

İnvaziv Fungal İnfeksiyonların Tanısında Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

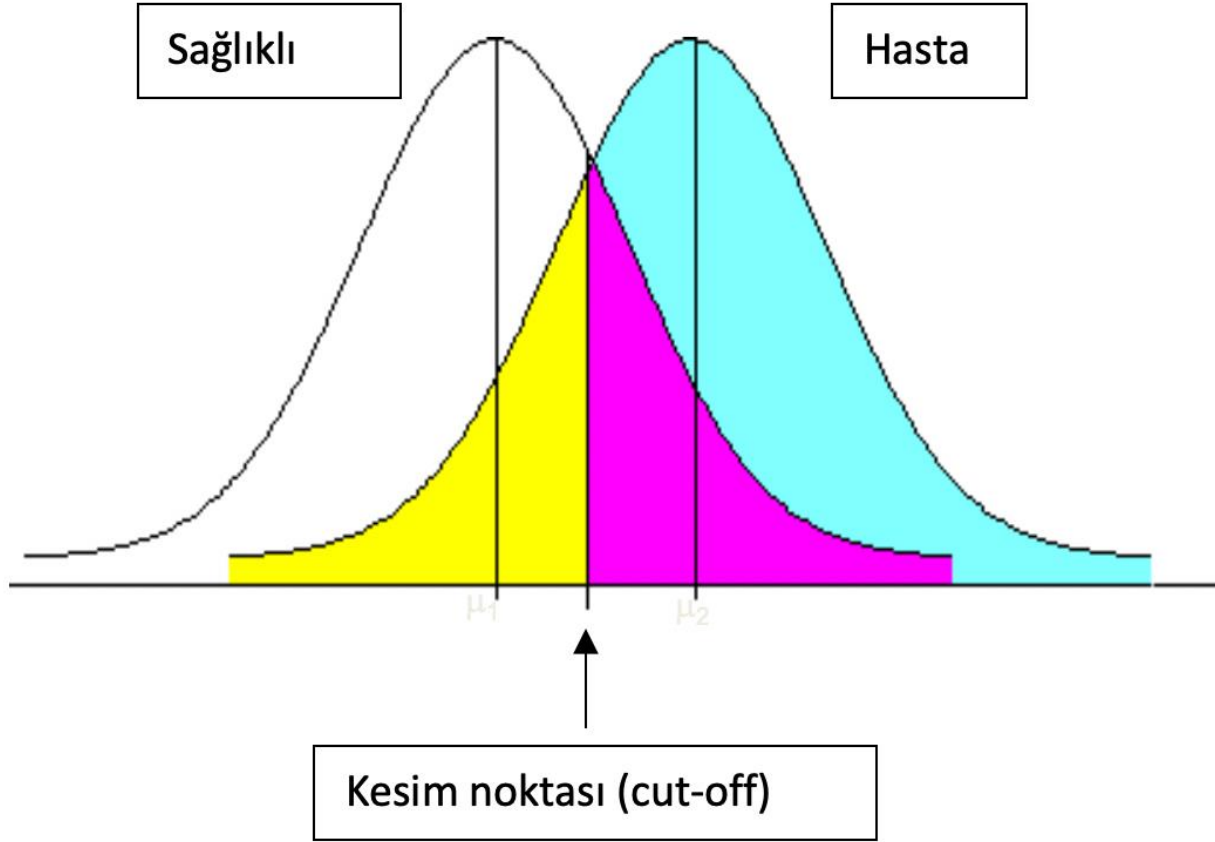
Dr. Alpay AZAP

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

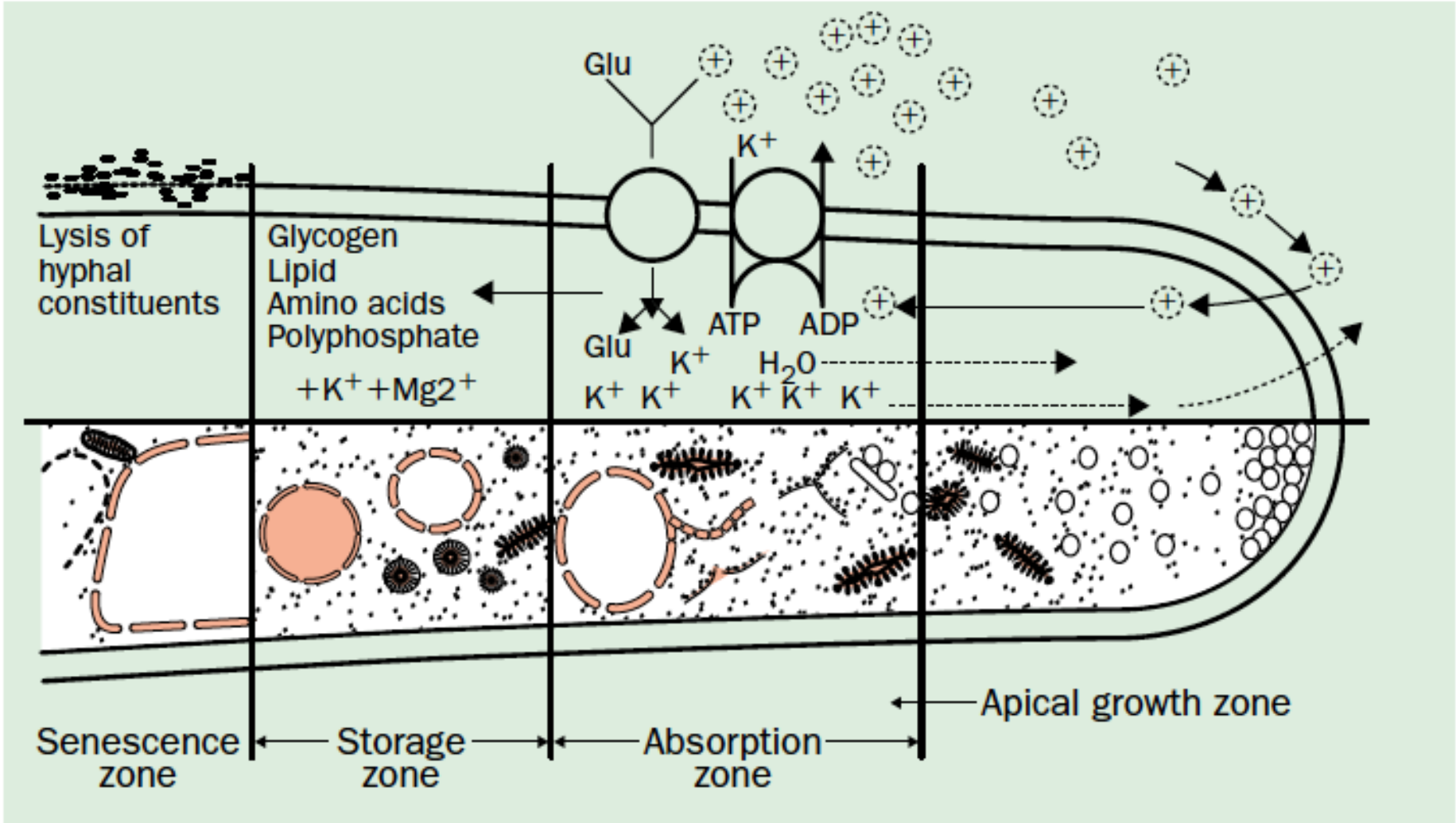
- ✓ Galaktomannan
- ✓ Beta-D Glukan
- ✓ Lateral Akım Yöntemi
- ✓ Mannan-Antimannan
- ✓ PCR
- ✓ Görüntüleme
- X Histopatoloji



- Yalancı pozitif
- Yalancı negatif
- Duyarlılık
- Özgüllük

Biyolojik Belirteçler : Galaktomannan

- Aspergillus türlerinin hücre duvarında yer alır.
- Aktif (hızlı) üreme sırasında dış ortama salgılanır
- GM düzeyi dokudaki mantar yükü ile orantılı



Sandwich-ELISA

A

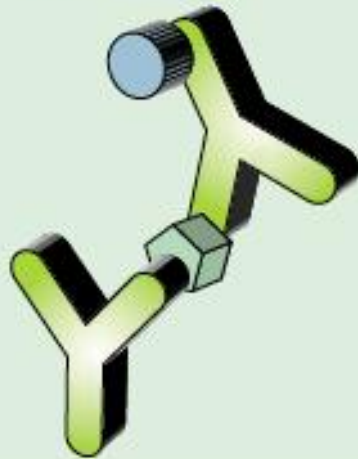


Rat monoclonal antibody EB-A2



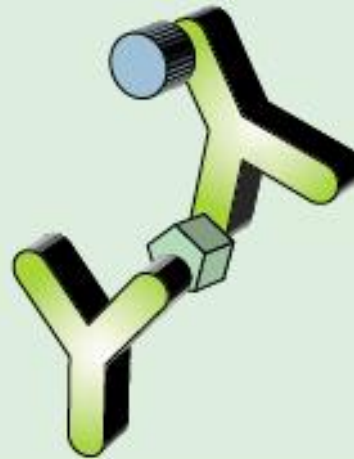
B

Rat monoclonal antibody EB-A2
+ peroxidase



C

Chromogen



D



Galaktomannan testinin performansını etkileyen faktörler

- Hasta grubunun özellikleri
- Altta yatan hast ve imm baskılanma derecesi
- İA prevalansı
- İA tanım kriterleri
- Beslenme faktörleri
- Yarı sentetik beta-laktam AB tedavi
- Enfeksiyonun yeri
- Enfeksiyon bölgesindeki mikro-çevre
- Enfeksiyona sebep olan *Aspergillus* türü
- Salınan GM'nin moleküler konfigürasyonu
- Renal klirens ve hepatik metabolizma
- GM antikor varlığı
- Örnek alma stratejisi (sıklık)
- Örneklerin saklanması
- Örneğin işlenmesi
- Laboratuvarın deneyimi
- Antifungal ajana maruziyet

Lancet Infect Dis 2004;4: 349-57

Bone Marrow Transplant 2012;47:846–854

Klinik Örneklerin Saklanması

- Klinik örneklerde Aspergillus türlerinin canlılığını koruması için örnek laboratuara ulaşana kadar -kısa süreli- 4°C'de saklanmalı (AIII)
- Serumda veya BAL/BL örneklerinde GM'nin parçalanmasını engellemek (yanlış negatif sonuçları önlemek) için örnek lab'a ulaşır ulaşmaz çalışılmalı. Serumun 4°C'de -kısa veya uzun süreli- saklanmasından kaçınılmalı (AI)

NOT: Serum 4°C'de -kısa veya uzun süreli- saklandığında GM parçalanır. BAL sıvısında GM daha uzun süre stabil kalır

Serum ve BAL -20°C'de saklandığında GM'nin 11 ay değişmeden kaldığı gösterilmiştir.

Serum Galaktomannan:

Bir defa ≥ 0.7 ODI, ardışık iki defa ≥ 0.5 ODI : POZİTİF

Duyarlılık: % 60-80 Özgüllük: %80-95

Cochrane Database Syst Rev 2008; 4: CD007394
Clin Infect Dis 2006; 42: 1417–27

- Hematolojik kanserli hastalar
 - Duyarlılık= %58 (%95 CI; 52-64)
 - Özgüllük= %95 (%95 CI; 94-96)
- Kök hücre alıcıları
 - Duyarlılık= %65 (%95 CI; 60-78)
 - Özgüllük= %65 (%95 CI; 44-83)
- Solid organ alıcıları
 - Duyarlılık= %41 (%95 CI; 21-64)
 - Özgüllük= %85 (%95 CI; 80-89)



EFISG

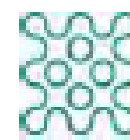
ESCMID FUNGAL INFECTION
STUDY GROUP

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Diagnostic Group

2014 ESCMID *Aspergillus* Guideline

Katrien Lagrou, Dieter Buchheidt, Malcolm Richardson, Manuel Cuenca-Estrella, Chris Kibbler, Claus Peter Heussel, Markus Ruhnke, Mauritio Sanguinetti, Jürgen Löffler, Catherine Beigelman-Aubry, Cornelia Lass-Flörl



Blood galactomannan

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Prolonged neutropenic patients and allogeneic stem cell transplantation recipients not on mold-active prophylaxis	To diagnose invasive aspergillosis	Galactomannan in blood	A	I	Highest test accuracy requiring 2 consecutive samples with an OD index ≥ 0.5 ; prospective monitoring should be combined with HRCT and clinical evaluation
		Draw samples every 3-4 days	C	III	
Patients with a hematological malignancy •Neutropenic patients •Non-Neutropenic patients	To diagnose invasive aspergillosis	Galactomannan in blood	A	II	Significant lower sensitivity in non-neutropenic patients
			B	II	

İA tanısı için hematolojik kanseri olan hastalarda kan GM düzey takibi önerilir.

Nötropenik hastalar için öneri düzeyi: AII

Nötropenik olmayan hastalar için öneri düzeyi: BII

NOT: Nötropenik olmayan hastalarda duyarlılık daha düşüktür.

Yoğun bakım hastalarında ve Solid organ nakil alıcılarında İA tanısı için kanda GM bakılabilir (CII)

NOT: YBÜ hastası nötropenikse başarı daha yüksek

SOT alıcılarında duyarlılık düşük, özgüllük yüksek. Verilerin çoğu akciğer alıcılarından

GM düzeyi dokudaki mantar yükü ile orantılı
GM kinetiği ???

CLINICAL OBSERVATIONS, INTERVENTIONS, AND THERAPEUTIC TRIALS

Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation

Johan Maertens, Jan Verhaegen, Katrien Lagrou, Johan Van Eldere, and Marc Boogaerts

Blood 2001;97:1604-1610

30 kanıtlı İA olgusu;
24 ünde GM yüksekliği devam etmiş, daha da artmış: Tamamı eksitus
6'sında GM düşmüş: 4'ü sağ, biri hemoptizi, biri bakteriyel pnömoni
nedeniyle eksitus

Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Increasing Antigenemia Is Associated with Progressive Disease

François Boutboul,¹ Corinne Alberti,² Thierry Leblanc,³ Annie Sulahian,¹ Eliane Gluckman,⁴ Francis Derouin,¹ and Patricia Ribaud⁴

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, ²Département de Biostatistique Médicale, ³Service d'Hématologie Pédiatrique, and ⁴Service de Greffe de Moelle, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Clinical Infectious Diseases 2002; 34:939–43

Allo HSCT yapılan ve GM ölçümü olan 37 hasta

Yanıtsızlık kriteri: GM düzeyinde bazal değerin üzerine 1.0 ODI'lik artış olması

7. günde: Duyarlılık: %44, Özgüllük: %87, ppv: %94

14. günde: Duyarlılık: %55, Özgüllük: %92, ppv: %92

Yanıt veren/vermeyen gruplar arasında başlangıç GM düzeyleri farklı değil

ORIGINAL ARTICLE

ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients

O Marchetti^{1,6}, F Lamothe^{1,6}, M Mikulska², C Viscoli², P Verweij³ and S Bretagne^{4,5} and the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups⁷

“Several studies have shown that the course of the GM index during antifungal therapy is predictive of the outcome. Persistent GM antigenemia during therapy is a poor prognostic sign and should prompt clinical reassessment”

“Decreased sensitivity has been reported during exposure to mould-active antifungal agents, for instance in patients receiving posaconazole or voriconazole prophylaxis which may prevent the circulation of GM”

BAL Galaktomannan

Duyarlılık: % 85-90 Özgüllük: %90-95

Akciğer aspergillozu tanısı için tüm hasta gruplarında BAL GM düzeyi ölçümü önerilir (All)

NOT: En doğru eşik değeri: 0.5-1.0 arasında

<0.5 İA tanısını dışlamak için yeterli

>3 ise PPD %100

J Clin Microbiol 2012; 50: 1258–63

PLoS One 2012; 7: e43347

J Antimicrob Chemother 2017; 72 Suppl 1: i19–i28

Beyni tutan İA için BOS'ta GM ölçümü yapılabilir (BII)

NOT: Eşik değeri henüz belli değil!
(0.5-2.0 ODI : %88 Duyarlılık, %96 Özgüllük)

Akciğer dokusunda GM tayini yapılabilir (BII)

NOT: Eşik değeri 0.5 olduğunda duyarlılık %90, özgüllük %95
SF içinde dilüe edilmiş doku kesitleri kullanılarak yapılabilir

Biyolojik Belirteçler: Beta-D-Glukan

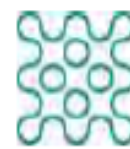
Pek çok mantar türünün hücre duvarında bulunan heterojen bir molekül

Limulus lizat testi ile ölçülür (zor bir test)

- Fungitell-GlucateLL test (80pg/ml)
- Fungitec-G-Test MK (30pg/ml)
- Fungitec G-Test (20pg/ml)
- Wako β -Glucan (11pg/ml)

Biyolojik Belirteçler: Beta-D-Glukan

- Optimal cut-off ?
- Tarama ? Tanı ?
- İFi lehine karar vermek için kaç kez pozitif olmalı?
- Hangi hasta grubu ?
- Kan dışındaki örnekler ?
- Pan-fungal test olduğu için ardışık kullanım?
- Antifungal profilaksi/tedavi etkilenmesi ?
- Antifungal tedavinin izlenmesi ?



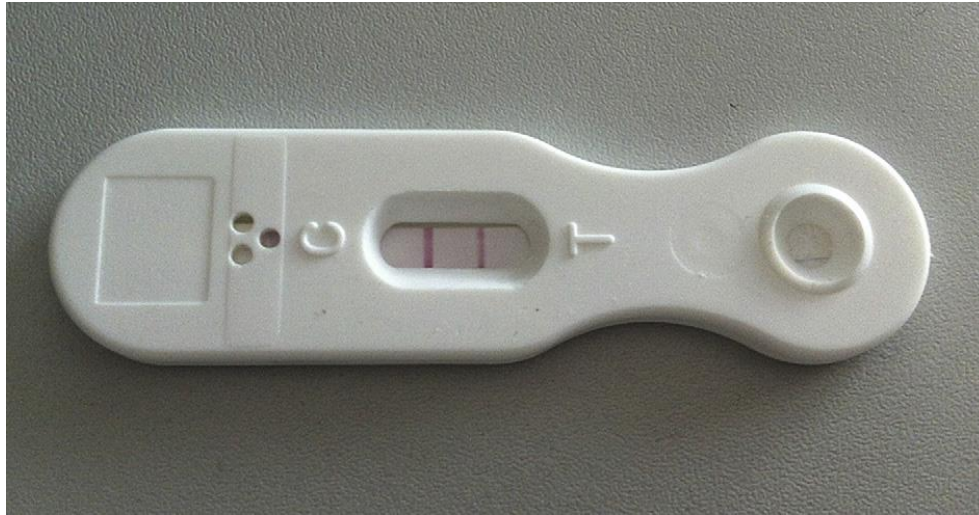
Diagnostic Tools - B-D-glucan Assay

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
Mixed population: Adult ICU, Hematological disorders, SOT	To diagnose IFD (not specific for aspergillosis)	Diagnostic assay	C	II	4 different assays; Fungitell FDA approved and available in US and Europe; others only available in Japan; overall sensitivity of 77% and specificity of 85% Specificity limits its value in this setting Two or more consecutive samples: sensitivity = 65%, specificity = 93%; studies included once to thrice weekly
		Screening assays	C	II	Varies with assay and cut- off: Wako assay sensitivity = 40-97%, specificity = 51-99%

	Galaktomannan	1,3 beta-D-Glukan
Spektrum	Aspergillus Fusarium Penicillium	Panfungal Mukorales Ø Kriptokok Ø
Metod	Sandwich ELISA Latex agglutination	Kalorimetrik
Sınır Değer (serum)	0.5-1.5 ODI	Fungitell® 80 pg/ml Diğerleri:11-30 pg/ml
Sınır Değer (BAL)	1	-
Erken tanı	5-8 gün	3-10 gün
Serum		
Duyarlılık	%29-100	%47-98
Özgüllük	%20-100	%86-98
BAL		
Duyarlılık	%56-100	%50-93
Özgüllük	%76-100	%55-73
Tedavi takibinde yeri	Var	Yok
Maliyet	Az pahalı	Çok pahalı

Lateral Akım Yöntemi (Lateral-Flow Device)

Aspergillus türlerinin aktif çoğalma aşamasında salgıladıkları ekstraselüler glikoproteine karşı geliştirilen monoklonal antikor (JF5) kullanılarak gerçekleştirilen immünkromatografik yöntem.



- Aspergillus spesifik, hızlı (15-20 dk), az teknoloji isteyen bir test
- Farklı materyallere (BAL, serum) uygulanabilir
- Hasta başında yapılabilir

BAL LFD:

27 Hematolojik kanserli, 10 SOT alıcısında BAL sıvısında

Yüksek olasılıklı İA için:

Duyarlılık: %100 Özgüllük %81, PPV:%71, NPV:%100

Çelişkili/arada sonuçlar veren hastaların tamamı AF tdv altında

J Infect 2012;65:588-91

Evaluation of Real-Time PCR, Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and a Novel Lateral-Flow Device for Diagnosis of Invasive Aspergillosis

P. Lewis White,^a Christian Parr,^{a,b} Christopher Thornton,^c Rosemary A. Barnes^b

103 hematolojik kanserli hasta, 529 serum örneği

Serumda LFD performansı PCR ve GM ile karşılaştırılabilir düzeyde

Duyarlılık: %81.8 (PCR:%95.5, GM:%77.3)

Özgüllük %98 (PCR:%96.6, GM:%91)

PCR+LFD: Duyarlılık %100, Özgüllük:%100

J Clin Microbiol 2013;51:1510-6

“Performance of Galactomannan, Beta-d-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis”

Hoenigl M et al. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):2039-45.

- 78 bağışıklığı baskılanmış hasta 78 BAL örneği,
- 3 kanıtlı, 14 yüksek olasılıklı, 17 düşük olasılıklı İA, 44 non-İA
- Kültür dışındaki yöntemlerin duyarlılığı %70-88
- GM + LFD: Duyarlılık %94 Özgüllük %95
- GM + PCR: Duyarlılık %100 Özgüllük %98

ESCMID-EFISG LFD önerisi:

İnvaziv Aspergilloz tanısında:

Hematolojik kanseri /solid organ nakli olan hastalarda BAL'da LFD BIII

HKHN alıcılarında serumda LFD BIII

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda BAL'da LFD BII

Biyolojik Belirteçler : Mannan-AntiMannan

İnvaziv kandida infeksiyonlarında yeri var

Tek başlarına uygulandıklarında:

Duyarlılık: %58 & %59

Özgüllük: %93 & %83

Birlikte uygulandıklarında (ikisinden birinin pozitif olması):

Duyarlılık: %83

Özgüllük: %86

C. albicans infeksiyonlarında duyarlılık daha yüksek

Kültür sonuçlarından 6-7 gün önce sonuç alınır

Hematoloji hastalarında:

Duyarlılık: %71-100

Özgüllük: %53-92

Crit Care 2010;14:222

J Med Microbiol 2009;58:606-15



Review Article

Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips

Rosemary A. Barnes¹, P. Lewis White^{2,*}, C. Oliver Morton³,
Thomas R Rogers⁴, Mario Cruciani⁵, Juergen Loeffler⁶
and J. Peter Donnelly⁷

Avrupa Aspergillus PCR İnisiyatifi (EAPCRI) (2006)

Tam kan, serum ve plazma için standartlar belirlenmiş durumda. BAL: Bekleniyor

Plazma: Duyarlılık %91, erken pozitiflik sağlar

Plazma ile tarama ardından Tam Kan PCR ile doğrulama önerilir:

Negatif + Negatif: Ekarte edilebilir (NPD:%100)

Pozitif + Pozitif: Tanı kesine yakın (PPD: %96-100)

Küf etkili AF profilaksi veya tedavi alan hastalarda;

ESCMID-EFISG önerisi:

Serumda GM tayini önerilir AII (profilaksi alanlarda duyarlılık düşer),

GM + PCR yapılabilir CII (PCR standardı olmadığı için öneri gücü düşük)

Serumda BDG tayini önerilir BII (standartları henüz kesinleşmiş değildir)

Görüntüleme:

Manyetik Rezonans İnceleme (MRI):

Işın yok, kontrast maddeler daha güvenli

İnceleme uzun ve zahmetli

Hava nedeniyle görüntüler artefaktlı

Beyin tutulumu şüphesi varsa Kranial MRI önerilir

PET BT

Sınırlı sayıda çalışma var

Zahmetli

Negatif prediktif değeri yüksek

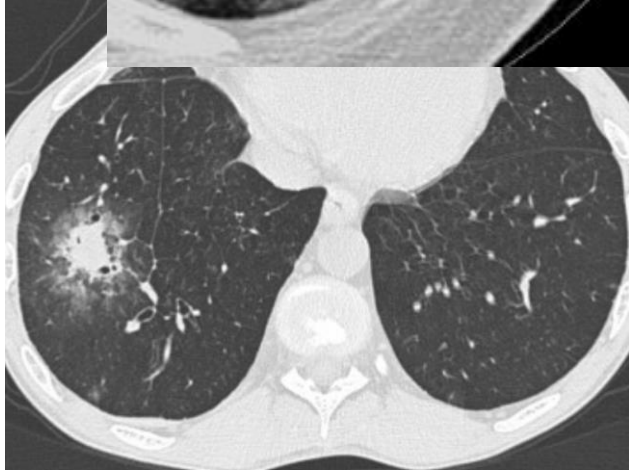
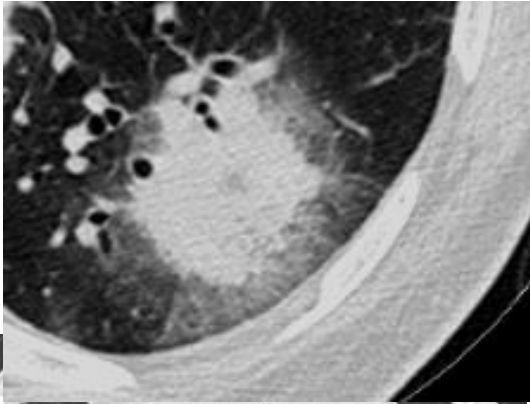
Akciğer BT

Bulgular geç ortaya çıkar, çabuk kaybolur: 1. gün:%88-96, 7. gün:22-37

%60-95 olguda tespit edilebilir. Nötropenik olmayan hastalarda daha düşük!

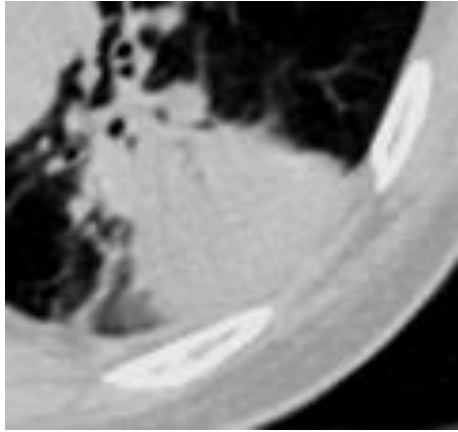
Hale

0 – 5 g



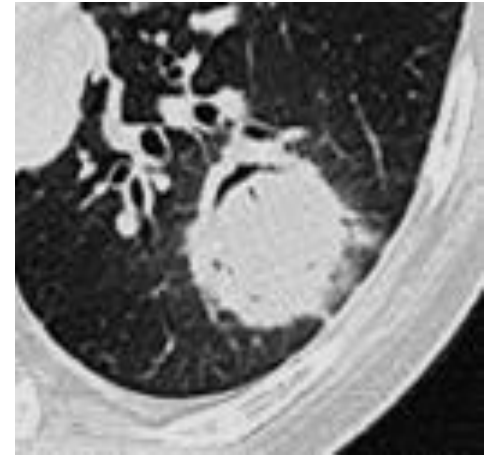
Konsolidasyon

5 – 10 g



Hava-hilal

10 – 20 g



Kavite

Spesifik değil, aşırı tanı konabilir.

Fungal İnfeksiyon:

mukormikoz

fusarium

aspergilloz



Nokardia, Mikobakteri, Aktinomikoz

Septik emboli (Pseudomonas, Klebsiella, S. aureus)

Solid tümör (metastaz?)

Kollajen doku hastalığı: Wegener, Sarkoidoz

Viral infeksiyon: RSV, CMV

Paraziter İnfeksiyon: Toxocara

Ters Hale Belirtisi



- Fungal İnfeksiyonlar:
Mukormikoz, Aspergilloz
- Bakteriyel İnfeksiyonlar:
Pnömonokok, Legionella, Chlamydia
- Tüberküloz
- Kollajen doku hst.:
Wegener, Sarkoidoz, Dermatomyozit
- Lenfamatoid granülomatoz
- Organize pnömoni



Akciğer BT

PA Akciğer Grafisi/BT



Normal!

Radyolojik Görüntü	Akut/Hızlı (<12-24s)	Subakut-kronik
Nodüler infiltrat	Bakteriyel pnömoni (legionella dahil) Fungal (aspergilloz) CMV (nadiren) PCP (nadiren)	Nokardiya Mantarlar (endemik mikozlar) Mikobakteriler Kaposi sarkomu Castleman Hastalığı Akciğer kanseri/metastaz
Adenopati	Tüberküloz Cryptococcus neoformans PTLD	PTLD Kaposi sarkomu Castleman Hastalığı Akciğer kanseri
Plevral efüzyon	Bakteriyel pnömoni Postoperatif Ampiyem Tüberküloz	İlaçlar
Pnömotoraks	PCP	-

KÜLTÜR

GM/BDG

BT

PCR

LFD

