**'lar için geliştirilmiş sıvı besiyeri duyarlılık testi standartları
- In-vitro çok merkezli çalışmalar ve bunların hayvan modelleri ile korelasyonu sonucu geliştirildi
- Kullanılan antifungaller;
  - **Amphotericin B**
  - **Itraconazole**
  - **Flucytosine**
  - **Fluconazole**



# Antifungal Duyarluluk Testi

- **Metod**; Makro veya Mikro dilüsyon
- **İnokulum hazırlanması**; spektrofotometrik olarak 0.09-0.11 OD veya % 80-82 T
- **İnokulum konsantrasyonu**;  $0.4-5 \times 10^4$  cfu/ml
- **Test medium**; RPMI 1640
- **Buffer**; MOPS
- **pH**; 7.0
- **İnkübasyon sıcaklığı**; 35 °C,
- **İnkübasyon süresi**; 48 saat

# Antifungal Duyarlılık Testi

- **MIC tespiti (end-point)**
- **MIC-0**; gözle görülür üreme yok (%100 inhibisyon)
- **MIC-2**; %50 ve üzerinde inhibisyon
- **Amphotericin B**; MIC-0
- **Flucytosine**; MIC-2
- **Itraconazole, Voriconazole, Ravuconazole ve Posaconazole**; MIC-0
- **Kalite kontrol izolatları**; *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *A. Flavus* (ATCC 204304), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258)



## Sonuçların yorumlanması; **Amphotericin B**

- *Aspergillus* spp için MIC dağılımı 0.5-2 µg/ml
- *A. Terreus* MIC > 2 µg/ml
- İnvazif aspergilloz nedeni ile AmB tedavisi verilen 28 hastada MIC değerleri 2 µg/ml' nin üzerinde seyreden vakalarda tedavinin başarısız olduğu gösterilmiş

## Sonuçların yorumlanması; **Itraconazole**

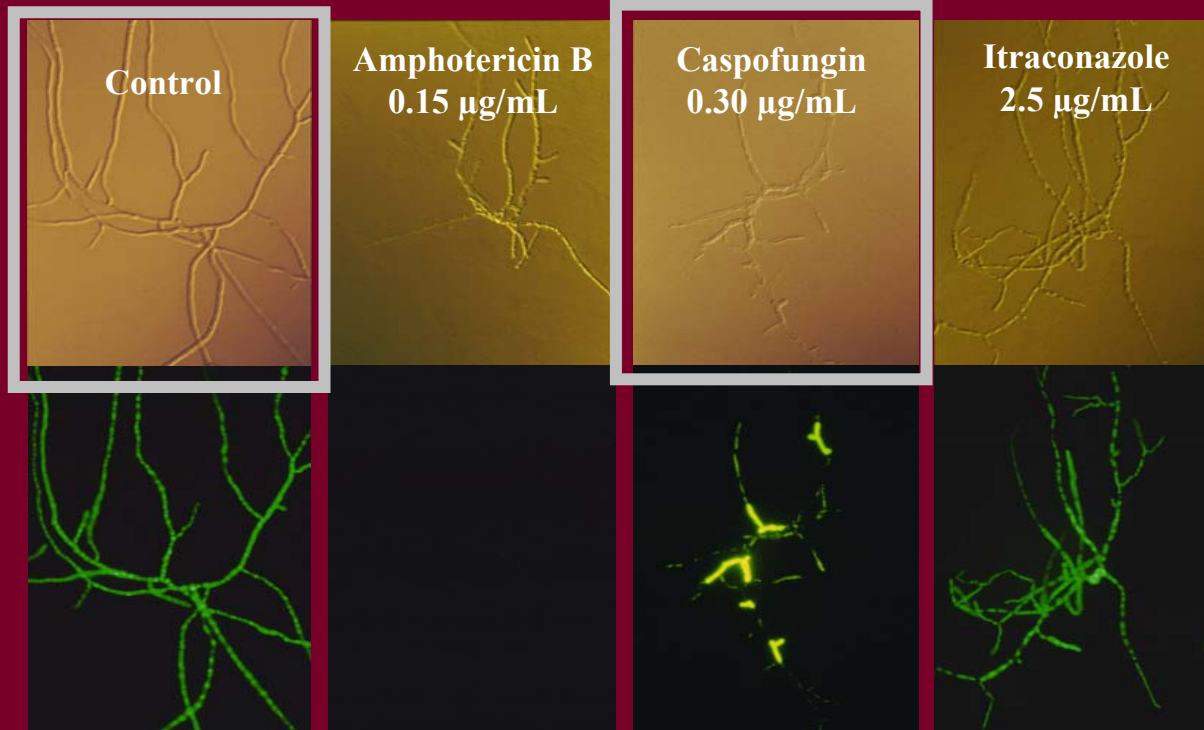
- **MIC > 8** µg/ml olan izolatlarda klinik direnç sözkonusu
- Voriconazole, Posaconazole ve Ravuconazole için henüz belirlenen bir cutt-off değeri yok
- Itra dirençli izolatlarda Vori çapraz direnci olabilir

# Sonuçların yorumlanması; EKİNOKANDİNLER; **Caspofungin, Anidulafungin, Micafungin**

- Ekinokandinlerin filamentöz küf mantarlarına karşı duyarlılığına yönelik henüz NCCLS bazında bir standart oluşturulmamıştır
- **MEC (Minimum Effective Concentration);**  
Ekinokandin ajanların mikroskopik olarak küf mantarları üzerindeki morfolojik etkilerini değerlendirir
- Kalsik MIC sonuçlarına göre MEC değerlerinin daha tutarlı ve klinik sonuçlarla korele olduğu gösterilmiştir
- Genel olarak 2 µg/ml ve altında MIC değerlerine sahip izolatlar Caspofungine duyarlı kabul edilmektedir

# Minimum Efektif Konsantrasyon

## Viabel Stain — Caspofungin Halts Growth of *Aspergillus fumigatus*



Data on file, MSD; Bowman JC *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(9):3001–3012.

# Antifungal Duyarlılık Testi

## Alternatif olarak denenen metodlar

- **Spectrophotometric endpoint determination**
- **Colorimetric endpoint determination**
- **Stable agar gradient MIC test (E test)**
- **Disk diffusion test (caspofungin)**
- **Glucose consumption**
- **Ergosterol quantitation**
- **Flow cytometry**
- **Alternative medium for AmB testing (AM3 media)**



# TEŞEKKÜRLER