

# İNVAZİF FUNGAL İNFEKSİYONLARDA TANISAL YAKLAŞIM

Beyza ENER

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, BURSA  
bener@uludağ.edu.tr

## ÖZET

*İnvazif mantar infeksiyonlarının klinik bulgular özgül olmayıp, konvansiyonel yöntemler hastalığı belirlemede yeterli değildir. Bu nedenle hasta örneklerinde mantarlara özgül hücre duvar antijenlerinin (mannan, galaktomannan ve beta-glukan) ve özgül DNA'nın aranması yeni tanı yaklaşımları olup, bu yeni testlerin tanı değeri tartışılmıştır.*

**Anahtar sözcükler:** beta-glukan, fungal PCR, fungal tanı, galaktomannan, mannan

## SUMMARY

### Diagnostic Approach in Invasive Fungal Infections

*Clinical findings of invasive fungal infections are not specific and conventional methods are not sufficient to detect the disease. Thus, searching for cell wall antigens (mannan, galactomannan, beta glucan) and specific DNA, constitute new approaches for diagnosis and here, the diagnostic value of these tests were emphasized.*

**Keywords:** beta-glucan, fungal diagnosis, fungal PCR, galactomannan, mannan

Mantar infeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır. Başta hematolojik malinitesi olan ve kemik iliği nakli yapılan hastalar olmak üzere, altta yatan çeşitli hastalığı olan genel durumu bozuk kişilerde karşımıza çıkmaktadır. Mantarlar, bakteri ve virüsler ile karşılaştırıldığında virülansı daha az olan patojenlerdir. Doğada çok sayıda bulunan mantarlardan infeksiyonlara sebep olanların sayısı sınırlıdır. *Candida* ve *Aspergillus* türleri, *Cryptococcus neoformans* ve *Zygomycetes* sınıfı mantarlar infeksiyonlarda en sık karşımıza çıkan etkenlerdir.

Mantar infeksiyonlarının etiyolojik tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür esas basamaktır. Ancak direkt mikroskopik inceleme ve kültürün duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması farklı arayışları gündeme getirmiştir. Hasta örneklerinde (kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi) mantara spesifik antijen, metabolit, konak immün yanıtı ve özgül nükleik asitlerin aranması tanıya yardımcı yeni yöntemlerdir. Hücre duvar yapılarından B-glukan testi (BG) panfungal test olarak kullanılırken, *Candida* infeksiyonlarında mannan antijen ve antikoları, *Aspergillus*

infeksiyonlarında galaktomannan antijeni (GM), kriptokok infeksiyonlarında kapsül antijenlerinin aranması son yıllarda sık başvuru olan tanı yolları olmuştur<sup>(12)</sup>. Hücre duvar yapıları dışında mantara özgül nükleik asitlerin aranması diğer bir tanı yaklaşımıdır<sup>(1)</sup>.

**Galaktomannan antijen testi:** GM antijeni, *Aspergillus* türlerinin hücre duvarında bulunan ve ekstrasellüler olarak da salgılanabilen bir moleküldür. Doksanlı yılların başında molekülün analizi yapılmış ve 1994 yılında bu moleküle karşı monoklonal antikor oluşturulmuştur<sup>(4,5,19,20)</sup>. Bu monoklonal antikor yardımıyla invazif aspergilloz (IA) tanısında başta serum olmak üzere BAL, BOS ve idrar gibi farklı örneklerde GM antijeni aranmaya başlanmıştır; 1999 yılında Avrupa'da EIA kiti (Platelia *Aspergillus*; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) haline getirilmiş ve 2003 yılında ise Food and Drug Administration (FDA) tarafından IA tanısında serumda kullanılmak üzere onay almıştır<sup>(6,7)</sup>. Kit en az 0.5 ng/ml GM tespit edebilmektedir. İmmün baskılanmış hastalarda kemoterapiye başlandığında haftada en az iki kere testin yapılması ve üst üste gelen

örnekte iki pozitiflik bulunduğu zaman testin IA açısından olumlu kabul edilmesi önerilmiştir<sup>(8,16)</sup>.

**$\beta$ -glukan testi:** BG antijeni *Cryptococcus neoformans* ve *Zygomycetes* sınıfı mantarlar hariç birçok mantarın hücre duvarında bulunan bir komponenttir. Özellikle Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2000'li yıllardan sonra konu ile ilgili çalışmalar yoğun olarak başlamıştır<sup>(9,11,13,14,21)</sup>. BG, büyük okyanus kıyılarında yaşayan "horseshoe crab" denilen canlıların amebositlerinden degranülasyonu ile açığa çıkan serin prateaz zimogenlerin (faktör G) aktive olmasını sağlayan bir maddedir. Aktif hale gelen zimogenler koagülasyon enzimlerini harekete geçirir. Bu özellikten yararlanılarak önce Japonya'da (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo) ve daha sonra ABD'de (Fungitell assay; Cape-Cod Inc, ABD) kitler geliştirilerek kullanıma sokulmuştur. Her iki kit de birbirine benzer, kinetik okuma yapan spektrofotometrik bir yöntemle (Limulus test=LAL test) çalışmaktadır. Bu test 2006 yılında, IA da dahil invazif fungal infeksiyonlarının (IFE) tanısında kullanılmak üzere FDA'dan onay almıştır. Aynen GM testi gibi, bağışıklığı baskılanmış hastalarda kemoterapiye başladığında haftada en az iki kere testin yapılması önerilmiş ve üst üste gelen iki örneğin pozitif olması invazif fungal infeksiyonlar açısından anlamlı kabul edilmiştir<sup>(10,15)</sup>.

**Nükleik asit tarama testleri:** Hasta örneklerinin mikroskopik incelemesi, mantar infeksiyonlarının tanısında oldukça özgül ve bu nedenle çok önemli olmakla beraber, duyarlılığının düşük olması farklı tanı yollarını gerekli kılmıştır. Klinik örneklerin ekimi ve etkenin üretilerek gösterilmesi daha duyarlı olsa da, mantarlar geç üreyen mikroorganizmalar olduğundan üremenin beklenmesi zaman kaybına yol açmaktadır. Oysa bağışıklığı bozuk hastalarda mantar infeksiyonları aniden başlar, hızlı seyir gösterir ve tedavi edilmez ise mortal sonuçlanır. Bu tür hastalarda antikör yanıtı da iyi olmadığından serolojik testlerin başarısı ne yazık ki düşüktür. Antijen ve metabolit tarayan testler ümit verici olmakla beraber altın standart bir test henüz geliştirilememiştir. Dolayısıyla nükleik asit tespitine dayalı tanı yolları gündeme gelmiş, daha çok yeni olmakla beraber bazı sonuçlar alınma-

ya başlanmıştır<sup>(2,17)</sup>. Duyarlılığının yüksek olması ve kısa sürede tamamlanması açısından "polymerase chain reaction"nın (PCR) çeşitli formatları bu amaçla kullanılmaktadır. Standart PCR, "nested" PCR ve son yıllarda, kontaminasyonun daha az olması ve mantar yükünü kantitatif olarak gösterebilmesi nedeniyle "real-time" (RT) PCR, en fazla tercih edilen PCR yöntemleridir<sup>(1)</sup>. PCR yöntemi ile tanı, saptanacak hedef genin cinse ya da türlere yeterince özgül ve duyarlı ve çok sayıda olması önemli noktalardır ve bu özellikleri en fazla kapsayan rDNA genleridir. Bu bölge dört gen (18S, 5.8S, 25-28S, 5S) ve "internal transcribed spacer" (ITS1 ve ITS2) ve "intergenic spacer" (IGS) olmak üzere ara kısımlardan oluşmaktadır. ITS1, ITS2, 25-28S kısmının D1 ve D2 kısımları ve 25-28S kısmına komşu olan IGS bölgesi tanımlamada kullanılacak kısımlardır<sup>(2,3,17,18,22)</sup>.

## KAYNAKLAR

1. Baskova L, Buchta V. Laboratory diagnosis of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach, *Folia Microbiol* 2012;57(5):421-30.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12223-012-0152-3>  
PMid:22566119
2. Hebart H, Loeffler J, Einsele H. Molecular Diagnostics: Present and Future, "Maertens JA, Marr KA (eds). *Diagnosis Of Fungal Infections*" kitabında s.121-32, New York: Informa Health (2007).
3. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. Assessment of ribosomal large subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species, *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2092-103.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.5.2092-2103.2005>  
PMid:15872227 PMCid:1153785
4. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*, *Infect Immun* 1994;62(12):5424-33.  
PMid:7960122 PMCid:303284
5. Latge JP, Moutauakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes K, Prevast MC. The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*, *Infect*

- Immun* 1991;59(8):2586-94.  
PMid:1855978 PMCID:258060
6. Maertens J, Theunissen K, Boogaerts M. Invasive aspergillosis focus on new approaches and new therapeutic agents, *Curr Med Chem Anti-Infective Agents* 2002;1(1):65-81.  
<http://dx.doi.org/10.2174/1568012023355036>
  7. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis, *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3223-28.  
PMid:10488181 PMCID:85532
  8. Mennink-Kersten AS, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis, *Lancet Infect Dis* 2004;4(6):349-57.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01045-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01045-X)
  9. Obayashi T, Yoshida M, Mori T et al. Plasma (1→3)-β-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes, *Lancet* 1995;345(8941):17-20.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91152-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91152-9)
  10. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al. b-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(2):199-205.  
<http://dx.doi.org/10.1086/421944>  
PMid:15307029
  11. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH et al. Multicenter clinical evaluation of (1→3)-β-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans, *Clin Infect Dis* 2005;41(5):654-9.  
<http://dx.doi.org/10.1086/432470>  
PMid:16080087
  12. Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future, *Am J Med Sci* 2010;340(3):253-7.  
<http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181e99c88>  
PMid:20823702
  13. Pazos C, Pontón 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(1):299-305.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.1.299-305.2005>  
PMid:15634986 PMCID:540165
  14. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nyugen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1-3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections, *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1009-13.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02091-07>  
PMid:18160456 PMCID:2268340
  15. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections, *J Clin Microbiol* 2005;43(12):5957-62.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.12.5957-5962.2005>  
PMid:16333082 PMCID:1317189
  16. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis, *J Clin Microbiol* 2003;41(5):2184-6.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.5.2184-2186.2003>  
PMid:12734275 PMCID:154675
  17. Shea YR. Algorithms for detection and identification of fungi., "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology, 9. baskı" kitabında s.1745-61, ASM Press Washington D.C. (2007).
  18. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 1993;31(3):615-21.  
PMid:8458955 PMCID:262830
  19. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked-immunosorbent-assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis, *J Clin Microbiol* 1995;33(2):497-500.  
PMid:7714217 PMCID:227977
  20. Stynen D, Sarfati J, Goris A et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*, *Infect Immun* 1992;60(6):2237-45.  
PMid:1375195 PMCID:257149
  21. Uchiyama M, Ohno N, Miura NN et al. Chemical and immunochemical characterization of limulus factor G-activating substance of *Candida* spp., *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;4(4):411-20.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01313.x>
  22. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics, *Clin Chest Med* 2009;30(2):391-408.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.014>  
PMid:19375643