

## İNVAZİV MANTAR HASTALIKLARININ MİKOLOJİK TANISI

### MYCOLOGICAL DIAGNOSIS OF INVASIVE MYCOSES

Yıldız YEĞENOĞLU\*

#### ÖZET

İnvaziv mantar infeksiyonları, günümüzde özellikle riskli konumdaki immüno-supressif hastalar açısından önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. İnfeksiyonun çok hızlı ilerlemesi ve tanımlanmasındaki güçlükler sonucunda kesin tanı çoğunlukla otopsi esnasında konur. Mortalitenin % 40-70'lere ulaşmış olması erken ve gerçekçi laboratuvar testlerine olan gereksinimin ne denli önemli olduğunu çarpıcı bir biçimde vurgulamaktadır. Bu derlemede invaziv mikoz etkeni olan/olabilen mantarlar ve laboratuvar tanı testlerinden söz edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** İnvaziv mikoz, patojen mantar, fırsatçı mantar, immüno-supressif hasta, laboratuvar tanı testleri

#### ABSTRACT

Nowadays, invasive mycoses still continue to be the most important cause of morbidity and mortality particularly in immunosuppressed patients. Due to quick progress and difficulty in defining the infection, definite diagnosis is possible mostly during autopsy application. It has strikingly been shown that fast and reliable laboratory tests have great importance for early diagnosis of the infection since the rate of mortality reached to 40-70%. In this article, the fungi that are or could be responsible agents of invasive mycoses and their laboratory diagnostic tests are reviewed.

**Key words:** Invasive mycosis, pathogen fungi, opportunistic fungi, immunosuppressed patient, laboratory diagnostic tests

#### İNVAZİV MİKÖZDA ETKEN OLAN MANTARLAR

İnvaziv mantar infeksiyonları, özellikle riskli konumdaki immüno-supressif hastalarda morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. İntravenöz kataterler, hiperalimentasyon, mukokutanöz yüzeylerin mantar kolonizasyonu, akut pankreatit, geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımı, akut hemodiyaliz, sitotoksik ve steroid tedavisi, organ transplantasyonu gibi risk faktörleri hastalık oluşumunu kolaylaştırır. İnfeksiyon çok hızlı ilerlediği ve tanımlanmasında güçlükler yaşandığı için; kesin tanı çoğunlukla otopsi sırasında konmaktadır (2,5,32). Günümüzde sistemik mantar infeksiyonlarında mortalitenin % 40-70'lere ulaşmış olması, erken ve gerçekçi laboratuvar tanısını sağlayan laboratuvar testlerine gereksinimin ne denli gerekli ve önemli olduğunu açıkça göstermektedir. Mikozların laboratuvar tanısı, multidisipliner bir yaklaşımı gerektirir. Mikolog, patoloğ, radyoloğ ve klinisyen (iç hastalıkları, cerrahi ve çocuk hastalıkları uzmanları) işbirliğinin sağlanması, tanının doğruluğu, dolayısıyla hasta açısından çok önemlidir (1,5,8,16,17,22,28,29).

Sistemik mantar infeksiyonu etkeni olan mantarlar iki ana

grupta toplanır:

1- Gerçek patojenler

2- Fırsatçı patojenler

*Coccidioides immitis* (koksidiyoidomikoz etkeni), *Histoplasma capsulatum* (histoplazmoz etkeni), *Blastomyces dermatitidis* (blastomikoz, K. Amerika blastomikozu etkeni), *Paracoccidioides brasiliensis* (parakoksidiyoidomikoz, G.Amerika blastomikozu etkeni) gerçek patojen; *Candida* (kandidoz etkeni), *Aspergillus* (aspergilloz etkeni), *Cryptococcus neoformans* (kriptokokkoz etkeni), *Mucor* (mukormikoz etkeni), *Pneumocystis jirovecii* (pnömosistoz etkeni) fırsatçı patojen mantarlardır.

*Trichosporon asahii*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium marneffeii*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Pseudallescheria boydii*, dematiaceous (dematiyosiyöz) küfler gibi fırsatçı mantarlar da seyrek olarak infeksiyona neden olabilirler.

Hiyalen ve dematiyosiyöz küfler; çoğunlukla akciğer, paranasal sinüs infeksiyonları ve fungemide; mayalar, fungemi, fokal lezyonlar ve meningoensefalitde etken olarak izole edilirler.

Date received/Dergiye geldiği tarih: 15.01.06

\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul (İletişim kurulacak yazar: yegenoglu2002@yahoo.com)

## İNVAZİV MİKOZ KUŞKUSUNDA LABORATUVARA SIKLIKLA GÖNDERİLEN KLİNİK ÖRNEKLER VE EN FAZLA İZOLE EDİLEN MANTARLAR

**Kan:** *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.neoformans*, *H.capsulatum*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *S.cerevisiae*, *C.zeylanoides*, *T.asahii*, *C.immitis*, *C.guillermundii*, *M.furfur*;

**Beyin omurilik sıvısı:** *C. neoformans*, *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.immitis*, *H.capsulatum*;

**Genito üriner sistem örnekleri:** *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *Penicillium spp.*, *C.krusei*, *C.neoformans*, *Saccharomyces*, *H.capsulatum*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *T.asahii*, *Alternaria*;

**Solunum sistemi örnekleri:** Mayalar (*Cryptococcus* dışında), *Penicillium*, *A.fumigatus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *A.niger*, *G.candidum*, *Fusarium*, *A.versicolor*, *A.flavus*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*, *Beauveria*, *T.asahii*, *P.boydii*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Aureobasidium*’dur (2,9,10,11,18,26,28).

Çok çeşitli olan mantarların izolasyon ve idantifikasyonları mikoloji laboratuvarında, kültür temelli, kültüre dayalı olmayan (serolojik, moleküler) yöntemler uygulanarak yapılır (6,7,10,13,15,19,23,27).

Tam ve doğru bir laboratuvar tanısı için, klinik tanı ile uyumlu örneklerin uygun zamanda ve uygun yerden alınarak uygun koşullarda laboratuvara hemen ulaştırılması gerekir.

## KLİNİK ÖRNEKLERİN MİKOLOJİ LABORATUVARINA GÖNDERİLMESİNDE DİKKAT EDİLECEK ÖZELLİKLER

- Antifungal tedavi öncesi alınmalıdır.
- Aseptik koşullarda ve steril örnek toplama kaplarına alınarak en geç iki saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Bu süre içinde laboratuvara gönderilemeyen örnekler “Kan ve BOS dışında” +4°C’de bekletilmelidir.
- Anaerobik transport besiyerleri kullanılmamalıdır.

## KLİNİK ÖRNEKLER VE UYGUN ALINIM KOŞULLARI (10,11,13,15,23)

### Alt solunum yolu örnekleri

- Balgam, bronkoalveoler lavaj sıvısı (BAL), bronşiyal yıkama sıvısı, trakeal aspirat ve doku biopsi örnekleri uygun örneklerdir.
- En uygun örnek; BAL ve bronşiyal yıkama sıvısıdır.
- Balgam 5-10 ml, yeni ve sabah çıkarılmış olmalıdır.
- Balgam, derin bir öksürükle çıkarılmalı; produktif öksürük yoksa izotonik tuzlu su inhalasyonu ile indüklenmelidir.
- 24 saatlik balgam örneği; incelenmek için uygun değildir.
- En az üç balgam örneği alınmalı, tükürük gönderilmemelidir.

### Kan

- Venden alınan örnek en uygundur. (Küf infeksiyonu kuşkusunda mümkünse arter kanı, tercih edilmelidir).
- Kan, hasta başında alındığında derhal hemokültür şişesine aktarılmalıdır (önceden şişe ağzındaki lastik

tıpa alkolle silinmelidir).

- Antikoagülan olarak sodyum polyanetol sulfat (SPS) kullanılmalıdır.
- Erişkin bireylerden en az 10 ml (uygunu 20 ml), çocuklardan 1-5 ml kan alınmalıdır. (Kan miktarının çokluğu etkenin saptanma olasılığını artırır).
- Febril dönem başına iki-üç kan örneği alınmalıdır.

### Kemik iliği

- Steril bir kaba; 3-5 ml örnek aspire edilmelidir.
- Antikoagülan olarak SPS tercih edilmelidir.
- Örnekler, hasta başında doğrudan kan kültürü şişesine alınabilir.

### Serum

- En az 10 ml kandan elde edilmiş olmalıdır.
- Laboratuvara hemen ulaştırılmıyorsa +4°C’de kısa bir süre bekletilebilir.
- Antikoagülan eklenmemelidir.
- BOS, idrar veya diğer vücut sıvıları da serolojik yönden incelenmek üzere; steril bir cam tüpe alınarak (miktar; 5-10 ml) gönderilebilir.
- Örneklerin çift veya birkaç kez alınarak gönderilmesi daha iyi sonuç verir.

### Plevra, sinoviyal ve peritoneal sıvılar

- Az miktarda heparin içeren (1/1000) steril kaplara alınarak laboratuvara gönderilmelidir.

### İdrar

- Sabah çıkarılan ilk idrar en uygun örnektir.
- 24 saatlik (biriktirilmiş) idrar gönderilmemelidir.
- Kateterize olmayan hastalarda uygun temizlik işlemlerinden sonra orta akım idrarı alınarak gönderilmelidir.
- İdrar torbasından alınan örnek gönderilmemelidir.
- Yenidoğanda en uygun idrar, suprapubik aspirasyon ile toplanandır.
- Örnek laboratuvara hemen yollanamıyorsa, +4°C’de 12-14 saat bekletilebilir.

### BOS

- Membran filtrelili (0,45 mm) steril injektörler ile örnek alınması tercih edilmelidir.
- Örnek miktarı 3-5 ml olmalıdır.
- Örneklerin laboratuvara hemen ulaştırılması gerekir; eğer bu mümkün değilse, kısa bir süre oda ısısı veya 30°C’lik etüde bekletilebilir (4°C’de bekletilmemelidir).

### Cerahat

- Ekuviyon ile alınan sürüntü uygun örnek değildir (mutlaka gerekiyorsa antisepsi sonrası en derin bölgeden alınmalıdır).
- Kapalı lezyon ve abse örnekleri injektör ile aspire edilerek alınmalıdır (en uygun yöntem).
- Açık lezyonlardan akıntı örneği almadan önce, bu bölge iyice temizlenmelidir.

### Doku

- Lezyonun merkez ve kenarından alınmalı, steril % 0,85 NaCl içeren steril kaplarda laboratuvara gönderilmelidir.
- Örnek, formalin içine alınmamalıdır.

- Küçük lezyonlar tamamen çıkarılıp yollanabilir.
- Doku örnekleri laboratuvara hemen gönderilemiyor- sa +4°C'de en fazla 8-10 saat bekletilebilir. Örnek dondurulmamalıdır.

#### Gözden alınacak örnekler

- Kuşkulu korneal ülserlerin iç ve dış kenarlarından steril bir spatula ile alınmalıdır (örnek az ise, doğrudan mikroskopik tanı amacı ile temiz bir lam üzerine alınarak da gönderilebilir).
- Endoftalmit kuşkusunda, >0,5 ml miktarındaki sıvı, steril bir tüpe alınarak gönderilmelidir. Örnek miktarı az ise, içinde örnek olan injektör; laboratuvara gönderilebilir.

#### Kulaktan alınacak örnekler

- Kuşkulu lezyondan asepsi sonrası kazıntı örneği alınmalıdır.
- Akıntı örnekleri asepsi sonrası steril bir eküvyonla alınıp gönderilebilir.

Laboratuvara ulaşan, kültürü yapılacak klinik örneklerin; hastanın tedavisine bir an önce başlanabilmesi açısından; bekletilmeden, doğrudan mikroskopik yöntemler ile incelenmesi ve hemen ilk sonucun bildirilmesi gerekir (6,9,15,18,23,26).

### KLİNİK ÖRNEKLERE İLK OLARAK UYGULANMASI GEREKEN İŞLEMLER

#### Mikoloji laboratuvarında:

- Örnek üzerine % 10-15 KOH + % 1 kalkoflor beyazı konarak hazırlanan preparasyon fluoresans mikroskopta incelenir ve mantar elemanları (hif ve/veya spor) aranır (Doğrudan mikroskopi)
- Gram boyası
- Çin mürekkebi boyası
- **Patoloji laboratuvarında:**
- Methanamine gümüş boyası (GMS)
- Papanicolau boyası
- Periodic acid-schiff boyası (PAS)
- Wright boyası

Mikoloji laboratuvarında preparasyonların mikroskopik incelenmesi sona erdiğinde kültürel işlemlere geçilir.

#### Kültür besiyerleri

##### Primer izolasyon amaçlılar

- Sabouraud dekstroz agar (SDA) (Sikloheksimidli veya sikloheksimidsiz)
- Beyin kalb inifüzyon agarı (BHI)

- İnhibitör mold agar

- Maya özütü fosfat agar

##### Kullanım nedenleri

Saprofit ve patojen mantarların primer izolasyonu

Saprofit ve patojen mantarların primer izolasyonu

Patojen mantarların (dermatofit dışındaki) primer izolasyonu

Patojen mantarların (dermatofit dışındaki) primer izolasyonu

#### Spesifik amaçlılar

Tween 80 ve tripan mavili mısır unlu jeloz (MUJ)

Pamuk tohumu dönüşüm agarı

-Czapek's agar

-Kuş tohumu agarı (Staib agar)

-Maya fermentasyon buyyonu

-Maya nitrojen agarı

*C.albicans*'ın klamidospore tanısı

*B.dermatitidis*'in küf fazından maya fazına dönüşümü

*Aspergillus* izolasyonu

*C.neoformans* idantifikasyonu

Mayaların fermentasyon özellikleri

Mayaların karbonhidrat asimilasyon özellikleri

Ekim yapılan besiyerleri 26 ve 37°C'de inkübe edilir. Bir-dört hafta içinde veya sonunda üreme görülümüşse koloniden preparasyon hazırlanır. İzole edilen mantar bir maya ise; bu mayanın hif ve/veya yalancı hif oluşturup oluşturmadığı, klamidospore varlığı, karbonhidrat asimilasyonu, nitrat asimilasyonu, şeker fermentasyonu ve gerektiğinde diğer özellikleri araştırılarak tür düzeyinde tanıya gidilir.

Son yıllarda enzimatik reaksiyon oluşumu temeline dayanan; Chromagar, Albicans ID gibi testler bazı laboratuvarlar tarafından izolasyon ve idantifikasyonda kullanılmaktadır.

Küf üretmesi saptandığında ise; koloniler önce makroskopik, daha sonra mikroskopik olarak incelenir. Mikroskopik tanıda; laktofenol pamuk mavisi kullanılarak sellofan band, koparma veya lam kültürü yöntemlerinden yararlanılır, tipik hif ve konidyum yapılarına göre isimlendirme yapılır.

Kan, invaziv mikozda çok önemli bir klinik örnektir ve mantarların kandan izolasyonunda özel işlemler uygulanır.

#### İzolasyon yöntemleri

Bactec 9000 (özel şişeleri: MYCO/ FLYTIC medium= MFL) Bact/Alert

ESP [(septi-check-bifazik besiyeri) (katı ve sıvı)]

Bu besiyerlerinde mayalar iki üç günde izole edilir.

LS (isolatör): İzolatör tüpündeki saponin, eritrosit ve lökositleri eriterek, hücre içindeki mikroorganizmanın serbest kalmasını sağlar; tüp santrifüj edilerek, oluşan çökelti besiyerine ekilir. 3.8-10,5 günde üreme saptanır. Çoğunlukla ilk dört günde üreme görülür.

*H.capsulatum* ve filamentöz mantarlar bu besiyerinde bazen 10-14 günde ürer. (Optimal ısı: 30°C, süre:21 gün)

İnvaziv mikozda en sık *Candida* cinsi, ikinci sıklıkta *Aspergillus* cinsi etken olarak saptanır (5,9,10,18).

Var olan kültürel yöntemlerin zaman alışı, etken mantar izolasyonundaki başarı oranının çok yüksek olmayışı serolojik testlerin uygulanabilirliğini gündeme getirmiştir. Mantarlar, bakteriler ile karşılaştırıldıklarında zayıf antijenik yapıya sahip olsalar da, serumda sirküle olan antijen ve antikörlerinin saptanması ve uygulanan deri testleri mikolojik tanıya yardımcı olur. Çeşitli mikotik infeksiyonlarda tedaviye yanıtın belirlenmesi için hastalık prognozunun izlenmesinde serolojik testlerden yararlanılabilir (3,10,15,18).

**Günümüzde, serolojik test kitleri bulunan mikozlar:** Kandidoz, kriptokokkoz, aspergilloz, blastomikoz, parakoksidiyo-

idomikoz, sporotrikoz, histoplazmoz, koksidiyoidomikoz'dur. **Serolojik test kitleri gelişme aşamasındaki mikozlar:** Pnömosistoz, zigomikoz, kromoblastomikoz'dur. Patojenik mantarların çeşitli cins ve türlerinin ortak antijen yapısına sahip olmaları nedeniyle çoğunlukla yüzeysel kolonizasyon ve derin mikoz ayırımında kararsız kalınır ve bu nedenle mantar infeksiyonlarında antikor tanısının yararı sınırlıdır. Bu testlerden ancak subkutan ve derin mikoz ayırımında yararlanılır.

Histoplazmoz ve koksidiyoidomikozda antikor tanısı değerlidir. Ardarda alınan serumlarda titrasyon artışının saptanması anlamlıdır. En gerçekçi mikoserolojik test; *C.neoformans*'ın antijen tanısıdır.

Aspergilloz, kandidoz, histoplazmoz için benzer serolojik testler geliştirilmektedir.

### KANDİDOZDA SEROLOJİK TANI

İnvaziv kandidozlu hastaların % 50-70'i günümüzde kaybedilmektedir.

#### Candida antijenleri

- Hücre duvarı mannanı
- 1,3-b-D-glukan

#### Testler

EIA, RIA, LA  
(çift antikor sandviç EIA ile kanserli hasta otopsilerinde % 65 duyarlılık, %100 özgüllük)

- Enolaz (48 kDA ağırlığındaki stoplazmik protein) invaziv kandidozda seyrek olarak antikor yanıtı alınır. (48,52,45,47 kDA ağırlıklı antikorlar immunblot, IH,IF,IDF ile araştırılır)

EIA, RIA, LA  
(Cand.tec: % 88 duyarlı (% 77 özgül)

- Hücre duvarı termolabil glikoproteini

LA (1/8 titrasyon anlamlı,1/4 titrasyon hem invaziv, hem kolonizan kişilerde pozitif)

- Polisakkaritçe zengin yüksek molekül ağırlıklı antijen (235 kDA-250 kDA)

CIE

- Acotinase, pyruvate kinase, phosphoglycerate, mutase, methionine synthase ,aspartil proteinase (SAP) (invaziv kandidoz tanı ve tedavisinde önemli)

WB EIA, antijen yakalamalı EIA, inhibisyon EIA

Serum D-arabinitol, fungemi tanısında önemli bir belirleyicidir, invaziv kandidozda idrarda saptanır (3,10,15,25).

### KRİPTOKOKKOZDA SEROLOJİK TANI

#### C.neoformans antijeni:

Polisakkarit glukoroksilomannan (GXM)

#### Test

LA(en gerçekçi mikoserolojik test)

Örnekteki *Trichosporon asahii* ve *Capnocytophaga canimorsus* (DF-2 basili) varlığı çapraz reaksiyona neden olabilir.

Yalancı pozitifliklerde titrasyon 1/8'den azdır. LA ile; hem BOS, hem de serumda kriptokokkal meninjitli hastaların % 90'dan fazlasında pozitiflik saptanır (5,10,15,21,24).

### ASPERGİLLOZDA SEROLOJİK TANI

*A.fumigatus*, % 90; *A.flavus* % 10, *A.niger* % 2, *A.terreus* % 2, *A.nidulans* < % 1 civarında invaziv aspergilloz etkenidir.

#### Aspergillus antijenleri

#### Testler

- Galaktomannan polisakkarit antijeni (serum, idrar, BAL, perikard sıvısı ve BOS'da)

İnvaziv infeksiyonda (IA) seruma kıyasla idrarda daha yüksek pozitiflik oranı saptanır. % 12 yalancı pozitiflik görülebilir.

LA  
EIA  
(sandviç EIA, hematoloji hastalarında daha duyarlı olup % 50-90 duyarlılık, % 81-93 özgüllüğe sahiptir.

Çocuklarda alçak titrede yalancı pozitiflik saptanır. Kronik granülatöz hastalığı olanlarda yalancı negatiflik görülebilir.

*A.fumigatus* galaktomannan antijeni 1 ng/ml'ye kadar saptanabilir. Riskli nötropenik hastalarda testin haftada 2-3 kez tekrarı önerilir.

- 1-3 b-D glukan (hücre duvarı komponenti olup serolojik tanıda yeni bir yaklaşım olarak görülmektedir.

EIA (% 90 duyarlılık, % 100 özgüllük)

EIA testlerinin asemptomatik IA riskli hastalarda tarama amacı ile yetersiz; semptomatik hastalarda klinik tanıyı doğrulamak için yeterli olduğu kabul edilmiştir.

Antikor testlerinin, allerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABA) ve aspergilloma tanısında yararlı, kronik invaziv aspergillozdaki yararı ise tartışmalıdır.

Antikor testleri

IH, LA, IE, (yeni geliştirilen Paragon yöntemi) RIA, EIA, BALISA, luminescent immunassay, indirekt IF (3,9,10,11,15,16,30).

**HİSTOPLAZMOZDA SEROLOJİK TANI**

Antikor testleri : CF, presipitasyon, LA, ID

CF, en uygun testtir:

1/8 titrasyonda pozitiflik anlamlı olup, 1/32 titrasyonda pozitiflik aktif enfeksiyonu gösterir. Titrasyonda dört kat artış anlamlıdır. % 15 yalancı pozitiflik (blastomikoz, koksidyoidomikozda) saptanabilir.

H ve M antijenlerine karşı oluşan presipitasyonlar önemli kabul edilir.

H antijeni; enfeksiyon göstergesidir. M antijeni sadece aktif hastalık sırasında değil, diğer zamanlarda da pozitif olabilir (3,5,7,10,15,18,19,21,31).

**KOKSİDİYOİDOMİKOZDA SEROLOJİK TANI**

Primer serolojik testler önemlidir. Antikor yanıtı tanı ve prognozda değerlidir. Erken primer enfeksiyonda presipite edici antikorlar (IgM) oluşur. IgG sınıfı CF antikorları enfeksiyonun sonunda ortaya çıkar.

Antikorlar

IgM (iki hafta içinde belirlenip, altı hafta içinde kaybolur) IgG

Testler

Tüp presipitasyon veya ID (IDTP)  
Çift ID (IDCF)

Antijen: Koksidioidin ve sferülin (her ikisi de eşit duyarlılığa sahiptir, sferülin özgüllük açısından üstünlük gösterir).

IgG, IgM tanısında LA (yalancı pozitiflik saptanabilir), EIA ve RIA testlerinden yararlanılabilir (3,5,10,11,13,15,18,19,21).

**BLASTOMİKOZDA SEROLOJİK TANI**

Bu konuda yapılmış olan immunolojik araştırmalar yeterli değildir.

CF, ID, EIA, RIA testleri ile *B.dermatitidis*'e karşı oluşan antikorlar aranır. CF, yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip, değildir, ID ile, CF'dan daha sağlıklı sonuçlar alınır. RIA testinde 120 kDA hücre duvarı protein antijeni (WI-1) kullanarak etkene karşı antikorlar araştırılmıştır.

% 52-80 hastada; A antijenine karşı antikorlar saptanmıştır. En uygun tanı, yöntemi; organizmanın mikroskopta gözlemlenmesidir. (2,10,15,21).

**PARAKOKSİDİYOİDOMİKOZDA SEROLOJİK TANI**

Agar jel ID testi ile olguların % 95'inde dolaşan antikorlar saptanır, özgüllük oranı yüksektir.

CF (Albeit) IF, CIE, dotblot yöntemleri, diğer antikor saptayıcı testlerdir.

Glikoprotein yapısındaki gp43'e karşı oluşan IgG, IgM, IgA antikorlarının belirlenmesinde EIA yöntemi ile iyi sonuçlar alınmıştır. % 60'dan fazla hastada antijen varlığı saptanmıştır (3,10,15,18).

**P.JİROVECİİ İNFEKSİYONLARINDA SEROLOJİK TANI**

Antipnömosistis antikor testlerinin tanıda yetersiz olduğu belirlenmiştir. En sık kullanılan, kist ve trofozoit saptayıcı; mikroskopiden daha duyarlı, ancak daha pahalı olan IF yöntemi-dir. Çözünabilir *P.jirovecii* antijenlerinin saptanmasında immunblot yöntemi kullanılır (10,12,14,22).

**MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ**

Giderek popüler olmakla birlikte her klinik mikoloji laboratuvarında rutin bir yöntem olarak

uygulanması gerek ekonomik nedenlerden, gerekse de tam bir standardizasyonunun sağlanamaması nedeni ile olası değildir. Ancak invaziv mikozlarda mortalitenin yüksekliğinden dolayı erken tanı çok önemli olduğu için ve bu yöntemlerle kısa zamanda sonuca ulaşıldığından günümüzde birçok araştırma laboratuvarında klinik örneklerde mantar DNA'sının saptanması konusunda ümit verici çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, tür tayini, epidemiyolojik tiplendirme ve ilaç direnci konulu araştırmalarda da epeyce yol alınmış olup, çalışmalar sürdürülmektedir. Enfeksiyon etkeni mantarların saptanması ve tanımlanmasında nükleik asit amplifikasyon ve hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemlerinden yararlanılır. Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya benzeri yöntemler kullanılır. İyi donanımlı klinik mikoloji laboratuvarlarında Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis ve Coccidioides immitis tanımlanmasında sıklıkla nükleik asit hibridizasyon problemleri yeğlenir. PCR çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Testin duyarlılığı (kan örneklerinde birden fazla kez çalışıldığında) %100'dür. Testin pozitifliği için gerekli süre iki gündür (Klinik tanı için belirlenen ortalama süre: dokuz gün). Yöntemi uygularken çevrede yaygın olarak bulunan küflerden dolayı oluşabilecek kontaminasyon riski üzerinde titizlikle durulması gerekir. Günümüzde sadece sistemik mikoz etkeni birkaç mantar türü için ticari kitler mevcuttur (Tablo1).

**Tablo 1. Sistemik mikoz etkeni olan mantarların moleküler tanımlarını sağlayan kitler ve uygulama süreleri**

Mantarlar	Süre	Test	Hedef
C.neoformans	2 saat	Accuprobe	rRNA
H.capsulatum	2 saat	Accuprobe	rRNA
C.immitis	2 saat	Accuprobe	rRNA
B.dermatitidis	2 saat	Accuprobe	rRNA

PCR temelli tanının, geleneksel kan kültüründen daha duyarlı olduğu (özellikle nötropenik hastalarda) gösterilmiştir. Bundan dolayı mantar yükünün çok az olması nedeniyle, kültür ve

serolojik tanının henüz yetersiz olduğu evrede PCR temelli tanı yöntemlerinin çok daha etkin olacağı söylenebilir. Revers-transkriptaz (RT) PCR'da hedef RNA'nın çoğaltılması amaçlanmıştır. Pneumocystis jirovecii'yi de içeren çeşitli mantarların saptanmasını amaçlayan PCR-parmak izi (PCR fingerprinting), mitokondriyal sitokrom b gen dizi analizi, multipleks PCR, gerçek zamanlı PCR(real-time PCR), yuvalanmış PCR (nested PCR), kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve PCR ELIZA (PCR-EIA) yöntemleri PCR temeline dayanmaktadır. Çeşitli hibridizasyon yöntemlerinden bazıları çizgi prob {line prob assay (PCR-LPA)}, referans sarmal aracılıklı uyum tekniği {reference strand mediated conformational analysis (RSCA)} ve insitu hibridizasyon (ISH)'dur. Yeni moleküler yöntemlerin yakın bir gelecekte tanı sürecini kısaltıp, doğru tanı olasılığını artırması, en kısa zamanda etkene özgü tedavi olanağı sağlayıp, klinik başarı oranını artırması hedeflenmektedir (1,4,19,20,21).

Sonuç olarak, bağışıklık yetmezliği olan hastalarda (özellikle nötropenikler) Candida, Aspergillus, Cryptococcus ve Pneumocystis vb. gibi ön plandaki mantar infeksiyonunun tanınmasında, geleneksel yöntemlerin yanısıra koşullar uygunsa hızlı tanı yöntemlerinin de gözardı edilmemesi ve gelişmiş teknolojik yöntemlerin devreye sokulması hastanın kısa zamanda tedavisi açısından büyük yarar sağlayacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzales GM, Just-Nubling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol 2005; 58:1180-1184.
2. Bradsher RW. Blastomycosis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds). Clinical mycology. Oxford University Press. New York, USA, 2003; pp 299-310.
3. de Repentigny L. Serological techniques for diagnosis of fungal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:361-375.
4. de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 2005; 43:4112-4120.
5. Dupont P, Pappas PG, Dismukes WE. Fungal infections among patients with AIDS. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds). Clinical mycology. Oxford University Press. New York, 2003; pp 188-205.
6. Frank U, Malkotić D, Mlangeni D, Daschner FD. Controlled clinical comparison of three commercial blood culture systems. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:248-255.
7. Gomez BL, Figueroa JL, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, Hay RJ. Development of a novel antigen test for histoplasmosis. J Clin Microbiol 1997; 35:2618-2622.
8. Guinvarc'h A, Guilbert L, Marmorat-Khuong A, Lavarde V, Chevalier P, Guillemain R, Berrebi A. Disseminated Fusarium solani infection with endocarditis in a lung transplant recipient. Mycoses 1998; 41: 59-61.
9. Kern ME. Medical mycology a self-instructional text, FA Davis Co. Philadelphia, USA, 3rd ed; 1988.
10. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology, Lea&Febiger. Philadelphia, USA, 1992.
11. Larone DM. Medical important fungi, a guide to identification, ASM Press. Washington D.C, USA, 4th ed; 2002.
12. Linke MJ, Rebholz S, Collins M, Tanaka R, Cushion MT. Noninvasive method for monitoring Pneumocystis carinii pneumonia. Emerg Infect Dis 2003; 9:1613-1616.
13. Merz WF, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JM, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. Washington, USA, 8nd., 2003; pp 299-310.
14. Ng L, Virani NA, Chaisson RE, Yajko DM, Sphar HT, Cabrian K, Rollins N, Charache P, Krieger M, Hadley WK. Rapid detection of Pneumocystis carinii using a direct fluorescent monoclonal antibody stain. J Clin Microbiol 1990;28:2228-2233.
15. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. Infect Dis Clin N Am 2003; 17:135-158.
16. Peterson DL. New clinical presentations of invasive aspergillosis in non-conventional hosts. Clin Microbiol Infect 2004; 10:24-30.
17. Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of Candida. Clin Microbiol Infect 2004; 10:11-23.
18. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection, diagnosis and management, Blackwell Pub Ltd. Massachusetts, USA, 3rd ed; 2003.
19. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J Clin Microbiol 1995; 33:2913-2919.
20. Sarıbaş Z, Arkan S (çevirenler). Patojen mantarların moleküler yöntemlerle saptanması. İçinde: Tekeli A, Ustaçelebi Ş (çeviri editörleri). Moleküler mikrobiyoloji, tanı prensipleri ve uygulamalar. "Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Tenover DA, White TJ (eds): Molecular microbiology, diagnostic principles and practice" kitabından. Palme yayıncılık. Ankara, 2006; 551-559.
21. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans and Histoplasma capsulatum. J Clin Microbiol 1993; 31:845-850.
22. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield E. A new name (Pneumocystis jirovecii) for Pneumocystis from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8:891-896.
23. Sutton DA. Specimen collection, transport and processing: Mycology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA (eds). Manual of clinical microbiology. ASM Press Washington, USA, 8nd ed., 2003; pp 1659-1667.
24. Tanner DC, Weinstein MP, Fedorciw B, Joho KL, Thorpe JJ, Reller L. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. J Clin Microbiol 1994; 32:1680-1684.
25. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Multilocus sequencing for differentiation of strains of Candida tropicalis. J Clin Microbiol 2005; 43:5593-5600.
26. Vanbreuseghem R, Vroey CH De, Takashio M. Practical guide to medical and veterinary mycology, Masson Pub. New York, USA, 2nd ed., 1978.
27. Walsh TJ, Fancesconi A, Kasai M, Chanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J Clin Microbiol 1995; 33:3216-3220.
28. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 48-66.
29. Welty FK, McLeod GX, Ezratty C, Healy RW, Karchmer E. Pseudallescheria boydii endocarditis of the pulmonic valve in a liver transplant recipient. Clin Infect Dis 1992; 15:858-860.
30. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. Transpl Infect Dis 2003; 5:158-166.
31. Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. Trends Microbiol 2003; 11:488-494.
32. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15:465-484.