

Febril Nötropenide Fungal Enfeksiyonların Tanısı

Dr Beyza Ener
14.12.2013

MANTARLAR

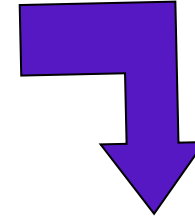
Doğada yaygın olarak bulunan, çoğu saprofit organizmalardır

Yüzeyel enfeksiyonlar

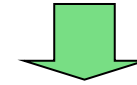


Dermatofitler

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

İnvazif Mantar Enfeksiyonlarında Tanı

- Klinik tanı
 - Belirti ve bulgular özgül değil
- Rutin laboratuvar bulguları
 - Özgül değil
- Görüntüleme yöntemleri
- Etyolojik tanı

Tanıda Mikroskopik İnceleme ve Kültür

- Laboratuara gelen örnekler önce ekilmelidir
- Ekimden sonra örneklerin direkt mikroskopik incelemesi yapılmalıdır

- Sıvı örnekler santrifüjlendiren
- Küretaj, drenaj, mukoid ve biyopsi örnekleri

- %10-20 KOH
 - Kalkoflor beyazı
 - %56 vs %24 (Blg)
 - %88 duyarlı, %99 özgül (BAL) vs %75 duyarlı (kültür)
- » Arendrup MC et al. BMT 2012

- PAS
- Gümüşleme
- HE

-
- Mantarın kesin belirlenmesi için
 - Antifungal duyarlılık için
 - Epidemiyolojik veri

- Erken tanı
- Kontaminasyonu ekarte etmek için

Biyobelirteçler

- Kapsül antijeni taranması (LA ve EIA)
 - *Cryptococcus* türleri
- Hücre duvarı antijenleri
 - β -glukan aranması (pan fungal)
 - Galaktomannan aranması (aspergilloz)
 - Mannan aranması (kandidoz)
- Özgül nükleik asit aranması
 - Spesifik veya panfungal PCR

Biyobelirteçleri tanıda kullanmanın hedefi

- Ampirik antifungal tedavi kullanımını azaltmak
- Mantar enfeksiyonlarının insidansı yüksek değil
 - Yoğun bakımlarda IFI insidansı=%0,6
 - Hematoloji hastalarında IA insidansı=%5-15
- Ancak mortalite yüksek
- Riskli hastalarda antifungal kullanımı %60'lara ulaşmakta

(1→3)-β-D-Glukan (BDG)

- Çoğu mantarın hücre duvarında bulunan heterojen bir moleküldür
- Limulus testi (LAL Test) ile ölçülmektedir. (kolorimetrik veya turbidimetrik metot)
 - Fungitell-GlucateLL test (80pg/ml) (Associates of Cape Cod)
 - Fungitec-G-Test MK (30pg/ml)
 - Fungitec G-Test (20pg/ml)
 - Wako β-Glucan (11pg/ml) (Wako Pure Chemicals)



Limulus polyphemus
[American horseshoe crab]



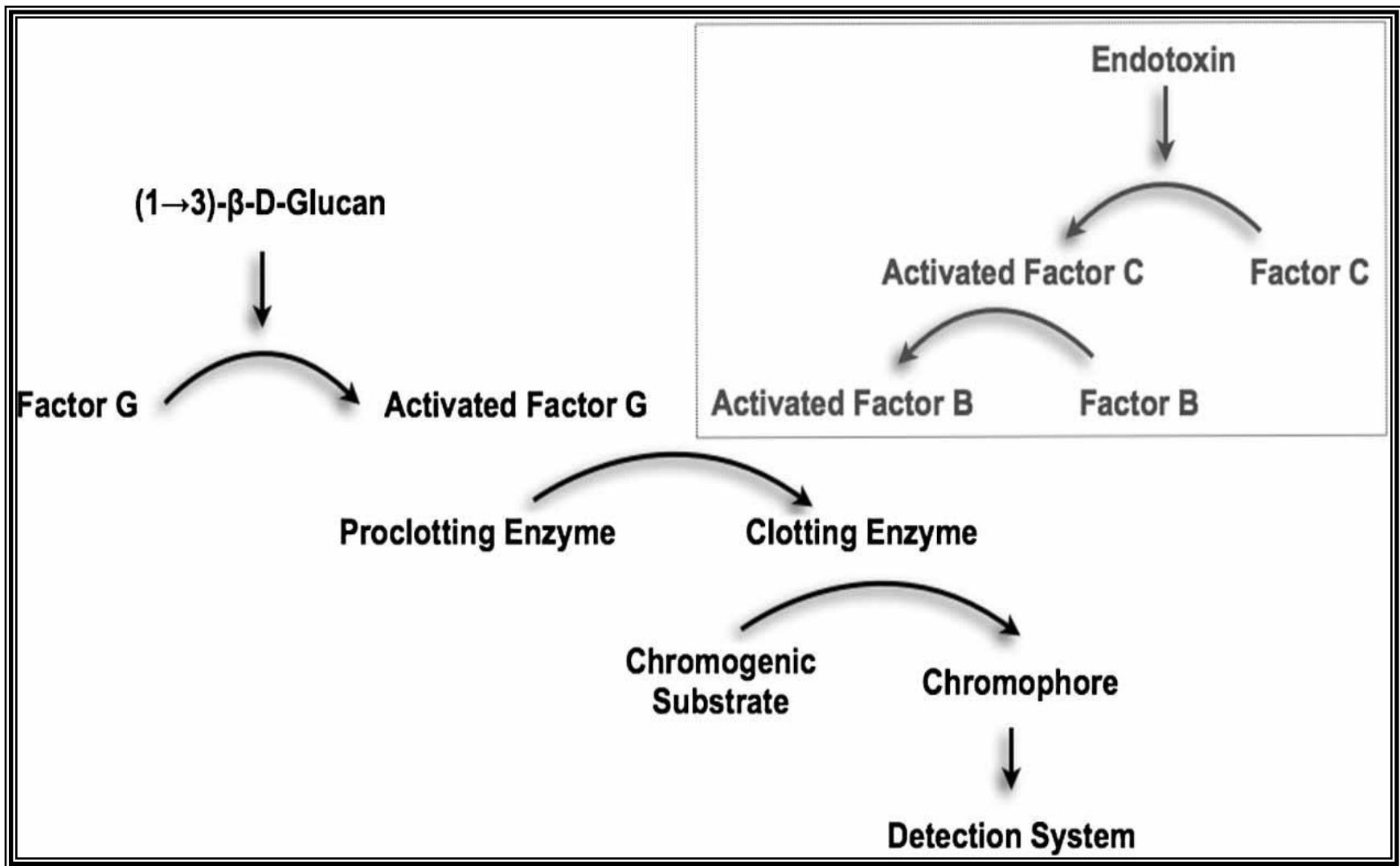
Tachypleus tridentatus
[Japanese horseshoe crab]



Amebositler



Serin proteaz (Faktör C ve Faktör G)



Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 1995; 345: 1720.

(1→3)-β-D-Glukan (BDG)

β-D-Glucan as a Diagnostic Adjunct for Invasive Fungal Infections: Validation, Cut-off Development, and Performance in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome

Zekaver Odabasi, Gloria Mattiuzzi, Elihu Estey, Hagop Kantarjian, Fumihiro Saeki, Richard J. Ridge, Paul A. Ketchum, Malcolm A. Finkelman, John H. Rex, Luis Ostrosky-Zeichner

Clin Infect Dis 2004; 39: 199-205

(1→3)- β -D-Glukan (BDG)

- Kompleks ve **pahalı** bir test
- Bir çok madde ile reaksiyona girerek **yalancı pozitiflik**
 - Selüloz membranlar
 - IV immune globulin, albumin, diğer kan ürünleri
 - Intra-abdominal ve intra-plevral kullanılan tekstil ürünler vs
 - IV kullanılan anti-mikrobikler
 - Gram pozitif bakteriyemiler (*Alcaligenes faecalis*)
- Duyarlılık ve negatif tanı değeri yüksek

İnvazif Aspergilloz Tanısında Galaktomannan

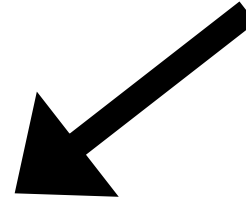
- >20 yıl
- En fazla deneyim
- Tedaviyi direkt etkileyecek klinik çalışmaların yapıldığı tek biyobelirteç

- **Maertens J, Theunissen K, Verhoef G et al.** Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1242-50.
 - Ampirik tedaviyi anlamlı olarak azaltıyor
- **Girmenia C, Micozzi A, Gentile G et al.** Clinically driven diagnostic antifungal approach in neutropenic patients: a prospective feasibility study. *J Clin Oncol* 2009; 29: 667-74.
 - Tedaviye yön veriyor, ancak net değil
- **Cordonnier C, Pautas C, Maury S et al.** Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1042-51.
 - Antifungal kullanımını azaltıyor, ancak IFI artırıyor

**1995’de ilk
kullanıldı**

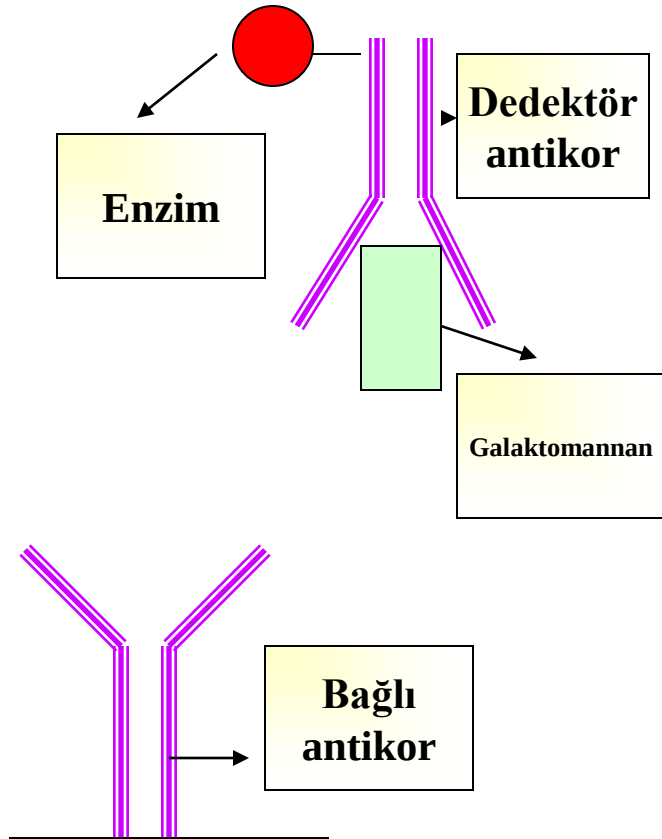


**1999’da Avrupa’da
ticari kit olarak
kullanılmaya
başlandı**



**Mayıs-2003’de
FDA
onay verdi**

Platelia *Aspergillus* Kitinin Özellikleri



- Tek basamaklı sandviç ELISA
- Sıçan monoklonal antikor
- 0.5-1 ng/ml galaktomannan
LA: 15 ng/ml
RIA: 10 ng/ml
ELISA (inhibisyon): 4-5 ng/ml
- En iyi sonuç serum ile alınıyor
BAL, idrar, BOS ?
- Hastanın yatışından itibaren haftada iki kez çalışılması
- Üst üst gelen iki örnekte pozitiflik (Optik indeks>0,5) olursa İA açısından anlamlı kabul ediliyor

BAL GM Cut-off Değeri

Systematic Review and Meta-Analysis of Detecting Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosing Invasive *Aspergillosis*

Mingxiang Zou^{1☯}, Lanhua Tang^{2☯}, Shushan Zhao^{2*}, Zijin Zhao², Luyao Chen², Peng Chen³, Zebing Huang⁴, Jun Li¹, Lizhang Chen⁵, Xuegong Fan⁴

PLOS ONE 2012, 7(8):e43347.

Cut-off= 1

BAL GM Cut-off Değeri

Detection of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples of Patients at Risk for Invasive Pulmonary Aspergillosis: Analytical and Clinical Validity

Jorien D'Haese,^a Koen Theunissen,^a Edith Vermeulen,^b H      Schoemans,^a Greet De Vlieger,^c Liesbet Lammertijn,^a Philippe Meersseman,^c Wouter Meersseman,^c Katrien Lagrou,^b and Johan Maertens^a

Department of Hematology, Acute Leukemia and Stem Cell Transplantation Unit,^a Department of Medical Diagnostic Sciences,^b and Department of General Internal Medicine, Medical Intensive Care Unit,^c Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Campus Gasthuisberg, Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium

J. Clin. Microbiol. 2012, 50(4):1258.

- $<0,5$ = %93,2 olasılıkla IPA değildir
- >3 = %100 olasılıkla IPA'dır

Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients

Harun Ağca,¹ Beyza Ener,^{1,*} Emel Yılmaz,² Ahmet Ursavaş,³ Esra Kazak,² Vildan Özkocaman,⁴ Ezgi Demirdöğen Çetinoğlu,³ Aslı Görek Dilektaşlı,³ Halis Akalın,² Fahir Özkalemkaş⁴ and Rıdvan Ali⁴

¹Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey, ²Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey, ³Department of Chest Diseases and Tuberculosis, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey and ⁴Haematology Unit, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey

Mycosis 2013; doi:10.1111/myc.12126

BAL Kültür negatif 811 örnek

- %62,7' sinde cut off $>0,5$
- %24,7' sinde cut-off >1

Table 3 Galactomannan optical density index relative to culture results.

Sample/patient group	Mean	Median	Minimum	Maximum
Bronchial lavage, culture positive (<i>n</i> = 87)	5.62	5.30	0.46	14.48
Bronchial lavage, culture negative (<i>n</i> = 640)	1.34	0.73	0.14	16.14
Bronchoalveolar lavage, culture positive (<i>n</i> = 47)	4.74	3.05	0.62	13.53
Bronchoalveolar lavage, culture negative (<i>n</i> = 653)	0.95	0.51	0.02	13.99
All samples, culture positive (<i>n</i> = 134)	5.33	4.16	0.46	14.48
All samples, culture negative (<i>n</i> = 1293)	1.18	0.63	0.02	16.14
Neutropenic patients, culture positive (<i>n</i> = 67)	5.18	3.99	0.47	11.98
Neutropenic patients, culture negative (<i>n</i> = 435)	0.23	0.23	0.14	13.54
Non-neutropenic patients, culture positive (<i>n</i> = 67)	5.39	4.03	0.44	14.27
Non-neutropenic patients, culture negative (<i>n</i> = 858)	1.03	0.64	0.02	16.14

Maliyet analizi

- 2006 yılında kutu fiyatı: 400 TL
- 2013 yılında kutu fiyatı: 2000 TL
- SUT: 38 TL/test; 43 TL/test
- En fazla 92 test çalışılabilir ($2000/92=21,7\text{TL}$)
- $4+4+2+2 // 28 + 28 + 12+ 12= 80$ test ($2000/80 = 25 \text{ TL}$)
- Haftada iki kez
- Aynı gün ya da bir gün sonra sonuç veriliyor
- Bir kutu ile en fazla 6 çalışma yapılabiliyor
- Bir kutu ile en az 50 test çalışılmalı

Galaktomannan testinin duyarlılığı

- Hematolojik malinite ve kemik iliği alıcıları
- Solid organ alıcıları
- Nötropenik olmayan hastalar
- Antifungal tedavi ve proflaksi alanlar
- Lokal ve kronik enfeksiyonlar
- *A. fumigatus* ile gelişen enfeksiyonlar
- Yetersiz örnekleme
- Örneğin asit ile ön muamelesi

Duyarlılık %29-100

Table 2 *Aspergillus* species grown on culture of bronchial lavage and bronchoalveolar lavage fluids and mean galactomannan optical density (OD) index.

<i>Aspergillus</i> species	Positive samples	Mean OD index
<i>A. fumigatus</i> complex	80	5.11
<i>A. flavus</i> complex	28	4.66
<i>A. niger</i> complex	18	4.94
<i>A. terreus</i> complex	4	7.11
Mix growth ¹	4	9.39
Total	134	5.34

¹One *A. fumigatus* complex and *A. flavus* complex; one *A. fumigatus* complex and *A. niger* complex; two *A. fumigatus* complex and *A. terreus* complex.

Testin Özgüllüğü

- Translokasyon
- Çapraz reaksiyonlar (*Penicillium, Fusarium*)
- Sitotoksik kemoterapötik ilaçlar (Siklofosfamid)
- Piperasilin-tazobaktam, ampisilin-sulbaktam
- Oto-antikorlar (kronik GvHD, KC transplantasyonu)
- Renal yetmezlik ve diyaliz

Testin özgüllüğü (>%90)

Fatal breakthrough infection with *Fusarium andiyazi*: new multi-resistant aetiological agent cross-reacting with *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay

Nesrin Kebabcı,¹ Anne D. van Diepeningen,² Beyza Ener,³ Tuba Ersal,⁴ Martin Meijer,² Abdullah M.S. Al-Hatmi,² Vildan Özkocaman,⁴ Ahmet Ursavaş,⁵ Ezgi D. Çetinoğlu⁵ and Halis Akalin¹

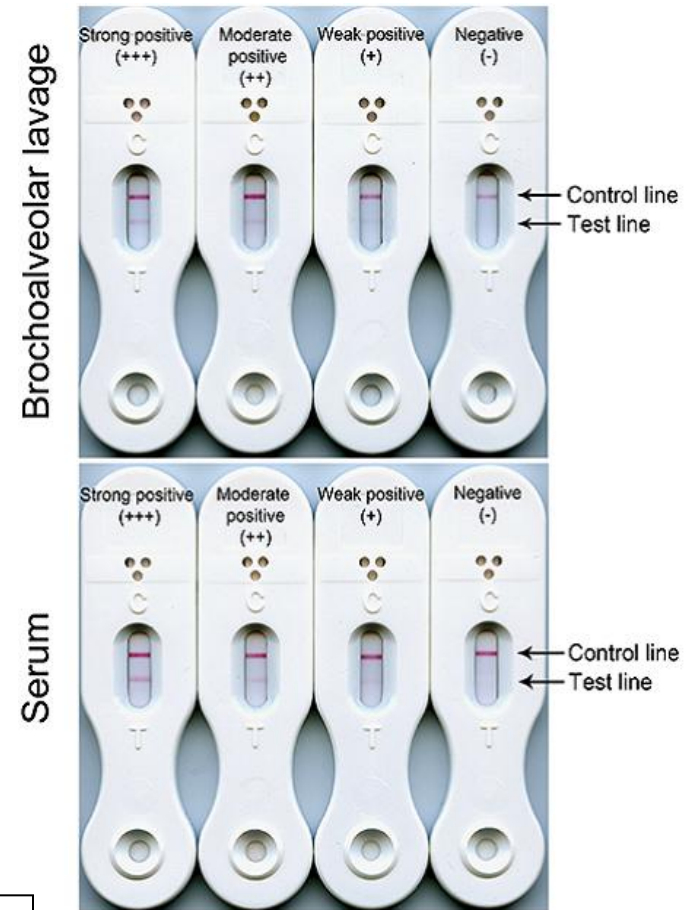
¹Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Uludağ University, Bursa, Turkey; ²CBS-EHAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; ³Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Uludağ University, Bursa, Turkey; ⁴Faculty of Medicine, Department of Hematology, Uludağ University, Bursa, Turkey and ⁵Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Uludağ University, Bursa, Turkey

Lateral Flow Device (LFD)

- İmmunkromotografi prensibini kullanmakta
- *Aspergillus* tarafından salgılanan glikoproteine karşı oluşturulmuş monoklonal antikor (JF5 IgG3) kullanmakta
- *Aspergillus* türlerine oldukça spesifik
- Özel ekipman gerektirmiyor
- 10-15 dakikada sonuçlanıyor
 - a point-of-care (POC) test

1- White PL et al. JCM 2013; 51:1511

2- Wiederhold NP et al. JCM 2013; 51:459



Mannan Antijeni ve Anti-mannan antikoru

- *Candida* hücre duvarının önemli bir molekülü
- *Candida albicans*'da kuru ağırlığının %7
- Mannan ve anti-mannan antikorlarını tespit için değişik yöntemler
- Son olarak ELISA
- Mannan antijenemisi, anti-mannan varlığında azalıyor
- Kombine kullanımı
- Seri kullanımı

Mannan Antijeni ve Anti-mannan antikor

- Kandidemi ve kronik dissemine kandidoz enfeksiyonlarında önerilmekte (European Conference on Infection In Leukemia=ECIL)
- ELISA ile çalışan kiti var (Platelia *Candida*)

Mannan antijeni

- <62,5 pg/ml negatif
- 62,5-125 pg/ml ara değer
- >125 pg/ml pozitif

Anti-mannan antikor

- < 5AU/ml negatif
- 5-10 AU/ml ara değer
- ≥ 10 AU/ml pozitif

- Mannan antijeninin SUT karşılığı var
- Özgüllük ve duyarlılık ile ilgili sıkıntılar var

14 çalışma, 453 hasta, 767 kontrol

	Mannan Ab	Mannan Ag	İkisi beraber
Duyarlılık	%58	%59	%83
Özgüllük	%93	%83	%86

European Conference on
Infections In Leukemia (ECIL)

- ECCMID 2011
- Mikulska M et al. Crit Care 2010

Uludağ Üniversitesi Deneyimi (Hicran Akın ve ark 2013)

128 çalışma grubu

- 72 kandidemili hasta
 - 63 non-nötropenik
 - 9 nötropenik
- 30 bakteriyemili hasta
- 26 sağlıklı kontrol

Tüm Hastalar (128 hasta)

	Duyarlılık	Özgüllük	PPV	NPV
Mannan Ag	31,9	76,8	63,9	46,7
Anti-mannan Ab	81,9	46,4	66,3	66,7
Her ikisi (+)	20,8	89,3	48,4	46,7
Herhangi biri (+)	93	33,9	64,4	88,1

	Mannan Ag (+)	Mannan Ab (+)
Nötropenik hasta (9)	6 (%66,7)	2 (%22,2)
Non-nötropenik hasta (63)	17 (%27)	57 (%90,5)
Bakteriyemili ve sağlıklı kontrol (56)	13 (%23,2)	30 (%53,6)

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.

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 tespiti
- Tekniğin validasyonu
- Sonuçların yorumu

Kolonizasyonu ayırma

Kontaminasyon

Candida enfeksiyonlarında Ticari PCR Sistemi (Septifast)

- Sepsisli hastalarda hızlı tanıya yönelik test
- Kandidemileri de saptayabiliyor
- Ancak çok az sayıda veri var
- ECIL tarafından tanıda kullanılması önerilmiyor

Candida enfeksiyonlarında in-House PCR

- Çok sayıda çalışma var
- Avni T et al. JCM 2011 meta analiz
- 54 çalışmada, 4694 hasta, 963'ü proven/probable/possible
- Toplam duyarlılık %95, toplam özgüllük %92 olarak bulunmuş
- Proven/probable hastalarda %85 pozitiflik
- Kan kültürü %29-46
- ECIL tarafından önerilmiyor
- EORTC/MSG kriterlerine alınamıyor

Aspergillus enfeksiyonlarında in-House PCR

- Meta analiz
 - Mengoli C, et al. Lancet Infect Dis 2009
- Duyarlılık %75, Özgüllük %87
- White ve ark. standardizasyon çalışmaları (European Aspergillus PCR Initiative)
 - White PL et al. JCM 2010
 - White PL et al. JCM 2011
 - Torelli R et al. LCM 2011
 - White PL et al. JCM 2011

Myconostica MycAssay
Aspergillus

Meta analizler

	Duyarlılık	Özgüllük
Galaktomannan	%78	%81
BDG (<i>Aspergillus</i>)	%77	%85
PCR (<i>Aspergillus</i>)	%75	%87
Mannan-Antimannan	%83	%86
BDG (<i>Candida</i>)	%64	%84
PCR (<i>Candida</i>)	%95	%92

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

- Hematoloji BD
 - Rıdvan Ali
 - Fahir Özkalemkaş
 - Vildan Özkocaman
- Göğüs hastalıkları AD
 - Ahmet Ursavaş
 - Ezgi Demirdoğen Cetinoğlu
 - Aslı Görek Dilektaş
- Enfeksiyon Hastalıkları AD
 - Halis Akalın
 - Reşit Mıstık
 - Esra Kazak
- Mikoloji BD
 - Beyza Ener
 - Burcu Dalyan Cilo

