

İnvaziv Fungal Enfeksiyonların Laboratuvar Tanısı

Dr Esra KOÇOĞLU
İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Sunum planı

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı

- Mikroskopi
- Kültür
- Kültüre dayalı güncel metodlar
- Serolojik testler
- Moleküler testler
- Güncel tanısal teknikler

İnvaziv Mantar Enfeksiyonları (İME)

İNVAZİV MANTAR ENFEKSİYONLARI

Aspergillus enfeksiyonları (Ekzojen)

Candida enfeksiyonları (Endojen)

Diğer Mantar İnfeksiyonları

Mortalite oranları;

1. Candida (%50)
2. Aspergillus (%80-100)

Erken tedavi=Mortalite↓

- Riskli hasta grubunda önemli **mortalite** ve **morbidite** nedeni

USA'de yapılan bir analiz

Terrero-Salcedo D, J Clin Microbiol 2020.

Mantar hastalıkları hastaneye yatış maliyeti

- Toplam tıbbi maliyeti= 4,6 milyar dolar
 - Candida enfeksiyonları (26.735 hastaneye yatış, toplam maliyet 1.4 milyar dolar)
 - Aspergillus enfeksiyonları (14.820 hastaneye yatış, 1.2 milyar dolarlık toplam maliyet)
- *“Bu maliyetler muhtemelen gerçek ekonomik yükü olduğundan az göstermektedir.”*
- *“Bu analizde, mantar teşhisi konulmadan önceki gereksiz testler, tıbbi prosedürler ve uygun olmayan tedaviyle ilgili maliyetler de hesaba katılmadı.”*

Erken Tanı ÖNEMLİ!!!

Invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısı

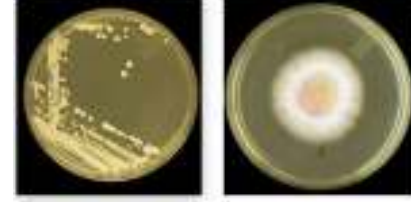
- Klinik bulgu
- Radyolojik bulgu
- Histopatolojik bulgu
- Mikrobiyolojik bulgu

bileşenleriyle ve **çok disiplinli bir yaklaşım** ile ko



Mikrobiyolojik Tanı

1. Direk mikroskopik inceleme
2. Kültür
3. Serolojik yöntemler (zgl antijen/antikor belirleme)
4. Moleküler yöntemler (PCR)

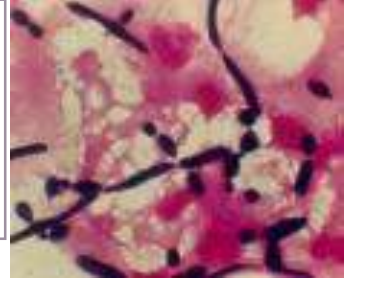


İnceleme için uygun numuneler

- **Kan**--- *Dezenfeksiyon kurallarına uygun alınmalıdır*
- **Bronkoalveoler lavaj**- *Ağız kapalı, steril kaptaki ve 5-10 ml olmalıdır*
- **Balgam**
- **İdrar**--- *2 sa oda ısısı, 24 saat buzdolabı*
- **Abse drenajı**
- **Derin doku-organ biyopsisileri**—*Steril koşullarda, SF içinde (fiktatif değil)*
- **Steril vücut sıvıları**- *2 ml den fazla olmalıdır*

Mikroskopik İnceleme

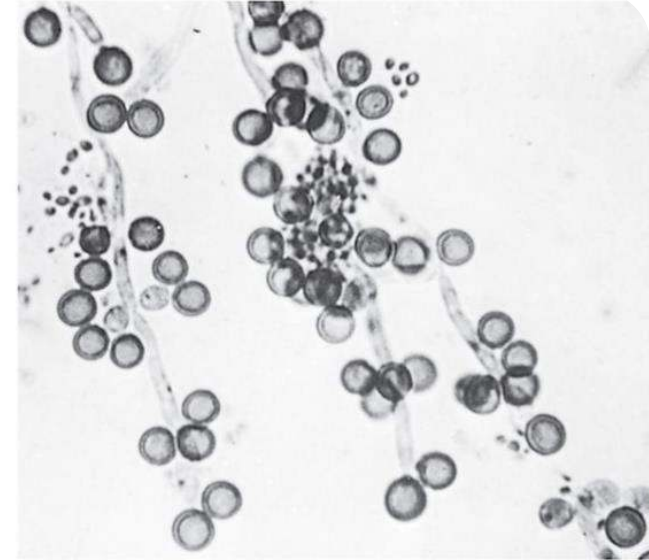
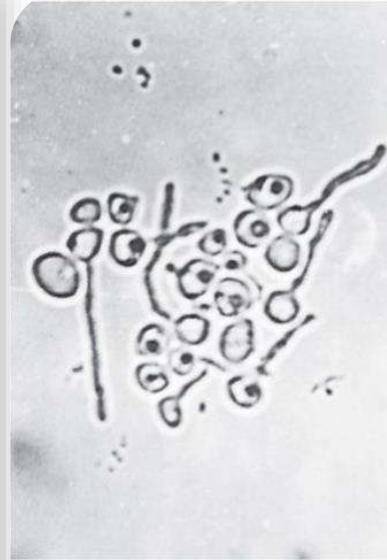
Biyopsi materyalinde veya iğne aspirasyonu ile alınan bir örnekte
maya hücresi ve psöдохif yapısı



BAL, Aspergillus spp, 45° açılı, dallanan
septalı hifler



Candida albicans
A- germ tube; B- Klamidospor



A

B

Mikroskopi: Etken hakkında erken fikir verir

- Mantar elemanlarının doğrudan klinik örneklerde saptanmasına imkan verir (***Cryptococcus*** için BOS'da **Çini mürekkebi**)
- Mantar elemanlarının morfolojik görünümlere dayalı olarak tanımlanmasına katkı sağlar: septanın varlığı, hif çapı veya dallanma paterni gibi önemli veriler elde edilir ve böylece değerli teşhis ipuçları verir (Zygomycete enfeksiyonu)
- Üreme ihtimali olan mikroorganizma hakkında ön bilgi verir.
- Kültürde üreyen mantarın gerçekten enfeksiyon etkeni olup olmadığı konusunda fikir verir.

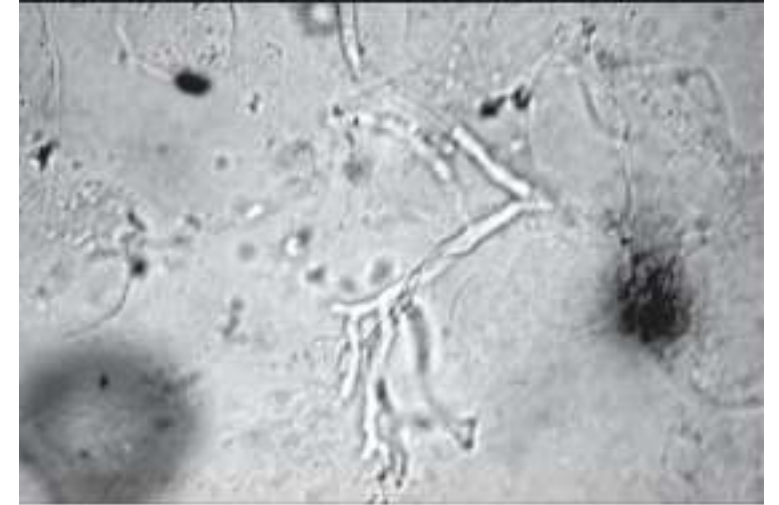
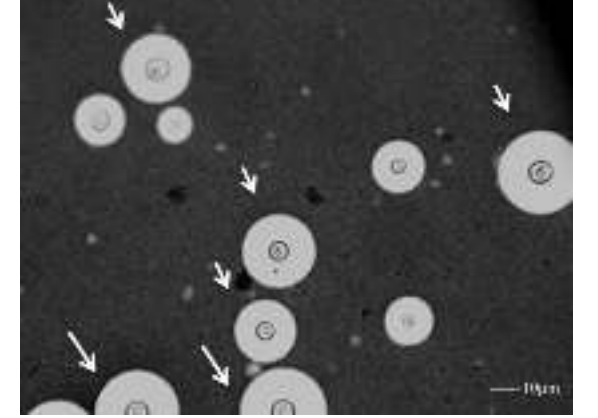


Figure 2: 10% KOH preparation showing broad thin walled aseptate hyphae with irregular branching (500x)

Direkt mikroskopi

- Numunede mantar elemanları ne kadar bol olursa tanısal destek oranı da o ölçüde artar.
- Biyopsi örneklerinde pozitiflik saptandığında, genellikle, enfeksiyonun ileri seviyede olduğunun göstergesidir.
- Mikroskobik incelemenin duyarlılığını artırmanın bir yolu, *Pneumocystis jirovecii* dahil olmak üzere mantar hücre duvarının bileşenlerine spesifik olarak bağlanan floresan boyalar (örn. Kalkoflor) kullanmaktır.
- **Mikroskopinin dezavantajı:** Kültüre göre düşük duyarlılığa sahiptir ve tanımlama yapamaz.

Kültür

- Bildirilen duyarlılık eksikliğine ve uzun inkübasyon sürelerine rağmen, kültürde bir mantar patojeninin izolasyonu, birçok durumda İME tanısı için **altın standart** olmaya devam etmektedir
- İn vitro antifungal duyarlılık verilerinin sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır



Kültür

- Periferik kan dahil olmak üzere çeşitli biyolojik örneklerin mikolojik kültürü rutin olarak kullanılır.
 - Yapılan çalışmalarda invaziv candidiyazis saptanan hastalarda bildirilen enfeksiyonların **yaklaşık% 50'sinde kan kültürlerinin başarısız** olduğu raporlanmıştır.
 - Otopsi raporlarından elde edilen veriler invazif aspergillozun en sık gözden kaçan tanılardan biri olduğunu ve tahminlere göre, tüm invaziv mantar enfeksiyonlarının sadece yarısının ölüm öncesi teşhis edildiğini göstermiştir.

Kültür

- Kan, BOS, plevra, periton, derin doku ve diğer **steril örneklerden** etkenin izolasyonu İME tanısı koydurtur
- Candida türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının neredeyse tamamı kan kültürleri ile doğrulanır.
- Solunum yolundan alınan örneklerde Candida'nın üremesi, her zaman invaziv bir enfeksiyonu göstermez.
- Diğer klinik örneklerden (ETA, BAL, yara, idrar)candida izolasyonunda önemli bir sorun kolonizasyon – enfeksiyon ayırımın yapılamamasıdır

Kültür

Avantajları

- Kesin klinik tanı sağlar
- Antifungal duyarlılık yapmak için imkan sağlar

Dezavantajları

- İnvaziv örnek gerektir
- Sonuçlanma süresi uzun(ort=48-72 saat)
- Steril doku örnekleri dışında kolonizasyon enfeksiyon ayırımı yapmaz
- Yalancı negatiflik
- Küf enfeksiyonlarında duyarlılık düşük

- Mantar kültürlerinde kritik nokta potansiyel patojenlerin belirlenmesidir.
- En iyi koşullarda bile klinik açıdan kıymetli olan küflerin fenotipik tanımlanması doğru bir şekilde yapılamayabilir.

DİZİ ANALİZİ

Bu durumda dizi analizi (altın standart) iyi bir çözümdür.

- **Ancak yaygın kullanımı konusunda kısıtlılıklar vardır.**
 - **Pahalı**
 - **Veri tabanı kısıtlılıkları**
 - **Tür düzeyinde tanımlama güçlükleri**

MALDI-TOF MS

Proteom: Bir organizmada bulunan, biyokimyasal tepkimeleri yürüten, proteinlerin tamamı

Proteomik: Proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin tümü

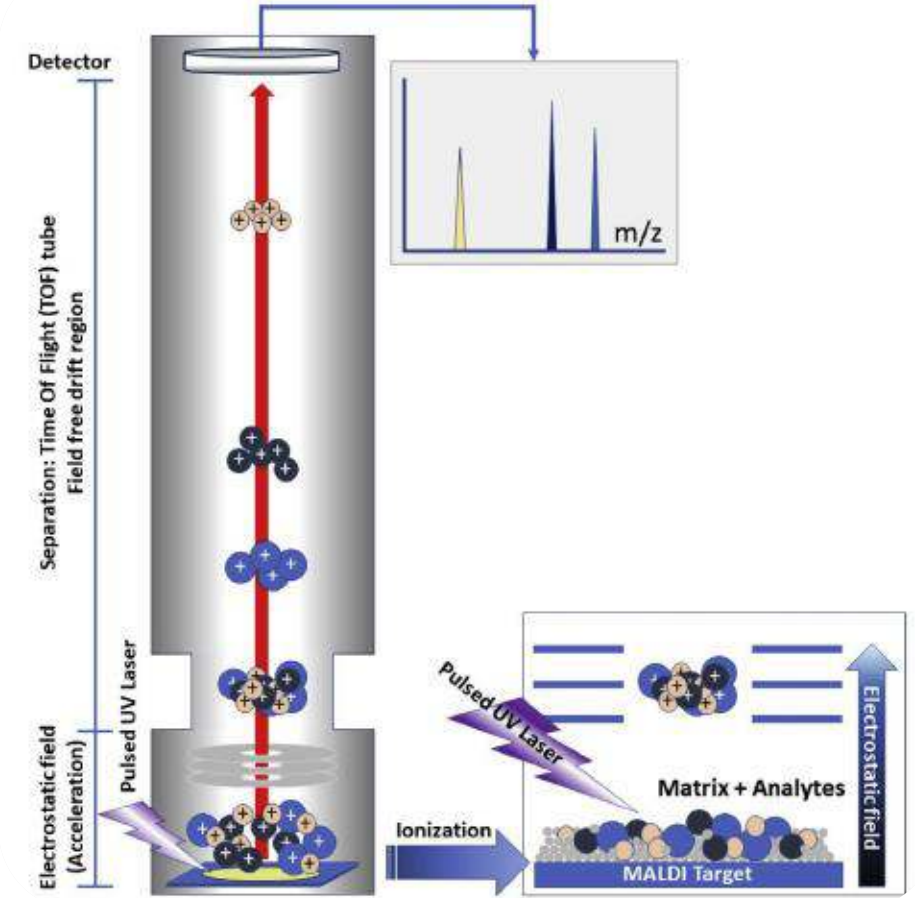


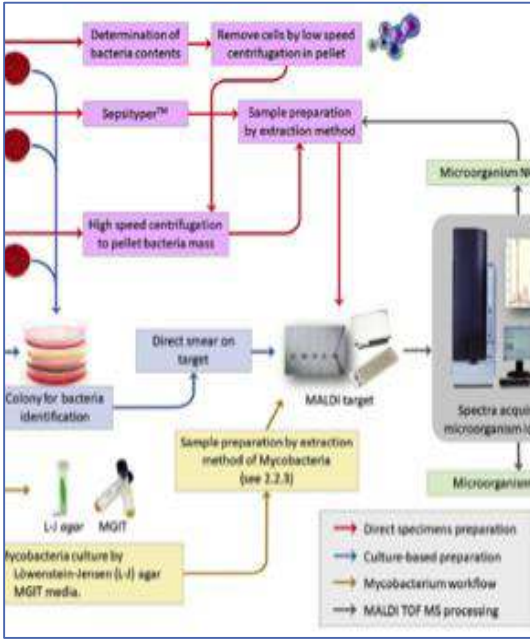
Kütle spektrometresi

MALDI-TOF MS

(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
Mass Spectrometry)
207 molds and yeast

(18 Mayıs 2021) <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-ms-healthcare>





MALDI-TOF MS, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* ve *Saccharomyces* türleri dahil birçok mayanın tanımlanmasında etkin olarak kullanılır.

Dhiman N ve ark. J Clin Microbiol 2011.

Wang ve ark. (2016) **Maya-** tür düzeyinde- %98.8

Chen ve ark. (2013) **98 Maya izolatu-** cins düzeyinde % 94.9; tür düzeyinde % 74.5

Becker ve ark. (2014) **Filamentöz mantarlar-**tür düzeyinde-% 95.4

Prosedürlerin (özellikle filamentöz mantarlarda) standardize edilmesi ve veritabanlarının geliştirilmesine ihtiyaç var...

Becker PT ve ark. Med Mycol 2014.

Serolojik yöntemler (Özgül antijen/antikor belirleme)

- Galaktomannan
- Lateral flow device
- Mannan
- Beta-D-Glukan
- Cryptococcus antijeni

Galaktomannan

- ***Aspergillus*** türleri ve diğer hyalohyphomycetes grubu (***Penicillium spp.***, ***Paecilomyces spp.***, ***Purpureocillium Licacinum*** ve ***Histoplasma spp***) küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür.
- Aspergillus enfeksiyonları immün düşük hastalarda invazif seyrederek (damarsal yapılara karşı afinitesi vardır).
- Ürettiği ortama galaktomannan antijeni salgıyanır.
- Tanıda ELİSA veya LA yöntemleri kullanılır
- Tedavi izleminde kullanılabilir.



Detection of *Aspergillus* Galactomannan Antigen - EIA Microplate Assays

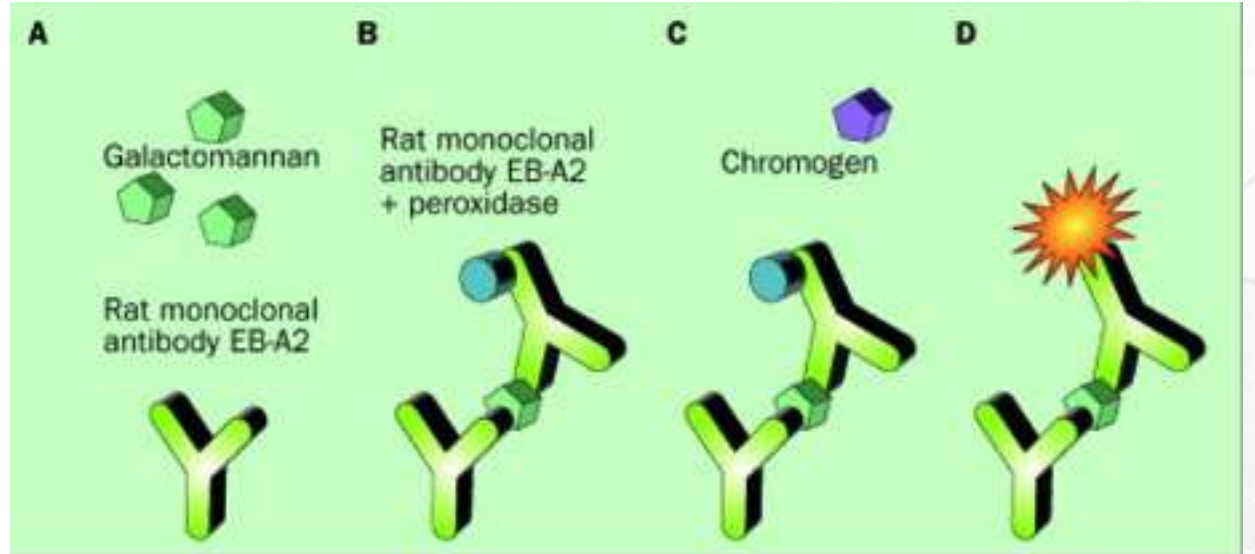


Pastorex Aspergillus (LA)



ELISA

- Fare EB-A2 monoklonal **antikorları** ile galactomannanın yan zinciri olan **(1→5)-β-D-galactofuranose** molekülü tespit edilir.





Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients

M Machetti¹, M Feasi¹, N Mordini², MT Van Lint², A Bacigalupo², JP Latge³, J Sarfati³ and C Viscoli¹

¹University of Genova, National Institute for Cancer Research, Genova, Italy; ²Department of Haematology and Bone Marrow Transplant Unit, S Martino Hospital, Genova, Italy; and ³The Aspergillus Laboratory, Pasteur Institute, Paris, France

Summary:

The performance of two *Aspergillus* antigenemia systems, the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Platelia *Aspergillus* test, and the latex agglutination (LA), Pastorex *Aspergillus* test, in the diagnosis of invasive aspergillosis were compared by test results in bone marrow transplant recipients. For the sandwich ELISA test, the sensitivity was 60% and the specificity was 82%. For the LA test, the sensitivity was 40% and the specificity was 94%. The sandwich ELISA test had become negative. These results encourage further evaluation of the Platelia *Aspergillus* test, to assess its role in the management of invasive aspergillosis in BMT patients.

Keywords: invasive aspergillosis; galactomannan; antigen detection

Sandwich ELISA ✓

LA- ELİSA karşılaştırması

22 hastaya ait 364 serum:

Sandwich ELİSA (Platelia Aspergillus test)

- Sens. %60 Spes. %82

Latex Agg (Pastorex Aspergillus)

- Sens. %40 Spes. % 94

Her iki yöntemle pozitif bulunan iki hastada:

- ✓ ELISA testi LA testinden daha önce pozitif hale geldi veya LA testi negatif hale geldikten sonra pozitif kaldı

Evaluation of Sandwich ELISA Galactomannan Test in Samples of Positive LA Test and Positive Aspergillus Antibody

Shigefumi MAESAKI, Sumio KAWAMURA, Kohji HASHIGUCHI, Mohammad Ashraf HOSSAIN, Eisuke SASAKI, Yoshitsugu MIYAZAKI, Kazunori TOMONO, Takayoshi TASHIRO and Shigeru KOHNO

Objective The detection of circulating Aspergillus galactomannan antigen is a useful tool for serodiagnosis of aspergillosis. However, the latex agglutination test for the detection of galactomannan is not completely reliable due to its low sensitivity. The sandwich ELISA was developed to achieve high sensitivity. **Materials** The sandwich immunocapture ELISA was evaluated by testing 56 sero-positive and 56 sero-negative samples of circulating galactomannan detected by LA test retrospectively. **Results** Sixty of the samples were positive for galactomannan as measured by sandwich ELISA. Fifteen samples out of 56 samples positive by LA test were positive by ELISA. Among 47 sero-positive samples, 15 samples were positive by ELISA. **Conclusion** In sandwich ELISA the sensitivity was higher than that of LA test. (Internal Med

Key words:

Hasta grubu: Aspergilloz tanısı alan hastalar

Metod: LA ile pozitif saptanan 56 numune, negatif saptanan 56 numune

Sonuç: ELISA ile LA'ye göre daha fazla örnekten GM saptanabilir.

GM sınır değeri?

GM İndeksi	>0.5	>0.7	>1	>1.5
Duyarlılık % (%95 CI)	56.8 (42.2- 70.7)	43.1 (29.3-57.8)	37.2 (24.1 – 51.9)	27.4 (15.9 – 41.7)
Özgüllük % (%95 CI)	84.6 (74.7 -91.8)	92.1 (84.0 -97.1)	94.8 (87.4 – 98.6)	98.7 (93.1 – 100)

Metan G, et al. Mycoses 2011

Tek seferde 0.7'nin üzeri ya da art arda gelen iki kan örneğinde GM indeksinin >0,5 olması İPA açısından anlamlı (ECIL)

<http://www.ecil-leukaemia.com/questions.php>



Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis

Wei Zhou,^a Hongxing Li,^b Yan Zhang,^a Mei Huang,^c Qian He,^b Pei Li,^a Fang Zhang,^a Yi Shi,^a Xin Su^{a,b}

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing, China^a; Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Jinling Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China^b; Department of Microbiology, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing, China^c

ABSTRACT The objective of this study was to compare the galactomannan (GM) detection in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples from nonneutropenic patients with invasive pulmonary aspergillosis to determine the optimal BALF GM cutoff value for pulmonary aspergillosis. A study in BALF and serum samples was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 128 patients with clinically suspected nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis between June 2014 and June 2016. On the basis of the clinical diagnoses, 8 patients were excluded because their diagnosis was not confirmed. Finally, 120 patients were diagnosed with either IPA ($n = 37$), community-acquired pneumonia (CAP; $n = 59$), noninfectious diseases ($n = 19$), or tuberculosis ($n = 5$). At a cutoff optical density index (ODI) value of ≥ 0.5 , the sensitivity of BALF GM detection was much higher than that of serum GM detection (75.68% versus 37.84%; $P = 0.001$), but there was no significant difference between their specificities (80.72% versus 87.14%; $P = 0.286$). At a cutoff value of ≥ 1.0 , the sensitivity of BALF GM detection was still much higher than that of serum GM detection (64.86% versus 24.32%; $P < 0.001$), and their specificities were similar (90.36% versus 95.71%; $P = 0.202$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that when the BALF GM detection cutoff value was 0.7, its diagnostic value for pulmonary aspergillosis was optimized, and the sensitivity and specificity reached 72.97% and 89.16%, respectively. BALF GM detection was valuable for the diagnosis of IPA in nonneutropenic patients, and its diagnostic value was superior to that of serum GM detection. The optimal BALF GM cutoff value was 0.7.

BAL&Serum GM test sonuçlarının karşılaştırılması

Nötropenik olmayan hasta grubu:

n=120 IPA tanılı

	Duyarlılık		Özgüllük	
	0.5	1.0	0.5	1.0
BAL GM	% 75.68	% 64.86	% 80,72	% 90.36
Serum GM	% 37.84	% 24.32	% 87,14	% 95.71
P	0.001	0.001	0,286	0.202

OD 0.7 olarak alınınca BAL GM için duyarlılık ve özgüllük %73 ve 89

SONUÇ:

- BAL GM tespiti, nötropenik olmayan hastalarda IPA tanısı için değerlidir ve serum GM 'den daha üstündür.
- BAL GM cut off değeri: 0.7 .

Galaktomannan

Yanlış pozitiflik

- Beta laktam antibiyotik kullanımı
- Elektrolit replasman solüsyonu (Plasmalyte, Baxter Healthcare Corporation) kullanımı
- Süt ve süt ürünleriyle beslenme
- Gastrik mukoza bütünlüğünün bozulması ve besinlerdeki GM'ın kana geçmesi

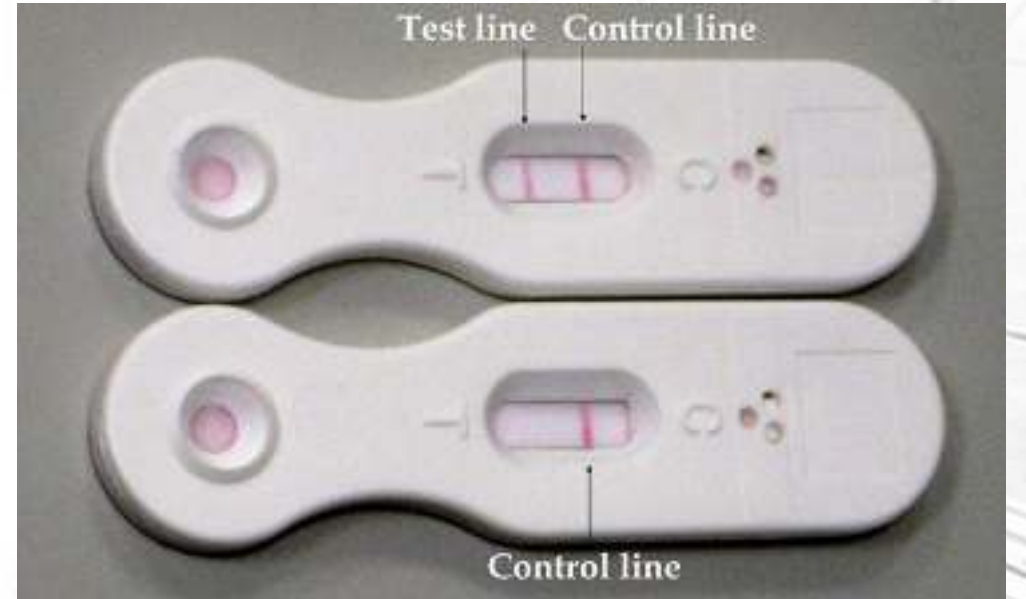
Yanlış negatiflik

- Tanımlı cut off değeri yok
- Antifungal kullanımı
- GM antikoru
- GM'ın kandan çabuk elimine edilmesi

Ansorg R et al. Mycoses 1997;40:353-7.

Lateral Flow Device (LFD)

- İmmunkromotografi prensibiyle çalışan bir test
- Aspergillus'un salgıladığı glikoproteine karşı oluşturulmuş monoklonal antikor kullanılmakta
- 15 dk da sonuç verir
- Hasta başında kullanılabilir
- Özel ekipman gerektirmez



Bronchoalveolar lavage *Aspergillus* Galactomannan lateral flow assay versus *Aspergillus*-specific lateral flow device test for diagnosis of invasive pulmonary Aspergillosis in patients with hematological malignancies



LFD-LFA-BAL GM-KÜLTÜR
“Hem LFD hem de LFA
yüksek duyarlılığa sahiptir”

Letter to the Editor/Journal of Infection 78 (2019) 249–259

Dear Editor,

Table 2

Performance of the *Aspergillus*-specific Lateral Flow Device Test (LFD), the *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay (LFA), Galactomannan (GM), and fungal culture in bronchoalveolar lavage (BALF) for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in patients with hematological malignancies. Sensitivity and specificity for probable/proven IPA versus no IPA, as well as test positivity in cases of possible IPA and those who fulfilled mycological and host criteria of IPA but not clinical criteria are displayed.

Biomarkers/tests and combinations	Probable/proven IPA (n = 9) versus no IPA (n = 8)		Test positivity in cases with possible IPA (n = 5)	Test positivity in cases with mycological and host factors for IPA but no typical radiological signs (n = 2)
	Sensitivity	Specificity		
<i>Aspergillus</i> -specific LFD 15 Min	78% (7/9)	100% (8/8)	40%	100%
<i>Aspergillus</i> -specific LFD 25 Min	89% (8/9)	88% (7/8)	40%	100%
<i>Aspergillus</i> Galactomannan LFA 30 Min	89% (8/9)	88% (7/8)	20%	50%
BAL GM 0.5 ODI cut-off	89% (8/9)	100% (8/8)	0%	100%
BAL GM 1.0 ODI cut-off	78% (7/9)	100% (8/8)	0%	100%
BAL culture	11% (1/9)	100% (8/8)	0%	0%
<i>Aspergillus</i> -specific LFD 15 Min AND/OR <i>Aspergillus</i> Galactomannan LFA 30 Min	89% (8/9)	88% (7/8)	40%	100%
<i>Aspergillus</i> -specific LFD 25 Min AND/OR <i>Aspergillus</i> Galactomannan LFA 30 Min	100% (9/9)	75% (6/8)	40%	100%

Mannan

- Mannan, Candida hücre duvarı komponentidir.
- Mannana karşı oluşan antikorların tespiti için birçok serolojik test bulunmaktadır.
- Ancak bu testler, kolonizasyon ve invaziv enfeksiyon ayırımında başarısız olmaktadır.
- Mannan antijeniyle kombine edilip çalışıldığında, duyarlılık %80 ve özgüllük %93 olmaktadır.
 - Platelia Candida Antigen
 - Platelia Candida Antibody (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Dynemiker Candida antijen ve antikor



Research article

Open Access

Comparative evaluation of (1, 3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia

Fasahat F Alam, Abu S Mustafa and Zia U Khan*

2007

Table 2: Comparative results of mannan antigen, anti-mannan antibodies and (1,3)-beta-D-glucan alone and in combination in proven candidemia patients according to the infecting *Candida* species

<i>Candida</i> species in blood culture	No of sera tested	Number showing positive result by diagnostic kit value cut-off (%)				
		Mannan Ag	Anti-mannan Abs	BDG	Mannan + anti-mannan	Mannan + BDG
<i>C. albicans</i>	22	10 (45)	10 (45)	9 (41)	17 (77)	12 (55)
<i>C. parapsilosis</i>	5	1 (20)	2 (40)	2 (40)	3 (60)	2 (40)
<i>C. tropicalis</i>	4	2 (50)	2 (50)	3 (75)	3 (75)	3 (75)

32 sera from 27 patients with culture-proven candidemia, 51 sera from 39 patients with clinically suspected candidemia, sera of 10 women with *C. albicans* vaginitis, and sera of 16 healthy controls.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Levels of (1→3)-β-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species

Eiman Mokaddas^{1*}, Mona HA Burhamah², Zia U Khan¹, Suhail Ahmad¹

Mannan
BDG
PCR

Prospektif srveyans alışması/ Pediatrik kanser hastaları

Candida kolonizasyonu ?/ (1-3) -b-D-glukan (BDG), *Candida* mannan ve *Candida* DNA'nın serum seviyeleri?

. **Srveyans kültürleri**

. **Serum rnekleri (BDG-Fungitell kiti; *Candida* mannan- Platelia *Candida* Ag, Panfungal primerler- *Candida* DNA)**

35
C.
Candida türleri ile mukozal kolonizasyonun yaygın olmasına rağmen, serum örneklerinde diagnostik olarak anlamlı *Candida* mannan veya *Candida* DNA düzeylerine yol amadığı görülmektedir.

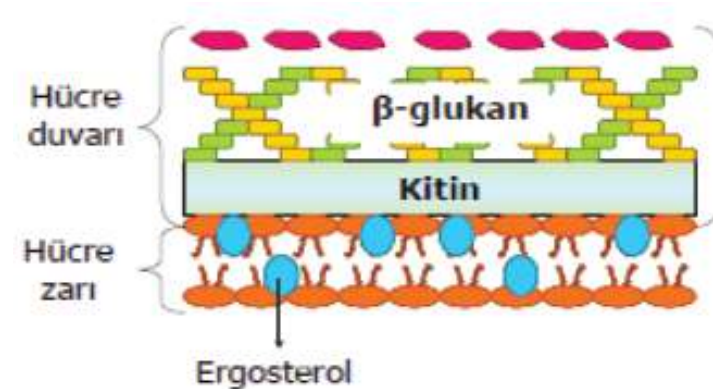
- 8'i yüksek BDG değeri (cut off: ≥80 pg / ml)
- Serum rneklerinin hepsi *Candida* mannan negatif (≥0.5 ng / ml)

- *C. tropicalis* DNA pozitif
- BDG pozitif
- *Candida* mannan pozitif

- *Candida* DNA için PCR testi tüm serum örneklerinde negative

Beta-D-Glukan

- Zygomycetes sınıfı ve *Cryptococcus* hariç, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *P. jirovecii* gibi bir çok mantar türünün hücre duvarında bulunan bir komponenttir.
- (1-3)- β -D-glukan konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem, atnalı (horsecrab shoe) yengecinin koagülasyon faktörü olan faktör G'nin glukani aktiveştirmesine dayanmaktadır.
- Hem Avrupa'da hem de ABD'de (1-3)- β -D-glukan için çeşitli ticari kitler kullanımdadır.



Beta-D-Glukan Testleri

Testin adı		Cut off değeri
Fungitell	(ABD)	60-80 pg/ml
Fungitec-G	(JAPONYA)	20 pg/ml
Marhua	(JAPONYA)	11 pg/ml
Wako	(JAPONYA)	11 pg/ml

İME Tanısında BDG Testi

Luis Ostrosky-Zeichner ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada (**Çok merkezli**, n=163)

- Testin performansının antifungal tedaviden önemli ölçüde etkilenmediğini
- Zygomycetes ve Cryptococcus türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tanısında yetersiz olduğu
- Kullanışlı, tekrarlanabilir ve iyi bir tanısal yardımcı olduğunu vurgulamışlardır



BDG testi		Duyarlılık	Özgüllük
Cutoff değeri	>80	%64. 4	%92. 4
	>60	%69. 9	%87. 1

ORIGINAL ARTICLE

Performance of Galactomannan Antigen, Beta-D-Glucan, and *Aspergillus*-Lateral-Flow Device for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis

Gökhan Metan^{1,7} · Muzaffer Keklik² · Gökçen Dinç³ · Çiğdem Pala² ·

Table 1 Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of 1,3-beta-D-glucan, galactomannan, and *Aspergillus* lateral flow device (LFD) for the diagnosis of invasive aspergillosis

	Galactomannan	1,3-beta-D-glucan	<i>Aspergillus</i> lateral flow device
Sensitivity	35.7 % (95 % CI 19.3–55.8)	53.5 %  (95 % CI 34.2–71.9)	13.7 % (95 % CI 4.5–32.5)
Specificity	 99.6 % (95 % CI 98–99.9)	76 % (95 % CI 70.8–80.9)	99.1 % (95 % CI, 97–99.7)
Positive predictive value	3.1 % (95 % CI 1.5–5.6)	26.3 % (95 % CI 21.8–31.4)	1.9 % (95 % CI 0.8–4.2)
Negative predictive value	96.8 % (95 % CI 94.3–98.3)	73.6 % (95 % CI 68.5–78.1)	98 % (95 % CI 95.7–99.9)

CI confidence interval

Beta D Glukan

Yanlış pozitiflik

- Kan/kan ürünleri transfüzyonu
- Hemodiyaliz-Sellüloz membran
- Gazlı bezle temas
- Beta-laktam antibiyotik kullanımı
- İV immunglobulin tedavisi
- Numune alırken organik madde kontaminasyonu

Yanlış negatiflik

- Zigomikoz / kriptokok gibi mantar enfeksiyonları
- Antifungal tedavi almak az da olsa etkileyebilir
- İnvaziv olmayan mantar enfeksiyonu

Kriptokok kapsül antijeni

- Kriptokokkal enfeksiyonların tespitinde **serebrospinal sıvıdan veya serumdan** kapsüler antijen araştırılır.
- Kapsüler antijen tespiti için hem lateks aglütinasyon (LA) hem de enzimimmünoassay (EIA) testleri bulunmaktadır.

CrAg[®]LFA
CRYPTOCOCCAL ANTIGEN

It's About
TIME

Cryptococcal meningitis is one of the most common opportunistic infections among HIV/AIDS patients, affecting more than

Culture/India Ink

SERUM^{1,2}

CSF^{1,2}

PLASMA²

WHOLE BLOOD²

Sensitivity

100%

100%

98.9%

99.3%

Specificity

100%

100%

100%

94.4%



Evaluation of a Newly Developed Lateral Flow Immunoassay for the Diagnosis of Cryptococcosis

Mark D. Lindsley,¹ Nanthawan Mekha,² Henry C. Baggett,³ Yupha Surinthong,² Rinrapas Autthateinchai,² Pongpun Sawatwong,³ Julie R. Harris,¹ Benjamin J. Park,¹ Tom Chiller,¹ S. Arunmozhi Balajee,¹ and Natteewan Poonwan²

¹Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia; ²National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand; and ³International Emerging Infections Program, Thailand Ministry of Public Health—Centers for Disease Control and Prevention Collaboration, Nonthaburi, Thailand

Background. Cryptococcosis is a common opportunistic infection of human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals mostly occurring in resource-limited countries. This study compares the performance of a recently developed lateral flow immunoassay (LFA) to blood culture and enzyme immunoassay (EIA) for the diagnosis of cryptococcosis.

Methods. Archived sera from 704 HIV-infected patients hospitalized for acute respiratory illness in Thailand were tested for cryptococcal antigen by blood culture, EIA, and LFA. The LFA was tested by LFA. Antigen results from blood culture, EIA, and LFA were compared.

Results. Of 704 sera, 92 (13%) were positive by blood culture, 92 (13%) were positive by EIA, and 87 (96%) were LFA positive within 5 minutes. The sensitivity of LFA for sera was 0.923 after 5 minutes and 0.923 after 10 minutes. All LFA positive at both time points. Of 74 sera from blood culture positive patients, 74 were positive in 16 of 17 sera from blood culture positive patients (100% sensitivity).

Conclusions. A high level of agreement was observed between LFA and blood culture. LFA is an easy-to-perform assay that does not require laboratory equipment for diagnosis of cryptococcosis.

CrAg LFA

- EIA ile çok iyi uyumlu
- Hızlı
- Kullanımı kolay
- Özel saklama koşulları gerektirmez
- Hasta başı uygulanabilir
- Ekonomik olarak uygun

Moleküler yöntemler (PCR)

- Moleküler yöntemler diğer enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, mantar enfeksiyonlarının tanısında da yeni olanaklar sunar.
- Hastanedeki salgınları saptamak ve ayrıca hastalara ilişkin ve çevresel mantar kaynağını belirlemek için de önemlidir.
- Standardize edilmiş ticari bir sistem bulunmaması nedeniyle nükleik asit testlerinin tekrarlanabilirlik oranı düşüktür.
- Kontamiasyon- etken ayırımında güçlük olabilir.

- Yapılan deneysel çalışmalarda etkenin PCR ile tanımlanması için BAL örneğinin seruma göre daha uygun bir örnek olduğu vurgulanmıştır.

Aydoėan S. Mikrobiyol Bul 2010.
Ahmad S, Diagn Microbiol Infect Dis 2007

Tanıda Kullanılabilen Moleküler teknikler

- Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD)
- Restriction fragment length polymorphism' (RFLP)
- İsoenzyme analysis
- Nucleotide sequence analysis
- DNA-DNA hybridization
- Electrophoretic kariotype analysis'
- Flow sitometri

Moleküler ve antijen testi sonuçlarının birleştirilmesi

- Mantar tanısının klinik faydasını ve performansını iyileştirmek için iki ayrı testin birlikte kullanılması ve sonuçlarının birlikte yorumlanması önerilmektedir.

Ör: Yüksek riskli hasta popülasyonunda seroloji+PCR kullanılabilir

- **GM testi ve Aspergillus PCR testi** (Farklı hedef genler (mitokondrial DNA, 28S rRNA , 18S rRNA ve ribosomal DNA'nın internal transcribed spacer [ITS] bölgesi)

Cesaro S. Mycoses .2008

Cuenca-Estrella M. J Clin Microbiol 2009

Bir meta analiz: Arvanitis M. *Clin Infect Dis* (2015)

- 1.670 hastayı taramış 13 çalışma
- GM ve PCR haftalık tarama testlerinin sonuçlarını birleştirmek, yüksek riskli hastalarda% 100 negatif prediktif değere sahip olduğunu
- GM ve PCR ile taramanın IA vakalarını geleneksel yaklaşımlardan daha erken dönemde belirleyebileceğini vurgulamışlardır.

Doğrudan moleküler tanı

- Son yıllarda Candida için, hem yüzeysel enfeksiyonların hem de invazif kandidiyazın (IC) tanısı için doğrudan tespit testleri uygulanmıştır
- FDA onaylı ilk doğrudan tespit Candida nükleik asit testi: (T2Candida; T2 Biosystems, Inc., Lexington, MA).
- Bu test, PCR'ı T2 manyetik rezonansla birleştirerek, en yaygın beş Candida türünün doğrudan kan örneklerinden saptanmasına olanak tanır,
- Kültür ile karşılaştırıldığında
 - Özgüllük% 99,4 (% 95 CI,% 99,1 ila% 99,6)
 - Duyarlılık% 91,1 (95 % CI,% 86.9 - 94.2)

Mylonakis E. Clin Infect Dis. 2015

T2Candida panelinin kullanıldığı bir başka çalışma:

- Kanıtlanmış kandidemi hastalarından alınan numuneler kan kültürüne kıyasla % 89'luk bir klinik duyarlılıkla doğrulanmıştır.

Clancy CJ. Clin Infect Dis. 2018

İnvazif aspergilloz için yeni biyobelirteçlerin tespiti

- Solunumdaki Aspergillus metabolizmasından kaynaklanan **volatil organik bileşiklerin (VOCs) tespiti**, son zamanlarda invazif hastalığı diğer pnömonik süreçlerden ayırmak için kullanılmıştır. (EORTC / MSG konsensüs kriterlerine göre kanıtlanmış)
- IA için son zamanlarda **kütle spektrometrisinden**, sadece kültürde izole edilen mantarların tanımlanması için değil, aynı zamanda hastaların serumlarında dolaşan mantar moleküllerinin saptanmasında da yararlanılmaktadır. (MS-DS)

- Sendid ve ark. (2015), İME'nin tanısı için kullanılan BDG ve GM saptama tetsleriyle karşılaştırılabilir şekilde performans gösteren bir pan-fungal serum disakkaritinin (DS) saptayan **MS_DS testini** tarif etmiştir.
- Diğer serolojik testlere nazaran duyarlılık ve özgülükte iyi sonuçlar elde etmelerine rağmen
- MS-DS'nin glikobiyobelirteçlerin tanısal ve prognostik önemini artırmaya yönelik, mantar tanı aracı olarak potansiyel rolünü doğrulamak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır.

Sonuç olarak;

- İnvazif mantar enfeksiyonları, hastanede yatan hastalar veya immünosupresyon altındaki hastalar için bir risk oluşturur.
- İnvaziv mantar enfeksiyonunun teşhisi disiplinler arası işbirliği gerektirir; klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik bulgular dikkate alınmalıdır.
- Mikroskopi erken tanıda önemli katkı sağlar
- Kültür altın standarttır, ancak bazı etkenler için duyarlılık sorunu vardır.
- Mevcut kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisini tek başına yeterli duyarlılığa sahip değildir
- Bu testlerin birarada kullanılması, performanslarını artıracaktır
- Direkt örnekten yapılan duyarlılığı yüksek moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi umut vericidir

Dikkatiniz İçin

Teşekkür Ederim