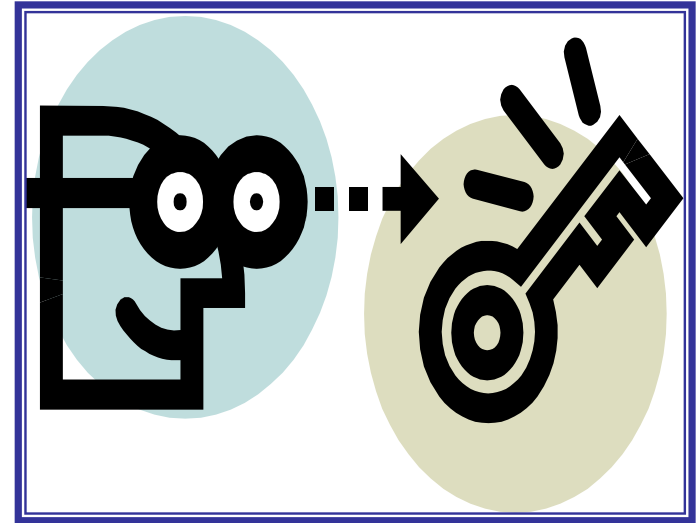


Fungal Enfeksiyonlar: Biyobelirteçler ve Tanıdaki Rolü

Beyza ENER
Uludağ Üniversitesi
Tıp Fakültesi



16.03.2013

MANTARLAR

Doğada yaygın olarak bulunan, çoğu saprofit organizmalardır

Yüzeyel enfeksiyonlar

Dermatofitler

Candida türleri

İnvazif enfeksiyonlar

Endemik etkenler

- *Histoplasma capsulatum*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Coccidioides immitis*
- *Paracoccidioides brasiliensis*

Fırsatçı etkenler

- *Candida* türleri ve diğer maya benzeri mantarlar
- *Aspergillus* türleri ve diğer hiyalen mantarlar
- *Mucorales* takımı mantarlar
- Esmer mantarlar

Fungal Enfeksiyonlarda Etiyolojik Tanı

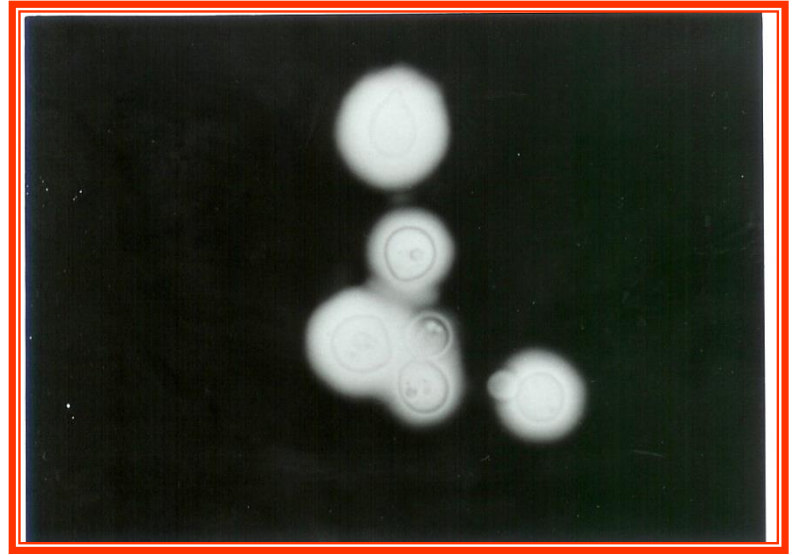
- Direkt mikroskopik inceleme ve kültür
- Özgül mantar antijenlerinin belirlenmesi
- Özgül konak immun cevabın (antikor) belirlenmesi
- Özgül mantar nükleik asitlerinin (DNA ve RNA) belirlenmesi
- Ayırt edici mantar metabolitlerinin belirlenmesi

Hasta Örneklerinde Etkenin Antijenik Yapısının Gösterilmesi (Antijenik marker)

- Geçici olarak bulunmamalı
- Sadece enfeksiyonda pozitifleşmeli
- İnsan ya da diğer mikrobiyal antijenlerle çapraz reaksiyon vermemeli
- Erken dönemde tespit edilebilmeli
- Kolay bir test ile tespit edilebilmeli

- Kapsül antijeni taranması (LA ve EIA)
 - *Cryptococcus* türleri
- Hücre duvarı antijenleri
 - β -glukan aranması (pan fungal)
 - Galaktomannan aranması (aspergilloz)
 - Mannan aranması (kandidoz)
- Diğer yapılar
 - Enolaz
 - Proteinaz

Kapsül antiijeninin aranması



- *Cryptococcus neoformans*
- *Cryptococcus albidus*
- Çapı 3,5-8 μ m yuvarlak oval maya hücreleri;
nadir yalancı hif
- *C neoformans*'ın dört serotipi (A,B,C,D)
- *Filobasidiella neoformans* (A,D)
- *Filobasidiella bacillispora* (B,C)

Cryptococcus Enfeksiyonları

- Güvercin ya da diğer kuşların dışkıları ile atılır
- İnhalasyon ile bulaş (akciğerler)
- Hematojen yayılım ile beyin ve meninks
- Deri, kemik ve eklem tutulumu
- HIV enfeksiyonlarında (%10)
- Lupus, sarkoidos, lösemi, lenfoma gibi hastalıklar

Cryptococcus Enfeksiyonlarında Antijen

- Polisakkarit yapıda kapsül (glucoronoxylmannan; *GXM*) antijenin aranması
- Tüm serotipler için kullanılabilir
- BOS, serum, BAL
- Kitler LA veya ELISA sistemleri ile çalışmaktadır

Latex Cryptococcal Antigen Testleri (LCATS)

- **Crypto-LA** (International Biological Labs, Inc., Cranburg, NJ, USA)
- **Myco-Immune** (American Microscan, Mahwah, NJ, USA)
- **Immy Latex-Crypto Antigen** (Immuno-Mycologics, Inc., Norman, Okla, USA)
- **Calas-Cryptococcal Atigen Latex Agglutination System** (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA)
- **Pastorex Cryptococcus Test** (Sanofi Diagnostic Pasteur)
- **Liken Latex Test** (Liken Tokyo)

(LCATS)

- BOS'da bakıldığında duyarlılık %93-100, özgüllük %93-98
- Serumda bakıldığında özgüllük ve duyarlılık eski kitlerde düşük
- Yeni kitlerde monoklonal antikor kullanılmaktadır
- Pronaz ile muamele kitin özgüllük ve duyarlılığını arttırır
- Ön işlem olarak kaynatma yapılması da özgüllüğü arttırır

Tanıda ELISA Kiti

- Premier Cryptococcal Antigen Kiti (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA)
- Sandviç ELISA sistemidir
- Okuma LACTS testlerine göre daha objektifdir
- Ancak ekipman gerektirir

Testin Performansı

- *Trichosporon* türleri ile benzer polisakkarit yapı nedeniyle çapraz reaksiyon
- Gram (-) nonfermentatif bir bakteri olan DF-1
- Rhomotoid faktör
- Platin özeler

Duyarlılığı %99 civarındadır. Kapsül materyali az ya da hiç olmayan suşlarla gelişen enfeksiyonlarda yalancı negatiflikler olabilir

(1,3- β -D gluklan testi)

- 1,3- β -D gluklan bir çok mantarın hücre duvarında bulunan bir komponenttir (*Cryptococcus* ve *Mucorales* hariç)
- Ekstrasellüler ortama da salgılanabilir
- Bazı bakteriler de gluklan ya da gluklan benzeri polimerler oluşturabilirler (*Alcaligenes* ve *Streptococcus*)
- İnvazif mantar enfeksiyonlarında serum seviyesinin ölçülmesinin tanıda yardımcı olabileceği düşüncesi ile kullanılmaya başlanmıştır

(1,3)- β -D Glukan

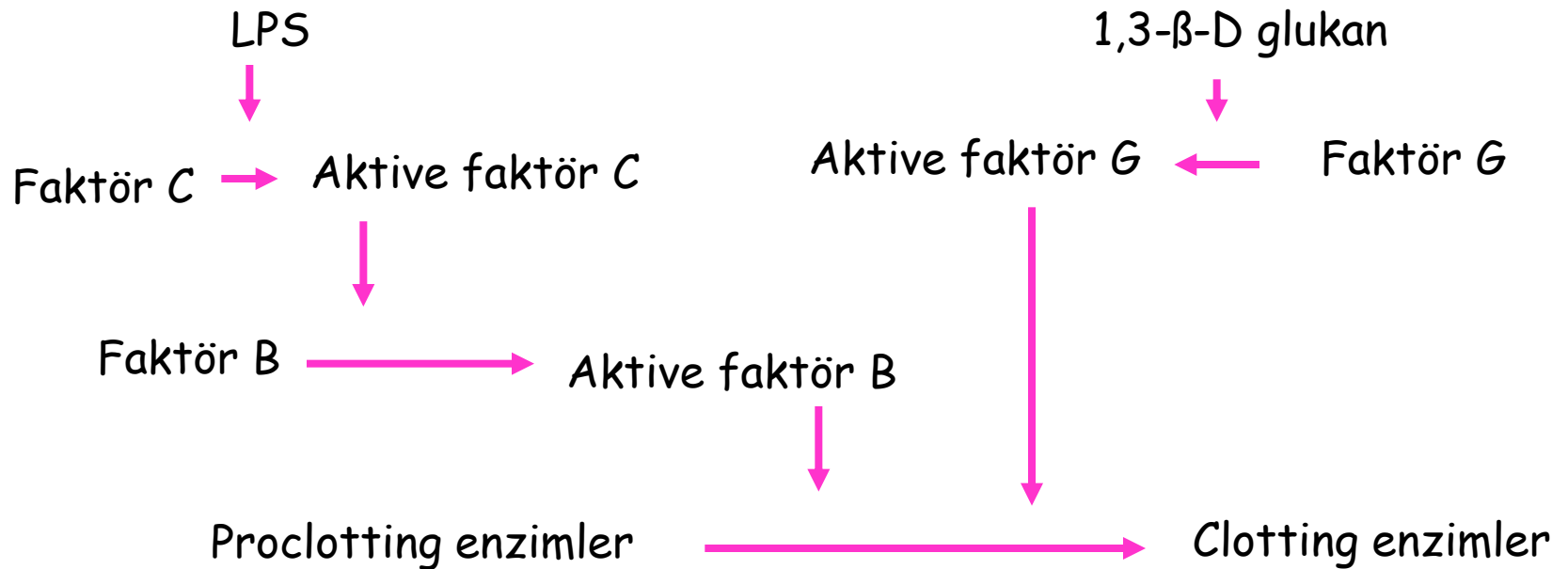


1,3- β -D glukan'ın Horseshoe crab amebositlerinden degranülasyona neden olur. Salınan serin proteaz zimogenler (faktör C ve faktör G) aktive olarak koagulasyonu harekete geçirirler



- *Limulus polyphemus*
- *Tachypleus tridentatus*

Limulus Testi (LAL)

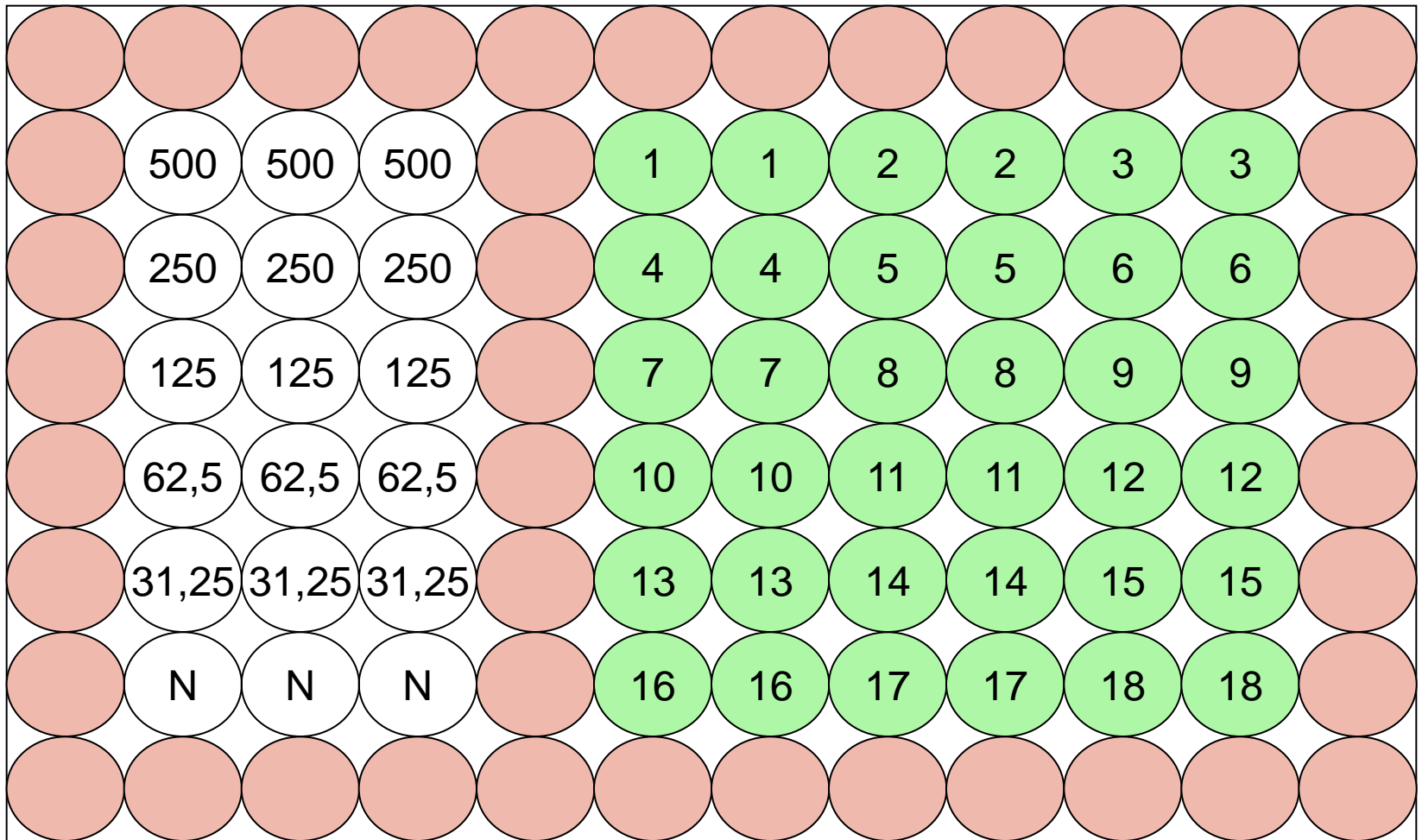


1,3- β -D Glukan Testleri

- β -glukan Wako test (Wako Pure Chemical Industries, Tokya)
- FungiTec G test (Seikagaku Corporation, Tokyo)
>20pg/ ml
- Fungitell test (Associates of Cape Code, USA)
<60pg/ ml; 60-79pg/ ml; \geq 80pg/ ml
- β -glukan test (Maruha Corporation, Tokya)

(1,3)- β -D Glukan

- İnsan serumunda bulunan serin proteaz inhibitörleri uzaklaştırılmalı
 - Triton X-100 veya 70°C 10dk (Wako)
 - Alkali uzaklaştırma (Fungitell)
- Endotoksin uzaklaştırılması
 - Polimiksin eklenmesi (Wako)
 - Faktör C eklenmesi (Fungitell)



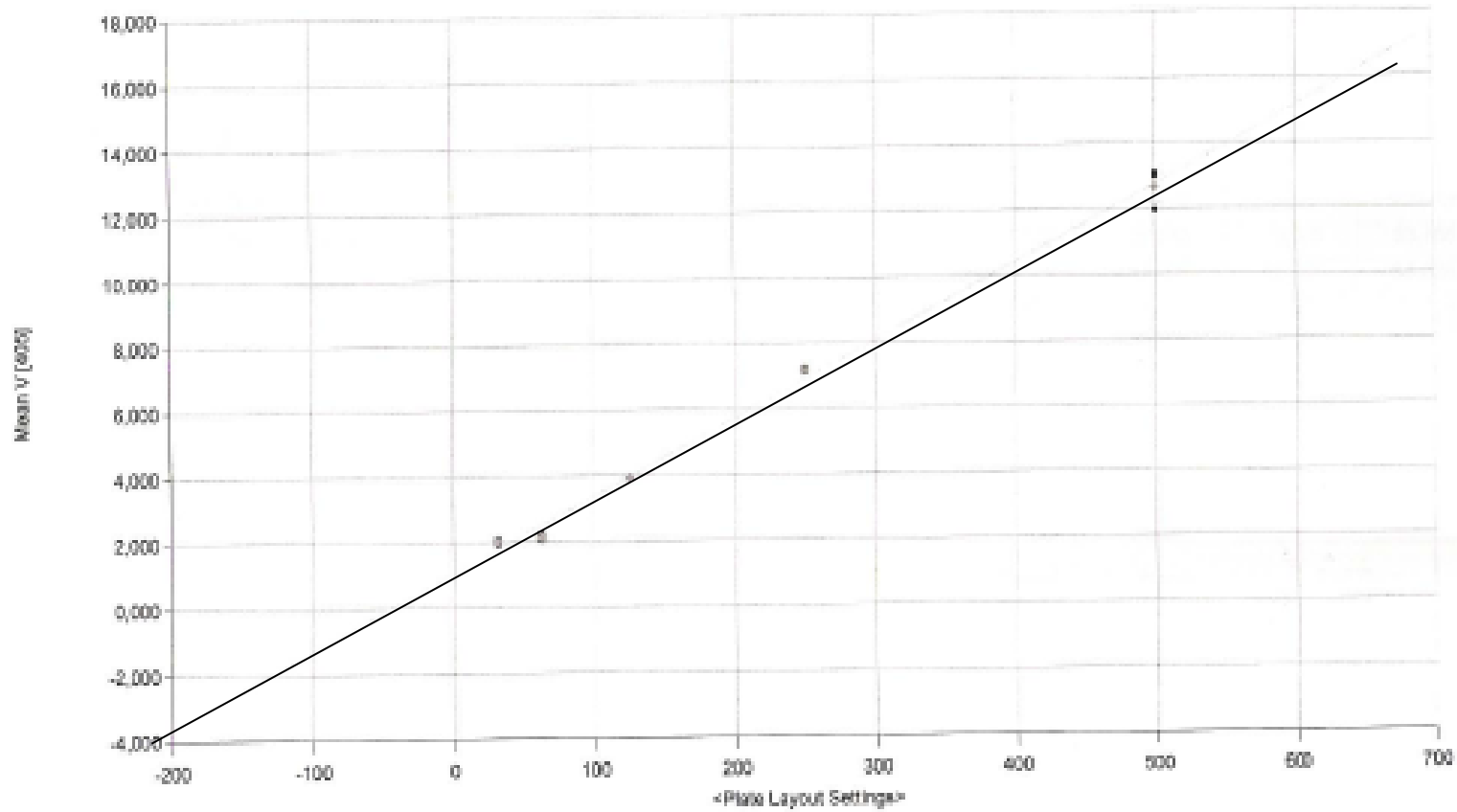
FUNGITELL TEST FOR INVASIVE FUNGAL INFECTION

Reading Date/Time:

09.12.2009 09:47:50

Curve

Curve



Fungitell - Test for invasive Fungal Infection

Reading Date/Time:

09.12.2009 09:47:50

Curve Fitting Results

Curve Name	Curve Formula	A	B	R ²
Curve	Y=A*X+B	0.0235	1.03	0.997

Conc

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													Conc
B		513,824	465,285	509,491		>887,500	17,716	52,032	95,533	5,523	509,468		Conc
C		283,587	259,283	260,643		125,999	14,112	<0,000	20,848	<0,000	33,755		Conc
D		123,403	123,111			2,175	6,052	39,352	<0,000	107,024	31,236		Conc
E		50,845	44,060	44,663		3,403	326,281	2,772	17,687	12,059	64,036		Conc
F		42,663	37,530	44,603		55,074	71,667	65,972	8,115	48,264	35,769		Conc
G		<0,000	<0,000	<0,000		15,761	20,227	62,358	71,636	33,657	39,439		Conc
H													Conc

Conc

Well ID	Name	Well	Conc/Dil	Mean V [405]	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)	
SPL1		B6		20,223	>887,500	2	>352,606 T	1334,8921	194,9761	2026
		B7		1,449	17,716					
SPL2		B8		2,255	52,032	2	73,782 T	21,751	29,479	2035
		B9		3,276	95,533					
SPL3		B10		1,163	5,523	2	257,498 T	261,973	97,856	2036
		B11		12,893	509,468					
SPL4		C8		3,991	125,999	2	70,065 T	55,943	79,856	2037

Maliyet Analizi

- SUT karşılığı yok
- 2007-2009 arası çalışıldı
- 290 hastaya ait yaklaşık 2000 test çalışıldı
- Kutu fiyatı: 6915 TL
- Bir kutu ile 42 test çalışılıyor
 - 36 test
- Bir test maliyeti 165 TL / 192 TL
- SUT karşılığı en az >200 TL / test olmalı

Testin Performansı



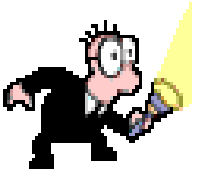
- Birçok çalışmaya göre duyarlılığı %80-100
 - Özgüllük %90
- NPD çok yüksek

Yalancı Pozitiflikler

- Hemodiyaliz
- Sirozlu hastalar
- Kardiyopulmoner by-pass
- Abdominal cerrahi sonrası (steril gazlar)
- Immungloblin tedavileri
- Antitümör polisakkarit kullananlar (lentinan, polisakkarit K, sizofilan)
- Hemolitik ve lipemik serumlar

(Galaktomannan Testi)

- *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri için önemli bir hücre duvarı komponenti (*Aspergillus fumigatus*)
- Ekzoantigen (ExA) olarak da ortama salınabilir
- Bir çekirdek ve bir yan zincirden oluşmuş
- Çekirdek (mannan): $\alpha(1,2)$ ve $\alpha(1,4)$ mannoz (mannan)
- Yan zincir (galaktofuran):
 - a: düz yapıda $\beta(1,5)$ galaktofuranoz ve $\beta(1,4)$ galaktopiranoz
 - b: dallanmış yapıda $\beta(1,5)$ ve $(1,6)$ galaktofuranoz

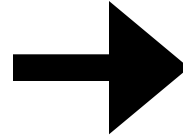


Galaktomannan Testi

- Jean-Paul Latge: Pasteur Enstitüsü Mikoloji bölümü
- Stynen ve Latge: Sığıçandan galaktomannan karşı monoklonal antikor hazırlanması (1990-1992)
- Bu antikor IgM yapısında (EB-A2)
- β (1,5) galaktofuranoz yan zincirindeki bir epitopu tanıyor. En az 4 epitop olmalı
- Bu epitop hücre içi, hücre dışı ve hücre duvarındaki yapıların hepsinde var

Monoklonal Antikor (EB-A2)

Çalışmalarda
denenmeye
başlandı

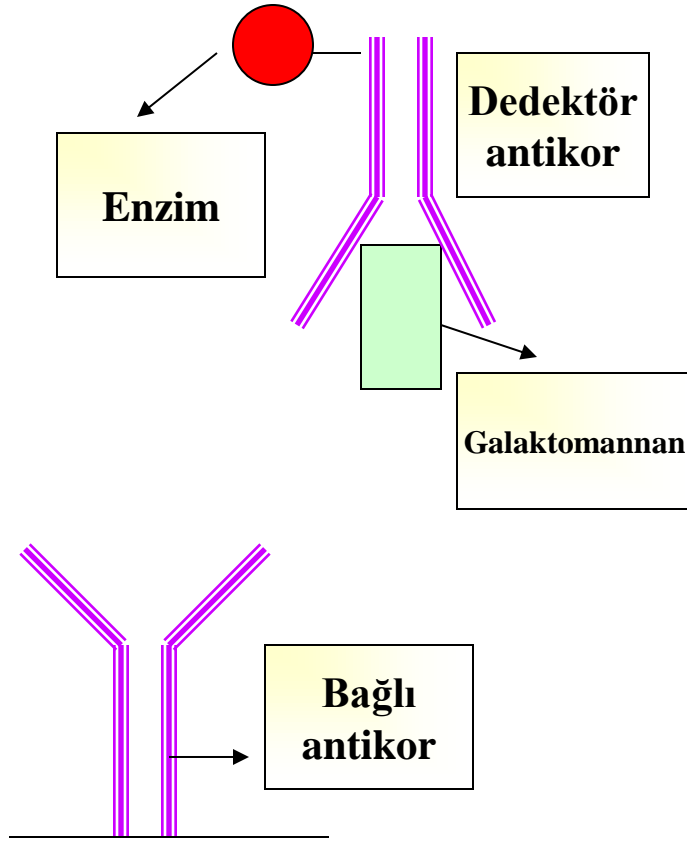


1999'da Avrupa'da
ticari kit olarak
kullanılmaya
başlandı



Mayıs-2003'de
FDA
onay verdi

Platelia Aspergillus (Bio-Rad)



- Tek basamaklı sandviç ELISA
- Sıçan monoklonal antikor (EB-A2)
- 0.5-1 ng/ml galaktomannan
 - LA: 15 ng/ml* (Pastorex Aspergillus; Sanofi Diagnostik Pasteur)
 - RIA: 10 ng/ml*
 - ELISA (inhibisyon): 4-5 ng/ml*
- En iyi sonuç serum ile alınıyor
- *BAL, BOS, idrar ?*
- Hastanın yatışından itibaren haftada iki kez çalışılması
- Üst üst gelen iki örnekte pozitiflik olursa IA açısından anlamlı kabul ediliyor
- Cut off değeri: 0.5

Galaktomannan testinin duyarlılığı

- Hematolojik malinite ve kemik iliği alıcıları
- Solid organ alıcıları
- Nötropenik olmayan hastalar
- Antifungal tedavi alanlar
- Lokal ve kronik enfeksiyonlar
- Yetersiz örnekleme
- Örneđin asit ile ön muamelesi

Duyarlılık %29-100

Testin Özgüllüğü (%90-95)

- Translokasyon
- *Bifidobacterium bifidum*
- Sitotoksik kemotöröpötik ilaçlar (Siklofosfamid)
- Piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam
- Oto-antikorlar (kronik GvHD, KC transplantasyonu)
- Renal yetmezlik ve diyaliz
- Testin tekrarlanabilirliği
 - Bizzini A et al. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 218-219
 - E. Furfaro et al. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: E38-E39.

Deneyim

- 2003 yılı-2013 yılı
- 27 000 örnek / >5000 hasta
- 96 kuyucuklu plaklar (8X12 strip)
- Bir kutuda 6 şişe kontrol çıkıyor
 - 2 pozitif kontrol (6 çalışmaya yeterli)
 - 2 negatif kontrol
 - 2 cut-off kontrol
- En az iki strip çalışılması gerekiyor (16 kuyu; 4 kontrol ve 12 hasta)

Maliyet analizi

- 2006 yılında kutu fiyatı: 400 TL
- 2012 yılında kutu fiyatı: 2100 TL
- SUT: 38 TL / test 43 TL / test
- $4+4+2+2 // 28 + 28 + 12+ 12= 80$ test
- $2100 / 80 = 26,25$ TL
- Bir kutu ile en az 72 test çalışılabililiyor
($12 \text{ serum} \times 6 = 72$ test)

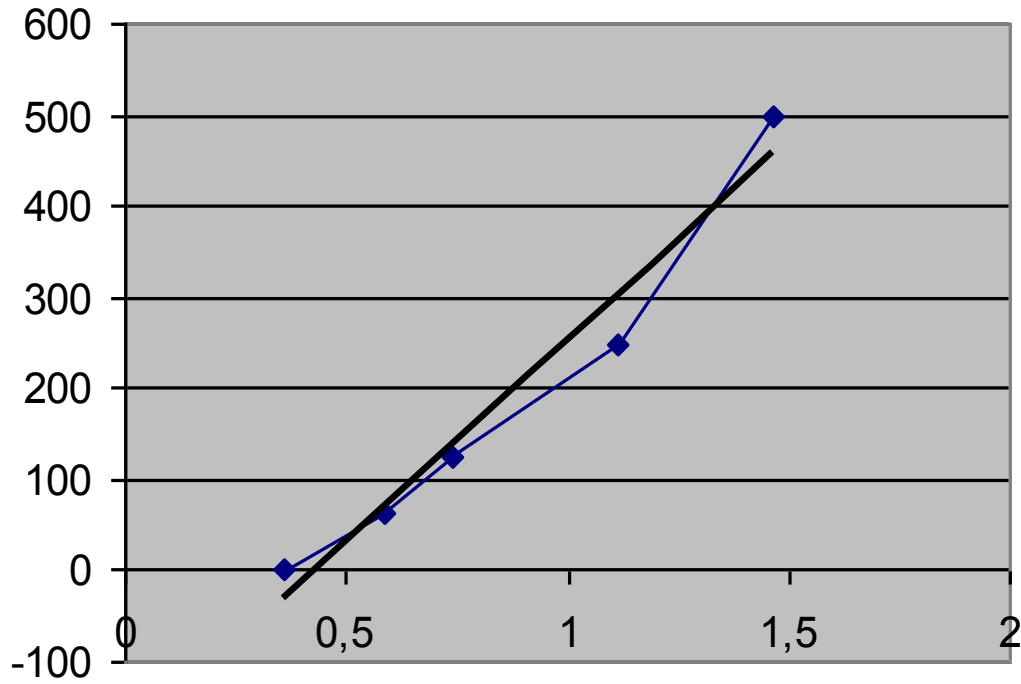
Antijen Tarama Testleri

Antijen	Metot	Ticari kit	Antikor
•Isiya dayanıksız Antijen	LA	(Cand-Tec) (Ramco)	Poliklonal
•Enolaz	Dot immunassay	Yok (Directigen BD)	Poliklonal
•Mannan	Dot immunassay LA ELISA EIA	Yok Pastorex Candida Platelia Candida Ag ICON	MAb MAb MAb Poliklonal
•Proteinaz	Com ELISA	Yok	Anti-SAP

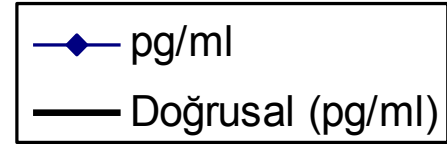
Antijen Tarama Testlerindeki Sorunlar

- Nötropenik olmayan hastalar
- Tek serumda çalışmak yetersiz
- Cut off değerleri *Cand-Tec*
 $\text{Cand-Tec} \geq 1/4, \geq 1/8, \geq 1/16$
- Mannan
<62,5 pg/ml negatif
62,5-125 pg/ml ara değer
>125 pg/ml pozitif

Grafik Başlığı



$$y = 441,64x - 189,22$$
$$R^2 = 0,9644$$



Ag-Ab Testlerini Kombine Kullanımı

- Cand-Tec ve İnd HA

Ag: duyarlılık %59 özgüllük %97

Ab: duyarlılık %53 özgüllük %86

Kombine: duyarlılık %100 özgüllük %84

Bar et al. Mycoses 2002

- Platelia Candida Ag ve Platelia Candida Ab

Ag: duyarlılık %40 özgüllük %98

Ab: duyarlılık %53 özgüllük %94

Kombine: duyarlılık %80 özgüllük %93

Yera H et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis

Mantar Enfeksiyonlarında Antikor Yanıtının Aranması

- Bağışıklığı baskılanmış hastalarda yeterli yanıt yok
- Kolonizasyon varlığında pozitif sonuçlar alınmakta

Antikor Tarama Testleri

- İmmundifüzyon
- Karşıt immunelektroforez (CIE)
- Kompleman fiksasyon
- İndirekt Hemaglütinasyon (Labor Diag)
- İndirekt immunfloresan
- RIA
- ELISA (Platelia Candida Ab)

Kullanılan antijenler

- Dipeptidil peptidaz
- Süperoksit dismutaz
- Katalaz
- Metalloproteaz
- Mitogillin
- Galaktomannoprotein



Rekombinant
antijenler

Hasta örneklerinde etkenin metabolitlerinin gösterilmesi

- D-arabinitol: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*
- D-mannitol: *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri
- D-arabinitol / L-arabinitol oranı
- D-arabinitol / kreatin oranı
- D-mannitol / kreatin oranı

Metabolit belirleme teknikleri

- **Enzimatik belirleme**
 - ArDH kiti (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
 - NAD-dep D-arabinitol dehidrogenaz (Enterobacter aerogenes)
 - Mannitol de substratı
- **Gaz kromatografi**
 - D/L arabinitol
 - Arabinitol/kreatin

Moleküler Testler

- PCR'a dayalı testler

- Standart PCR
- PCR-ELISA
- Nested PCR
- Real-time PCR

- Artmış duyarlılık
- Kısalmış zaman

- Ribozomal DNA (rDNA)

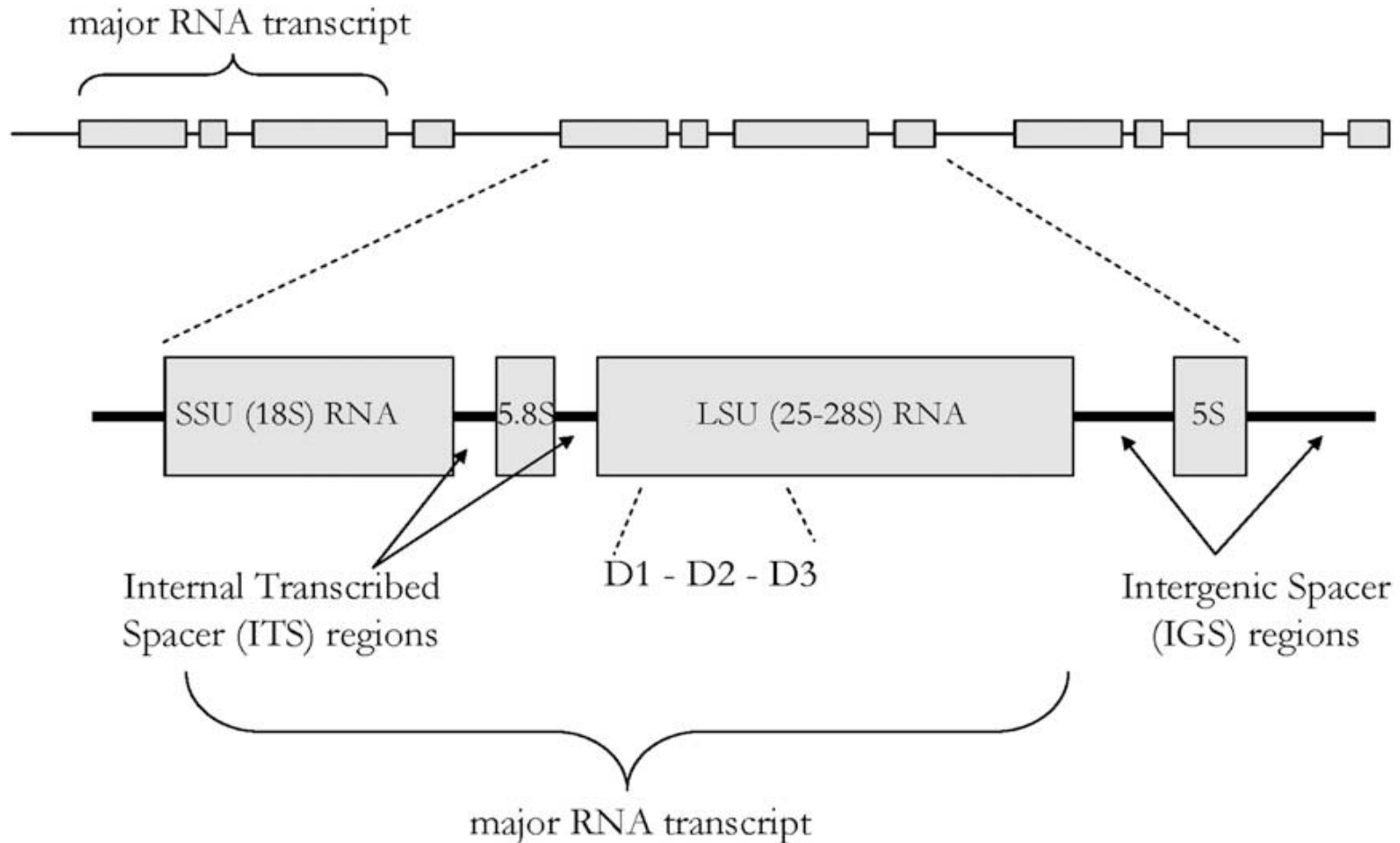
- 18S
- 5.8S
- 28S
- ITS1
- ITS2

- Duyarlılık %67-90
- Özgüllük %88-100

- Diğer genler

- Mitokondri genleri, tRNA, (Apo) cytochrome b, aktin, kitin sentetaz vb.

rDNA Bölgesi



Teknik Zorluklar

- Uygun klinik örnek
 - Tam kan, plazma, serum, BAL, doku
- Uygun miktar (sıvı örneklerde 200µl-10ml)
 - Örneklerde genellikle <10 CFU/ml
- DNA ekstraksiyonu ve pürifikasyonu
 - In-house yöntemler
 - Ticari kitler
 - Otomatik ticari kitler
- Primer seçimi
- Optimize ve standart tespit
- Tekniğin validasyonu
- Sonuçların yorumu

Kolonizasyonu ayırma

Kontaminasyon

SONUÇ

- Mantar enfeksiyonları hiçbir spesifik bulgusu olmaması nedeniyle tanısı en zor enfeksiyonlardan birisidir.
- Halen mikroskopik inceleme ve kültürü elimine eden bir yöntem bulunmamaktadır.
- Ancak mikroskopik inceleme ve kültürdeki üremelerin değerlendirilmesi deneyim gerektirmekte olup, bireysel farklılıklar sonuçlara yansımaktadır.
- Galaktomannan ve beta-glukan testleri invazif aspergilloz tanısında EORTC/MSG kriterlerine girmiştir
- Moleküler yöntemler çok yaygınlaşmış olmakla beraber standardizasyon ve validasyon eksikliği nedeniyle kriterler arasında bulunmamaktadır