

# İnvaziv Mantar Enfeksiyonlarının Tanısı

Ülker Dođru

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları BD, Prof.Dr.

Son birkaç dekatta invaziv mantar enfeksiyonlarının sıklığı dramatik biçimde artmıştır. Bu artışın nedeni immün eksikliği olan hastaların sayısında artış, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı ve mantar hastalıklarının varlığından daha fazla kuşku kullanılmasıdır. İnvaziv mantar hastalıklarında erken tanı uygun tedaviye yol göstermesi ve mortaliteyi önlemesi bakımından önemlidir. Yeni antifungal ilaçların bazı mantarlara spesifik etkisinin bulunması da erken tanının önemini ortaya koymaktadır. Ancak konvansiyonel mikrobiyolojik ve histopatolojik yöntemler genellikle sensitif ve spesifik olmadığından tanı ancak hastalığın geç evresinde konabilmektedir. Bu nedenle erken tanıyı sağlayacak yaklaşımlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Tanı , klinik gözlem, radyolojik incelemeler yanında direkt preparat, kültür, fungal metabolitlerin saptanması ve miktarlarının belirlenmesi, fungal makromoleküler antijenlerin ve antijenlere karşı spesifik konak immün yanıtlarının saptanması, spesifik fungal nükleik asid dizilerinin amplifikasyonu ve saptanması gibi laboratuvar ve moleküler biyolojik incelemeler ile yapılır. Tanı için biyopsi materyelinin alınması hastanın genel durumunun iyi olmayışı nedeniyle genellikle mümkün olamamaktadır. Yeni diagnostik araçlar erişkinler için ümit verici olmakla birlikte bunların çocuklarda yararı sınırlıdır.

## İnvaziv Aspergilloz Tanısı

İnfeksiyon en sık *A. fumigatus* ile oluşur.

**Klinik bulgular:** Spesifik değildir. Nötropenik hastada ateş akla getirmelidir. Solunum sistemi bulgusu bulunabilir veya olmayabilir.

**Radyolojik bulgular:** Özellikle nötropenik çocuklarda ve erken dönemde normal olabilir. Akciğer grafisinde soliter veya multipl pulmoner nodul veya düşük dansiteli zon ile çevrili lezyonlar (halo belirtisi), plevraya dayalı küçük lezyonlar immün eksikliği olan hastada aspergillozu düşündürmelidir. Halo belirtisi hemorajik nodulle birlikte ve invaziv aspergillozlu hastaların %33-60'ında saptanmıştır. Kısa süreli gözlenir ve bir hafta içinde kaybolur. Bu nedenle aspergillus tanısı bakımından enfeksiyonun ilk 5 günü içinde CT yapılmalıdır. Serolojik testler pozitifleşmeden bu belirti gözlemlendiğinden tanı bakımından önem taşır. Kavite gelişimi ve ay şeklinde hava (air crescent) belirtisi ise ancak hastalığın 3. haftasında görülür.

**Konvansiyonel yöntemler:**

**Direkt incelemeler:** Kültüre göre avantajı sensitivitesinin yüksek oluşu ve rölatif olarak hızlı oluşudur. Dezavantajı diğer filamentöz mantarları (penisillium gibi) kesin olarak ayırtılamamasıdır. Aspergillus türleri tipik olarak slendrid septalı hifa olarak görülür ve anguler dallanma gösterir. Örnek, %10 KOH eklenerek veya eklenmeden incelenebilir. KOH hifal elementin proteinöz materyelinin temizlenmesi ile daha iyi görülmesine olanak sağlar. Yayma yapıp fikse edildikten sonra çeşitli boyalarla boyanır. Rutin olarak Gram boyası kullanılır. Sitolojik boyalar (Papnicolaou boyası) ve floresan boyalar sensitiviteyi artırır. İnvaziv aspergilloz düşünülen tüm olgularda fungal-spesifik boyalar kullanılmalıdır. Gomori'nin methemane gümüş boyası (GMS) ve periodic acid Schiff (PAS) histolojik kesit ve yaymalara uygulanır. PAS hücresel detay ve yapıyı daha iyi gösterir. Floresan boyalar (Calcofluor white, Uvitex 2B, Blankophor) frozen kesitlere, parafinli dokuya ve taze klinik örneklerle ve bronkoalveolar lavaja (BAL) uygulanabilir. Sensitivitesi rölatif olarak yüksektir.

**Kültür:** Antifungal direncin saptanabilmesi gibi avantajı, rölatif yavaş ve insensitif oluşu ve tür belirlemek için uzman gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Aspergillus rutin solit ve likit mikrobiyolojik ortamlarda (kanlı agar, çikolata agar, beyin kalp infuzyon gibi) üreyebilir. Mantara özel besiyeri (Sabouraud dextroz agar) patojen olarak mantar düşünüldüğünde daha üstün olduğundan kullanılmalıdır. Steril olmayan örneklerde ortama antibiyotik eklenmelidir. Patojen olmayan mantar üremesini önlemek için cycloheximide eklenmelidir. İdentifikasyon, koloni morfolojisi ve preparatın mikroskopik incelemesi ile yapılır. Küçük tüy gibi beyaz koloniler yapar. Vasküler invazyon eğilimine rağmen aspergillus çok nadir olarak kandan izole edilir. Solunum yolu sekresyonları kültürde de düşük sensitivite gösterir. İnvaziv aspergillozlu hastaların %8-34'ünün balgamında ve %45-62'sinin BAL sıvısında üreme saptanmıştır. Üreme immün eksikliği olmayanda kolonizasyonu, immüneksikliği olanda invaziv hastalığı düşündürmelidir. Kültürde üreme itraconazol gibi antifungal ilaçlara duyarlı testinin yapılmasına da olanak sağlar.

**Histopatolojik inceleme:** Tanı için gereklidir ancak hastanın genel durumunun iyi olmayışı nedeniyle sıklıkla yapılamaz. Anjiöinvazyon, kesitlerde dallanan, septalı hifalar görülür. Kesin tanı histopatolojik incelemenin yanında dokudan yapılan kültürün pozitifliğini de gerektirir çünkü bazı nonpigmente mantarlar aynı görüntüyü verebilir. İmmunohistolojik boyalar ayırıcı tanıya olanak sağlar.

**Yeni tanı yöntemleri:**

**Antijen saptama:**

**Galaktomannan:** Aspergillus ve penisillium türlerinin çoğunun duvarında bulunan ısı stabil heteropolisakarittir. Ölçümü için çeşitli yöntemler varsa da son 10 yıldır Avrupada ve yeni olarak ta A.B.D 'de monoklonal antikorlarla yapılan Platelia Elisa yöntemi kullanılmaktadır. Aspergillozun klinik belirtileri ortaya çıkmadan 5-8 gün önce sirküle eden galaktomannan saptanabilmektedir. Mantarın büyüme fazı, mikro çevre, konakçı immün durumu ve patoloji galaktomannan açığa çıkmasını etkilemektedir. Galaktomannan miktarı dokudaki fungal yük ile orantılıdır ve düzeyinin prognostik önemi vardır. Düzeyinin klinik tanı ve tedaviye yanıt ile korele olduğu gösterilmiştir. Serumda, BAL sıvısında, dokuda ve beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, idrar ve perikard sıvısı gibi vücut sıvılarında saptanabilir. FDA, cut-off değerini 0.5ng/ml olarak kabul etmekte, Avrupa'da 0.7ng/ L düzeyi kullanılmaktadır. Galaktomannanın klinik sensitivitesi değişiktir ve %29-100 arasında değişmektedir. Sınırlı anjiöinvazyon, yüksek antikor titresi, düşük fungal yük, mantarın düşük galaktomannan açığa çıkarması yanlış negatifliğe sebep olur. Yanlış pozitiflik %1-18 dolayındadır. Ölçümün performansı konak

gurubuna ve altta yatan patolojik süreçlere göre değişir. Birlikte uygulanan antifungal tedavi ve yetersiz örnek de klinik sensitiviteyi etkiler. İnvaziv hastalık düşünülüyorsa düzey hemen belirlenmeli ve sonra haftada 2 kez örnek alınmalıdır. Galaktomannanın spesivitesi yenidoğanda ve çocukta düşüktür. Bu durum besin ve sudan dış kaynaklı galaktomannan alınmasına ve immatür veya hasarlanmış barsak duvarından geçişe bağlı olabilir. Antibiyotikler (ampisilin-sulbaktam, amoksisilin klavulonik asid, piperacillin-tazobactam) galaktomannan kaynağı olabilir ve spesiviteyi etkileyebilir. Kemik iliği transplantasyonunu izleyen ilk 30 günde ve sitotoksik kemoterapinin başlamasından 10 gün sonra yalancı pozitif sonuçlar alınabilir. Bakteremik hastalarda ve otoreaktif antikor varlığında yalancı pozitiflik görülebilir. Pozitif prediktif değeri %10 dolayında olduğundan klinik ve radyolojik olarak infeksiyon kanıtları olmayan febril nötropenilerde rutin olarak yapılmasının yararı yoktur. Aspergilloz düşünülen yüksek riskli hastalarda ise tekrarlanan testlerin prediktif pozitif değeri yüksektir. Galaktomannan aspergillus hifalarından büyüme sırasında açığa çıktığından BAL sıvısından saptanması konidya ve hifa ile kontaminasyonu ayırdettirmeyen kültür ve PCR'a göre aspergillozu daha iyi kanıtlar.

**(1-3)-beta-D glukcan:** Birçok mantarın hücre duvarında bulunan bir komponenttir. Çevrede yaygın bir moleküldür ve fungal yükün belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Aspergilloz için spesifik değildir. Serumda belirlenir. Çevresel kontaminasyon spesivitesini azaltmaktadır. Sensitivitesi %67-100, spesivitesi %84-100 olarak bildirilmektedir. Yalancı pozitif sonuçlar hemodiyalizli hastalarda, sirozda, abdominal cerrahi sonrası olabilmektedir

#### **Aspergillus'a karşı antikorlar:**

Akut invaziv aspergillozun erken tanısında yararı yoktur. Hasalığın fulminan özelliği ve konağın immun yanıtının iyi olmayışı nedeniyle sıklıkla negatif bulunur. İnvaziv aspergillozlu hastaların 1/3 ünde antikor saptanmıştır. Nötropenik olmayan hastalardaki subkut aspergilloz tanısında invaziv olmayan bir testtir. Retrospektif tanı bakımından yararlıdır. Antikor, immundiffuzyon, CIE, CF, RIA, ELISA, indirekt immunfloresan yöntemle saptanabilir.

**Metabolitler:** Aspergillus türleri metaloproteazlar ve fosfolipazlar gibi ekstrasellüler enzimler yapar. Mannitol gibi primer metabolitler ve gliotoxin gibi sekonder metabolitler diagnostik belirleyici olabilir. D-mannitol ölçümü komplekstir ve kullanımı sınırlıdır. Gliotoxin ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

**Nukleik asid testleri:** İnvaziv mantar infeksiyonlarının moleküler tanısı (PCR) çok ümit vericidir çünkü fungal DNA'nın hastanın kanında saptanması konvansiyonel metotlara göre çok erken olmaktadır. Testin standardizasyonu henüz yapılamamıştır. Sensitivitesi %79-100, spesivitesi %81-93 olarak bazı çalışmalarda bildirilmektedir. Kan, BAL, doku, parafin kesitler kullanılabilir. Dokuda PCR kültürden daha sensitiftir. BAL da saptanması kolonizasyon ve hastalığı ayırdettirmez. PCR klinik sensitivitesi antifungal tedavi ile etkilenebilir. Hastanın aldığı sıvı ve ilaçlar PCR'ın nonspesifik inhibitörü olabilir. Real-time metotlar kantitatif özelliklere de sahip olduğundan hem tanı hem de tedaviye yanıtı izlemede önemlidir. Mikroarray teknoloji (panfungal chip ile) hızlı idantifikasyon mümkündür ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır.

## **İnvaziv Kandidiaz Tanısı**

İnfeksiyon en sık C. Albicans ile oluşur. Dissemine infeksiyonun premortem tanısı güçtür. Uygun tedavi için olguların ancak %15-40 kadarı erken tanı alabilir. Kesin tanı invazyona uğrayan dokuda histopatolojik olarak organizmanın gösterilmesi iledir.

**Klinik bulgular:** Spesifik değildir. Özellikle nötropenik hastada nötropeniyi izleyen 5-7 günde hastalık gelişme riski yüksektir ve ateşi kontrol alınamayan hastada düşünülmelidir.

**Görüntüleme yöntemleri:** Akciğer grafisinde pnömoni bulguları saptanabilir. Ultrasonografi, CT ve MRI kandida infeksiyonunu lokalize etmede yararlıdır.

**Direkt inceleme:** Aspire edilen sıvı veya biyopsi materyellerinin imprintleri gramla veya %10 KOH preparasyonu ile incelendiğinde ovoid, gram (+) organizma olarak ve psödohifa şeklinde görülür. GMS ve PAS boyası ile de incelenebilir ancak biyopsi materyelinde psödohifaların hifadan (aspergillus) ayırdedilmesi güçtür.

**Kültür:** Kandida aerobik olarak rutin ortamlarda hızlı ürer fungal ortam gerektirmez. Pozitif kültürlerin %90 dan fazlasında üreme 72 saat veya öncesinde olur. Yuvarlak, inciye benzer, keskin kenarlı koloniler yapar. C. albicans germ tube oluşturması ile diğer tiplerden ayrılır. İnvaziv infeksiyonda kültürler başlangıçta genellikle negatiftir, geç evrede pozitifleşir. Kan ve BOS kültürleri intermitan olarak pozitif olduğundan çok sayıda kültür alınmalıdır. BOS kültürü dissemine infeksiyonu olan bebeklerin 1/3 ünde pozitiftir. Sistemik infeksiyonun kateter infeksiyonundan ayırdedilmesi için hem periferik venden hem de kateterden kültür alınmalıdır. Bir çok çalışmada immun eksikliği olan konakçıda kandida infeksiyonunun %10-40 kadarı kültür ile saptanamamıştır. Kan kültürünün sensitivitesi kandidemde %50 dolayındadır. Tek kan kültürü pozitifliğinde bile tedaviye başlanması önerilmektedir. Solunum sekresyonlarından ve idrardan kandida üretilmesi benign kolonizasyona bağlı olabilir.

**Antikor saptama:** Kandida türlerinin gastrointestinal yol veya diğer yerlerde kolonize olması infekte olmayanlarda antikor yanıtına sebep olduğundan ve immuneksikliği olan hastaların antikor oluşturamaması nedeniyle yararı sınırlıdır.

#### **Antijen saptama:**

Tanıda yararlı fakat sensitivite ve spesiviteilerinin düşüklüğü nedeniyle yararları sınırlıdır. Yanlış negatiflik antijen dolaşmadığı veya saptanamayan formun sirküle etmesi nedeniyle fazladır.

**Mannan antijeni:** Mannan, kandida infeksiyonu sırasında sirküle eden hücre duvarı karbonhidratıdır. Pozitif sonuç invaziv kandidiaz ile koreledir. Santral venöz kateterle ilgili kandidemde daha az olasılıkla pozitif bulunmaktadır. Antijenin klirensi hızlı olduğundan sensitiviteyi artırmak için multipl örneklerin alınması gereklidir. Multipl örnek alındığında saptama oranı %40, tek örnekte ise %11 bulunmuştur. D-arabinol bazı kandida türlerinin metabolitidir ve invaziv kandidiazı olanların idrarında birikir. Sensitivitesi %50 dolayındadır. Enolaz tanı bakımından ümit vericidir ve sensitivitesi daha yüksektir. Ayrıca kandida türleri için daha spesifiktir ve kolonizasyonda bulunmaz. Antijen saptama invaziv kandidiaz tanısında yararlı olmakla beraber sensitivite ve spesiviteilerinin düşüklüğü nedeniyle bu yarar sınırlıdır.

**Nukleik asid testleri:** PCR kültürden daha sensitivdir. Hastaların %45 inde mannan ELISA yöntemine göre infeksiyonun daha erken tanınmasını sağlamıştır. Real time PCR kantitatif değerlendirmeye olanak sağlamaktadır.

## Kaynaklar

1. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive fungal aspergillosis. *Lancet* 5: 609-622,2005.
2. Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, et al. Clinical evaluation of Aspergillus-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients. *Mycoses* 2005; 48 Suppl 1:12-7.
3. Pasqualotto AC, Denning DW. Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Business Briefing: European Oncology Review* 2005.
4. Steinbach WJ. New findings and unique aspects in pediatric aspergillosis. *Med Mycol*.2005 ;43 Suppl 1:261-5.
5. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol Rev.*15(3): 465-484,2002.
6. Weisse ME, Aronoff SC. *Candida*. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Textbook of Pediatrics*.17 th ed. Saunders,2004 pp.1011-16.
7. Aronoff SC. *Aspergillus*. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Textbook of Pediatrics*.17 th ed. Saunders,2004 pp.1016-18.
8. Edwards JE. *Candida Species*. In Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*.5th ed. Churchill Livingstone, 2000 pp.2656-74.
9. Denning DW. *Aspergillus Species*. In Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*.5th ed. Churchill Livingstone, 2000 pp.2674-84.
10. Hostetter MK. *Candida Species*. In Long SS, Pickering LK, Prober CG. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*.Second ed.Churhill-Livingstone.2003 pp.1203-13.
11. Hajjeh RA, Warnock DW. *Aspergillus Species*. In Long SS, Pickering LK, Prober CG. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*.Second ed.Churhill-Livingstone.2003 pp.1213-20.