

SIK GÖRÜLEN SİSTEMİK MİKOZLARDA SEROLOJİK TANI

Süleyha HİLMİOĞLU-POLAT

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir,
(suleyha.hilmioglu.polat@ege.edu.tr)**

Son yirmi-otuz yılda bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sayısındaki artışla birlikte, sistemik mantar infeksiyonlarının görülme sıklığı da artmıştır. Etken olan mantarların cins ve tür düzeyinde dağılımı değişmekle birlikte hala en sık görülen mantar hastalıkları kandidozlar ve aspergillozlardır. Bu hastalarda semptomlar genellikle özgül değildir, kolonizasyonu invazif hastalıktan ayırmak kolay değildir ve erken tanı hayat kurtarıcı olmasına rağmen altta yatan hastalıkları nedeni ile biyopsi gibi derin örneklerin alınması her zaman olanaklı değildir. Temel mikolojik tanı testleri olan mikroskopik inceleme ve kültürün her hastada yapılması koşul olmakla birlikte başarısı ancak % 50 civarında olup zaman alıcıdır. Moleküler tanı testleri ümit vericidir ancak standardizasyona gereksinimleri vardır. Tüm bu nedenlerle günümüzde invazif olmayan serolojik tanı testleri daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak sistemik mikozların tanısında bu tanı yöntemlerinin hiçbiri tek başına kesin tanı koydurucu olmadığından hastanın durumuna göre bu testlerin kombinasyonu önerilmektedir. Serolojik testler mantar hastalıklarının tanısı yanında hastalığın gidişini ve sağaltıma yanıtı izlemek amacı ile de kullanılmaktadırlar (1-5).

Sistemik kandidozların serolojik tanısı

Sistemik kandidozların serolojik tanısında antikor arama testleri yüz güldürücü sonuçlar vermemiştir. Sadece kolonizasyon olması durumunda antikorların saptanması testlerin özgüllüğünü düşürmektedir. İmmün baskılı hastalarda invazif kandidozda bile antikor oluşmaması veya sağaltıma bağlı düzeylerinin azalması testlerin duyarlılığını düşürmektedir. Kandidoz kliniği bulgularının varlığında, ardışık alınan serumlarda antikor titresinin artmaya devam etmesi infeksiyon lehine değerlendirilebilir. Ayrıca antijen testleri ile kombine değerlendirildiklerinde tanıya yardımcı olabilirler (1, 5-7).

Serumda veya vücut sıvılarında mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler sistemik mantar infeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla ısıya duyarlı antijen, manan, D-arabinitol ve enolaz araştırılmaktadır (1, 6, 7). Günümüzde en yaygın kullanılan mannan antijen testidir (5-8).

Mannan; *Candida* hücre yüzeyinin, infeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Dolaşımdan çabuk temizlenir ve kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir (9-15). Kandidemili hastalarda *Candida albicans* fungemisinde duyarlılığı % 77 iken *C. glabrata* fungemisinde % 64 olarak bildirilmiş ve kan kültürü üremesinden 3-4 gün önce olumlu bulunmuştur (9). Yüksek riskli hastalarda antikor testleri ile birlikte yapıldığında duyarlılık ve özgüllüğün tek başına yapıldığından daha yüksek olduğu (5-7), nötropenik hastalarda *C.tropicalis'* in etken olduğu fungemilerin erken tanısında yararlı olduğu (15) ve ayrıca Beyin-Omurilik-Sıvısı (BOS)'ünün incelendiği küçük çaplı bir çalışmada *Candida* meninjitlerinin tanısında etkin olduğu bildirilmektedir (5).

D-arabinitol aslında bazı *Candida* türlerinin metabolik ürünüdür. Sistemik kandidozlu hastaların idrarında düzeyi artar. D-arabinitol testinin duyarlılığı % 50 civarındadır. Ayrıca *C. krusei* ve *C. glabrata* bu metaboliti üretmediklerinden bu iki etkenin infeksiyonlarında saptanmaz (1, 5, 11).

Enolaz biraz daha ümit verici bir antijen olup duyarlılığı % 54-75 olarak bildirilmiştir. Ardışık alınan kanlarda aranmasının duyarlılığı artıracağı kabul edilmektedir. Ayrıca enolaz *Candida* türlerine oldukça özgül olup yüzeysel kandidozlarda serumda saptanmaması bir avantajdır (7).

B-D-Glukan testi sadece kandidozlara özgü olmayıp *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki mantarları aramaya yönelik olduğundan konunun sununda ortak olarak tartışılacaktır.

Kriptokokkozun serolojik tanısı

Cryptococcus neoformans'ın kapsül polisakkaritini saptayan ve rutinde yaygın olarak kullanılan lateks aglütinasyon (LA), Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) ve Enzyme Immuno Assay (EIA) testleri en güvenilir serolojik testlerdir. Piyasada beş farklı ticari kit bulunmaktadır. Kriptokok meninjitinde BOS incelemesinde duyarlılığı % 95, sistemik kriptokokkozda serumda ise duyarlılığı daha düşüktür. Romatoit faktör varlığında, yaygın trikosporozda, *Capnocytophaga canimorsus* sepsisinde ve kanserlilerde yalancı olumluluk görülebilir (1, 5). Serum ve BOS'ta kapsül antijenini saptamada EIA kitinin de en az lateks aglütinasyon kiti kadar başarılı olduğu ve ayrıca romatoit faktör varlığında yanlış olumlu sonuç vermediği bildirilmiştir (5).

Sistemik aspergillozların serolojik tanısı

İnvazif aspergilloz (İA) tanısında antijen arama testleri 1970'li yıllarda başlamıştır. 1990'lı yıllara kadar süren çalışmalar sonucunda LA, Radio Immuno Assay (RIA), EIA ve sandviç ELISA yöntemleri geliştirilmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan ELISA testi [Platelia Aspergillus®(BioRad Laboratories, Marnes, Fransa)]'dir. 1999'dan itibaren Avrupa'da, 2003'ten itibaren de Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanıma girmiştir. Bu test EB-A2 rat monoklonal antikoları ile dolaşımdaki galaktomannan (GM) (*Aspergillus* hücre duvarının karbonhidrat komponenti) antijenlerini 0.5-1 ng/mL'ye kadar saptamaktadır ki bu değer LA testinin saptama değerinden 10-15 kez düşüktür (1, 5-7, 12, 13, 16-18).

Değişik çalışmalarda değişik hasta gruplarının alınmasına, uygulama farklılıklarına bağlı olarak bildirilen duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD)'ler farklılık göstermekte, bu durum da çalışma sonuçlarının karşılaştırılmasında güçlükler neden olmaktadır. Özgüllük ve duyarlılığın çalışmalar arasında farklı olmasının nedenlerinden biri de test için kullanılan cut-off değerinin farklı olması ve tek ya da ardışık gelen iki serum olumluğunun kabul edilmesidir. Bu konuda hala bir fikir birliği oluşmamıştır ve farklı merkezlerde 0.5, 0.7, 1 ve 1.5 gibi farklı cut-off değerleri kabul edilmektedir (16-30).

Günümüzde genel olarak testin Bronko-Alveoler Lavaj (BAL) sıvılarında duyarlılığının % 80, özgüllüğünün % 94'e ulaştığı ve yanlış olumluluk oranının % 8 olduğu bildirilmiştir (16). Tanı amacı ile GM antijen arama testine ilişkin çalışmalar giderek artan bir ivme kazanmıştır. İnvazif aspergillozu histopatoloji ve kültürle kanıtlanmış hematolojik maligniteli hastalarda

duyarlılık ve özgüllük sırası ile % 92.6, % 95.4 ve PPD % 93 NPD ise % 95 olarak belirlenmiştir (16-19).

Serumda galaktomannan, aspergillozun klinik hastalık tabosunun ortaya çıkmasından 5-8 gün önce ve yüksek çözünürlüklü tomografide de bulguların saptanabilecek düzeye ulaşmasından önce olumlu bulunmaktadır. *Aspergillus*'a bağlı meninjit olan bir hastada 45 gün önce olumlu bulunmuştur. Antijenin idrarda da saptanabilmesine karşın farmakokinetiği ve böbrekten atılımı, hastalığın ilerlemesi ile ilişkisi ve yanlış olumluluğuhakkında kesin bilgi yoktur (16-30).

Önceden antifungal profilaksi uygulanan hastalarda, cut off değerinin düşük alındığı durumlarda, haftada iki kezden daha seyrek kan alındığında, testte kullanılan kan miktarı az olduğunda ve test edilecek kan uzun süre saklandığında yanlış olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Buna karşın otoantikoru olanlarda, bazı antibiyotiklerin kullanıldığı hastalarda, bakteremide, küçük bebeklerde ve diyaliz hastalarında yanlış olumlu sonuçlar alınmaktadır (1, 5, 7, 16-30). Tüm bunlara rağmen yapılan birçok çalışma GM testinin İA tanısında yardımcı olduğu ancak tek başına tanı testi olarak kullanılmaması gerektiği; klinik bulgular ve diğer tanı testleri ile birlikte kullanıldığında anlamlı olacağı kanısını doğurmuştur. Hematolojik maligniteli ve özellikle kemik iliği nakli yapılan hastalarda, İA tanısında diğer hasta gruplarından daha yararlı olduğu kabul edilmiştir (16-30).

Sistemik mantar hastalıklarının serolojik tanısında (1-3)-β-glukan testi

(1-3)-β-glukan *Candida* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere birçok maya ve küf mantarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür. *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ve *Acremonium* gibi nadiren sistemik hastalık etkeni olan mantarlarda da bulunur. Buna karşın *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* cinslerinde ya bulunmaz ya da saptanamayacak kadar azdır. Prokaryotlar, virüsler ve insanda bulunmaz. Denizde yaşayan ve "horseshoe crab" denilen bir canlıdan elde edilen faktör G, β-glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon verir. β-glukan testi bu kimyasal etkileşim temelinde geliştirilmiştir (31).

İkisi kromojenik esaslı biri kinetik esaslı olmak üzere üç ticari kiti bulunmaktadır Cut off değerinin 20 pg/mL olarak alındığı ve febril epizottaki hematolojik maligniteli hastalarda yapılan ilk çalışmalarda duyarlılığı % 90, özgüllüğü % 100 bulunmuştur (8).

Haftada iki kan örneğinin alındığı, cut off değerinin 60 pg/mL olarak ve tek serum olumluluğunun kabul edildiği lösemili ve myelodisplastik sendromlu hastalarda, testin duyarlılığı ve NPD'i % 100 bulunmuş ve profilaktik veya ampirik antifungal kullanımının testi etkilemediği görülmüştür (34). Ayrıca ağız kandidozlu ve mantar kolonizasyonlu olgularda da testin olumsuz olduğu bildirilmiştir. Beta glukan testi ile çalışmalar artarak sürmekle birlikte deneyimler henüz yeterli değildir. Çalışmalarda seçilen hasta popülasyonlarının, diğer tanı kriterlerindeki spektrumların, hastalardan alınan serum sayılarının ve kabul edilen cut off değerlerinin farklılığı çalışmaların karşılaştırmalı değerlendirilmesinde güçlüğe neden olmaktadır (31-38).

Testte kullanılan, hasta örneği ile temas edecek tüm gereçlerin endotoksin ve glukan içermeyen yapıda olması gerekmektedir ve pahalı bir testtir. Tanı spektrumunun geniş olması bir avantajı iken tür belirleyememesi bir dezavantajdır. Hemodiyaliz hastalarında, sirozlularda, anti-tümör polisakkaridi verilenlerde ve karın ameliyatlarından sonra yalancı olumluluklar görülebilmektedir (31-38). Henüz aydınlatılması gereken sorunlar olmasına karşın glukan testi umut verici bir test gibi görünmektedir.

Kaynaklar

1. Yeo SF; Wong B. Current status of nonculture methods for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 464-485.
2. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005; 366: 1013-1025.
3. Verweij PE. Diagnosis of invasive fungal infections. *Hematology* 2005; 1: 235-238.
4. Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Invasive fungal infection – laboratory diagnosis and antifungal treatment. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 178-188.
5. Willinger B. Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections *current Drug Targets* 2006; 7: 513-522.
6. Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transplant Infect Dis* 2006; 8: 128-139.
7. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in hemato-oncology patients. *Br J Haematol* 2004; 126: 289-297.
8. Kondori N, Edebo I, Mattsby-Baltzer I. *Candida albicans* cell wall antigens for serological diagnosis of candidemia. *Med Mycol* 2003; 41: 21-30.
9. Rimek D, Redetzke K, Singh J, Heinrich K, Kappe R. Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia. *Mycoses* 2004; 47: 23-26.
10. Rimek D, Redetzke K, Steiner B, Podbielski A. Experience with the platelia® *Candida* ELISA for the diagnostics of invasive candidosis in neutropenic patients. *Mycoses* 2004; 47: 27-31.
11. Bar W, Beyreiß B, Rebentisch G, Juretzek T. Diagnosis of systemic *Candida* infections. Evaluation of serology, molecular biology and D-arabinitol detection. *Mycoses* 2004; 47: 32-37.
12. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2181-2187.
13. Allan EK, Jordanides NE, McLintock LA, et al. Poor performance of galactomannan and mannan sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of invasive fungal infection. *Br J Haematol* 2005; 128: 578-579.
14. Fujita S, Takamura T, Nagahara M, Hashimoto T. Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidemia. *J Med Microbiol* 2006; 55: 537-543.
15. Sendid B, Caillet D, Baccouch-Humbert B, et al. Contribution of the platelia *Candida* –specific antibody and antigen test to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* 2003;41: 4551-4558.
16. Hummel M, Buchheidt D. Molecular and serological diagnosis of invasive aspergillosis: new answers to old questions. *Mycoses* 2007; 50: 18-23.
17. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Eldere JV. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses* 2007; 50: 2-17.
18. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 2007; 163: 191-202.
19. Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 279-291.
20. Maertens JA, Klont R, Mason C, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1329-1336.
21. Busca A, Locatelli F, Barbui A, et al. Usefulness of sequential *Aspergillus* galactomannan antigen detection combined with early radiologic evaluation for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation Proceedings* 2006; 38: 1610-1613.
22. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006; 44 (suppl 1): 163-172.
23. Maertens J, Theunissen K, Deeren D, Meersseman W, Eldere JV. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol* 2006; 44 (suppl 1): 173-178.
24. Verweij PE, Mennink-Kersten MASH. Issues with galactomannan testing. *Med Mycol* 2006; 44 (suppl 1): 179-184.

25. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D. Serum glucan levels are nonspecific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 5: 882-885.
26. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5362-5363.
27. Marr KA, Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 6): S381-S386.
28. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1762-1769.
29. Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Klont RR, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3925-3931.
30. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1→3)- β -D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 299-305.
31. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
32. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)- β -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654-659.
33. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1→3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5957-5962.
34. de Pauw BE, Patterson TE. Should the consensus guidelines' specific criteria for the diagnosis of invasive fungal infection be changed? *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl 6): S377-S380.
35. Yoshida M. Usefulness of determination of β -D-glucan in the diagnosis of deep mycosis-Experience in Japan. *Med Mycol* 2006; 44 (suppl 1): 185-190.
36. Kawagishi N, Satoh K, Enomoto Y, et al. Risk factors and impact of β -D-glucan on invasive fungal infection for the living donor liver transplant recipients. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 207-215.
37. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR. Reactivity of (1→3)- β -D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemoter* 2006; 50: 3450-3453.
38. Segal BH, Almyroudis NG, Battiwalla M, et al. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 402-409.