

ANTİMİKROBİYAL İLAÇLARDA *ASPERGILLUS* GALAKTOMANNAN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF *ASPERGILLUS* GALACTOMANNAN LEVELS IN ANTIMICROBIAL AGENTS

Mine YÜCESOY¹, M. Cem ERGON¹

ÖZET: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi bir enfeksiyon olan invazif aspergillozun tanısında, hasta serumunda *Aspergillus* galaktomannan antijeninin enzim immün yöntemi (EIA) ile araştırılması rutin laboratuvarlarda uygulanan bir yöntemdir. Ancak yapılan çalışmalar, piperasilin-tazobaktam (PIP-TAZ) kullanan hastaların serumlarında, *Aspergillus* galaktomannan antijeninin araştırılması sırasında yalancı pozitif sonuçların izlendiğini göstermektedir. Bu çalışmada, PIP-TAZ ile bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla kullanılan diğer antimikrobiyal ilaçların içeriğinde, *Aspergillus* galaktomannan antijen varlığının ve düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Galaktomannan düzeyleri, PIP-TAZ, ampicilin-sülbaktam, ampicilin, penisilin G, seftriakson, sefepim, imipenem, klaritromisin, siprofloksazin, vankomisin, gentamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, ornidazol, flukonazol ve amfoterisin B için ticari bir EIA yöntemi ile (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad, Fransa) araştırılmıştır. İlaçların absorbans değerinin eşik (cut-off) değerine bölünmesi ile elde edilen galaktomannan indeksinin (Gİ) >0.5 olması pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan 15 antimikrobiyal ilaç arasında tek pozitif sonuç, en yüksek Gİ değeri ile ampicilin için saptanmış (Gİ=0.540), bunu pozitif olmamakla birlikte görece olarak yüksek Gİ değeri ile PIP-TAZ (Gİ=0.235) izlemiştir. Diğer antimikrobiyal ilaçların Gİ değerlerinin ise 0.011-0.188 arasında değiştiği bulunmuştur. Sonuç olarak, EIA ile galaktomannan antijen testi yapılan hastaların özellikle ampicilin (olası olarak da PIP-TAZ) tedavisi alıp almadıklarının sorgulanması, çapraz reaksiyon nedeniyle yalancı pozitiflik olasılığın dikkate alınması açısından önem taşımaktadır düşüncesine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus*, galaktomannan, enzim immün yöntemi, antimikrobiyal ilaç.

ABSTRACT: The diagnosis of invasive aspergillosis which is a serious infection of immunocompromized patients, depends on the detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in the serum by enzyme immunoassay (EIA) in routine laboratories. However, it has been previously reported that false positive results in *Aspergillus* galactomannan test may be obtained in the sera of patients sera receiving piperacillin-tazobactam (PIP-TAZ). The aim of this study was to investigate the presence and levels of *Aspergillus* galactomannan antigen in the content of PIP-TAZ and some other antimicrobial agents that are often used for the treatment of infections in immunocompromised patients. The level of galactomannan antigen was determined for PIP-TAZ, ampicillin-sulbactam, ampicillin, penicillin G, ceftriaxone, cefepime, imipenem, clarithromycin, ciprofloxacin,

* 16. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (ECCMID, 1-4 Nisan 2006 Nice, Fransa) sunulmuştur.

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (mine.yucesoy@deu.edu.tr)

vancomycin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole, ornidazole, fluconazole and amphotericin B, by a commercial EIA (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad, France) kit. Galactomannan index (GI) was estimated with the ratio of absorbance values of antimicrobials to cut-off value and evaluated as positive when GI was found >0.5 . Amongst the 15 antibiotics studied, the only positive result was detected for ampicillin with the highest index value (GI=0.540), followed by PIP-TAZ with a relatively high value (GI=0.235) even though it was not in the range of positivity. GI values have ranged from 0.011 to 0.188 for the other antibiotics. In conclusion, the use of especially ampicillin (and probably PIP-TAZ) therapy should be questioned in patients whose sera are being tested for *Aspergillus* galactomannan antigen by EIA in order to evaluate the positive results in terms of false positivities due to cross reactivity.

Key words: Aspergillus, galactomannan, enzyme immunoassay, antimicrobial agents.

GİRİŞ

İnvazif aspergilloz, sıklığı son yıllarda artan ve başta kemik iliği veya organ nakli ve hematolojik kanserli olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve yoğun bakım hastalarında önemli bir mortalite nedeni olan enfeksiyondur¹⁻³. Etkin bir tedavi için invazif aspergillozun doğru ve erken tanısı oldukça önemlidir. Biyopsinin invaziv bir yöntem olması, bronkoalveolar lavaj örneklerinden etkenin üretilme olasılığının ise düşük (%50-60) olması gibi nedenlerle daha pratik tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur⁴⁻⁶. Galaktomannan antijeninin enzim immün yöntemi (EIA) ile araştırılması, invazif aspergillozun tanısında kullanılan kültür dışı yöntemlerden biri olup, erken tanı ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır⁷⁻⁹. Hematoloji hasta grubunda, yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %67-100 ve %81-100 arasında değiştiği bildirilmektedir¹⁰. Galaktomannan antijeninin, nötropenik hastalarda ve transplant hastalarında haftada iki veya üç kez EIA yöntemi ile araştırılması önerilmektedir¹¹. Ancak, piperasilin-tazobaktam kullanan hastaların serumlarında *Aspergillus* galaktomannan antijeninin bu yöntem ile belirlenmesinde yalnızca pozitif sonuçların elde edildiği rapor edilmektedir¹²⁻¹⁷.

Bu çalışmada, piperasilin-tazobaktam ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla kullanılan diğer antimikrobiyal ilaçların içeriğinde *Aspergillus* galaktomannan antijen varlığının ve düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Antimikrobiyal ilaçlar: Galaktomannan antijen düzeyleri, piperasilin-tazobaktam (125 mg/ml; Tazocin, Wyeth, İtalya), ampisilin-sulbaktam (125 mg/ml; Duobaktam, Eczacıbaşı, Türkiye), ampisilin (125 mg/ml; Penbisin, İ.E. Ulagay, Türkiye), penisilin G (500000 IU/ml; İecilline, İ.E. Ulagay, Türkiye), seftriakson (100 mg/ml; Novosef, Eczacıbaşı, Türkiye), sefepim (100 mg/ml; Maxipime, Bristol-Myers Squibb, Türkiye), imipenem (5 mg/ml; Tienam, Merck & Sharp Dohme, Türkiye), klaritromisin (50 mg/ml; Klacid, Abbott, Fransa), siprofloksazin (2 mg/ml; Cipro, Biofarma, Türkiye), vankomisin (50 mg/ml; Vankomisin, Abbott, Fransa), gentamisin (40 mg/ml; Genta, İ.E. Ulagay, Türkiye), trimetoprim/sülfametoksazol (40/20 mg/ml; Bactrim, Roche,

İsviçre), ornidazol (166.6 mg/ml; Biteral, Roche, Fransa), flukonazol (2 mg/ml; Lumen, Mustafa Nevzat, Türkiye) ve amfoterisin B (5 mg/ml; Amphotericin B, Fluka, İsviçre) için araştırıldı.

Galaktomannan düzeylerinin belirlenmesi: Antijen düzeyleri, mikropalak kuyucukları EBA-2 anti-galaktomannan sıçan monoklonal antikorları ile kaplanmış hazır ticari kit (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad, Fransa) ile araştırıldı. Antimikrobiyal ilaçlar 300 µl'lik hacimlerde EDTA içeren işlem çözeltisi ile karıştırıldı ve 3 dakika kaynatıldı. Peroksidaz işaretli anti-galaktomannan monoklonal antikor konjugatından 50'şer µl dağıtılmış kuyucuklara antimikrobiyal ilaç içeren çözeltilerden 50'şer µl pipetlendi. Negatif ve pozitif kontrol serumları için birer, kalibratör serumu için iki kuyucuk kullanıldı. Mikropalaklar 37°C'de 90 dakika inkübe edildikten sonra beş kez yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl substrat çözeltisi dağıtıldı ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek durduruldu ve kontrol ile antimikrobiyal maddelerin optik dansiteleri (OD) plak okuyucu ile 450/620 nm dalga boyunda okundu. Galaktomannan indeksi (GI) değerleri, örneklerin OD değerlerinin eşik (cut-off) değerine bölünmesi ile elde edildi. Üretici firma, negatif ve pozitif sonuçlar için sırasıyla <1.0 ve ≥1.5 değerlerinin eşik değer, 1.0 ile 1.5 arasındaki GI değerlerinin ise orta değer olarak kabul edilmesini önermektedir. Ancak FDA onayı almış ürünlerde >0.5 değerinin pozitiflik için eşik değer olarak kabul edilmesi nedeniyle, çalışmamızda da bu değerler üzerindeki sonuçlar pozitif olarak kabul edildi. Çalışmada her örnek üç kez çalışıldı ve bütün deneyler iki kez tekrarlanarak ortalamaları alındı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 15 antimikrobiyal ilaç arasında tek pozitif sonuç 0.540 GI değeriyle ampisilin için saptanmıştır. Piperasilin-tazobaktam için saptanan değer (GI=0.235) ise pozitiflik sınırına girmemekle birlikte görece olarak ikinci sırayı almıştır. Çalışılan antimikrobiyal ilaçların GI değerleri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. Çalışılan Antimikrobiyal İlaçların Ortalama Galaktomannan Düzeyleri

Antimikrobiyal İlaçlar	Galaktomannan İndeksi (GI)
Sefepim	0.011
İmipenem	0.011
Seftriakson	0.017
Penisilin G	0.020
Ornidazol	0.044
Klaritromisin	0.050
Gentamisin	0.052
Ampisilin-sulbaktam	0.058
Flukonazol	0.065
Trimetoprim sulfametoksazol	0.066
Amfoterisin B	0.098
Siprofloksazin	0.144
Vankomisin	0.188
Piperasilin-tazobaktam	0.235
Ampisilin	0.540

TARTIŞMA

Galaktomannan antijeninin EIA ile araştırılması invazif aspergillozun tanısında hızlı ve tedavinin yönlendirilmesinde önemli bir test olmakla birlikte, piperasilin-tazobaktam (PIP-TAZ) kullanan hastaların serumlarında *Aspergillus* galaktomannan antijeninin bu yöntem ile belirlenmesinde yalancı pozitif sonuçların izlendiği bildirilmektedir¹²⁻¹⁷. *Bifidobacterium* türlerinin ve çeşitli gıdaların, serum galaktomannan antijen testinde yalancı pozitif sonuçlar üzerindeki etkisi de araştırılan konular arasındadır^{18,19}.

Piperasilin-tazobaktam (PIP-TAZ)'ın, *Penicillium* türlerinden üretilen yarı sentetik bir antibiyotik olması nedeniyle, galaktomannan ile çapraz reaksiyon vermesi beklenen bir sonuçtur¹⁶. Walsh ve arkadaşlarının¹² çalışmasında, in vitro değerlendirmede çeşitli antimikrobiyal ilaçlar arasında en yüksek Gİ değeri PIP-TAZ için saptanmıştır. Yirmi dokuz mantar türünün dahil edildiği bir başka çalışmada da, EIA yönteminde galaktomannan ile çapraz pozitifliğin sadece *Penicillium* türleri ve *Paecilomyces variotii* için bulunmuş olması bu düşüncüyü desteklemektedir²⁰. Yine aynı çalışmada bakteriler için çapraz pozitiflik saptanmamıştır²⁰. Çalışmamızda, galaktomannan pozitifliği saptanan ampisilinin de *Penicillium chrysogenum*'dan elde ediliyor olması bu sonucun bir nedeni olabilir²¹. Bart-Delabesse ve arkadaşları²², araştırmamızdaki sonuca benzer şekilde ampisilin preparatları ile de *Aspergillus* EIA testinde pozitiflik saptandığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit ve fenoksimetilpenisilin gibi beta-laktam antibiyotik preparatları ile de pozitiflik saptanmıştır²². Amoksisilin-klavulanik asit ile yapılan bir başka araştırmada, hasta amoksisilin plazma konsantrasyonları ile Gİ değerleri arasında bir korelasyon olduğu izlenmiş ve amoksisilin-klavulanik asit preparatı *Aspergillus* EIA testi ile pozitif sonuç vermiştir²³. Bu araştırmacılar, amoksisilin-klavulanik asit preparatlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *Aspergillus* spp. varlığını araştırmışlar ancak negatif sonuç almışlardır²³. Çalışmamızda, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonunu içeren antibiyotiklerden olan amoksisilin-klavulanik asit çalışılmamış, buna karşın ampisilin-sülbaktamın Gİ değeri negatif sınırlar içinde bulunmuştur.

Adam ve arkadaşları¹⁶, yalancı galaktomannan pozitifliğini son dönemlerde kullandıkları PIP-TAZ preparatlarına bağlamışlar ve yalancı pozitiflik yönünden farklı "lot" taşıyan ilaçlarla farklı sonuçlar elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde başka bir çalışmada, PIP-TAZ için 15 farklı "lot" içerisinde 12 tanesinin çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır¹⁵. Machetti ve arkadaşları²⁴, 30 farklı "lot" PIP-TAZ preparatının %86'sında galaktomannan pozitifliği saptamışlardır. Penack ve arkadaşları²⁵ ise, 13 farklı "lot" PIP-TAZ alan nötropenik hasta grubunda yaptıkları çalışmada, bu ilacın kullanımı ve yalancı galaktomannan pozitifliği arasında bir ilişki olduğuna dair bir kanıt saptamamışlardır. Singh ve arkadaşları²⁶, Platelia *Aspergillus* EIA yöntemiyle bir grup antimikrobiyal ilaçta galaktomannan düzeylerini araştırmışlar ve sadece PIP-TAZ için 0.5 Gİ değerinin üzerinde pozitiflik bulmuşlardır. Araştırmacılar bu pozitifliği, çalıştıkları tüm "lot"larda elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise, PIP-TAZ için Gİ

değeri 0.235 olarak bulunmuş ve bu değer EIA testlerinde yalancı pozitifliğe neden olabilecek bir düzey olarak belirlenmemiştir. Singh ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında ayrıca serumda farklı konsantrasyonlarda bulunan PIP-TAZ için galaktomannan düzeyleri araştırılmış ve yüksek serum konsantrasyonlarında pozitiflik gözlenirken, düşük konsantrasyonlarda saptanmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar, serumlarında *Aspergillus* antijeni araştırılacak hastalarda kan alımının PIP-TAZ enjeksiyonundan önce yapılmasını önermektedir²⁶. Buna karşın Bart-Delabesse ve arkadaşları²², beta-laktam enjeksiyonundan önce kan örneğinin alınmasının GI'ni eşik değerinin altında tutmaya yetmediğini belirtmekte ve olası yalancı pozitiflikleri önleyebilmenin bir yolu olarak her yeni "lot" antibiyotik için GI'nin araştırılmasını önermektedirler. Araştırmamızda antimikrobiyal maddelerin tek bir "lot"unun çalışılmış olması sonuçlarımızın değerlendirilmesinde sınırlayıcı bir unsur olup, birden fazla "lot"un inceleneceği çalışmalardan elde edilecek bulgular, sonuçlarımız ile ilgili daha net fikir elde edilmesine yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak çalışılan antimikrobiyal ilaçlar arasında, sadece ampisilinin içeriğinde galaktomannan varlığının saptanması, EIA ile galaktomannan antijeninin araştırıldığı hastalarda ampisilin kullanımının sorgulanmasının yalancı pozitif sonuçların değerlendirilmesi açısından yararlı olacağını düşündürmektedir. Ayrıca, pozitiflik sınırına ulaşmamakla birlikte göreceli olarak yüksek antijen değeri ile PIP-TAZ'ın da hasta serumlarında çapraz reaksiyona neden olabileceği akılda bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Vandewoude KH, Vogelaers D, Blot SI. Aspergillosis in the ICU - The new 21st century problem? Med Mycol 2006; 44 (suppl): S71-6.
2. Mehrad B, Paciocco G, Martinez FJ, Ojo TC, Iannettoni MD, Lynch JP 3rd. Spectrum of *Aspergillus* infection in lung transplant recipients: case series and review of the literature. Chest 2001; 119: 169-75.
3. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. Crit Care 2005; 9: R191-9.
4. Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL, Miller WT, Cassileth PA. Role of fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. Am J Med 1984; 76: 1027-34.
5. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Clin Pathol 1986; 86: 518-23.
6. Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med 1992; 86: 243-8.
7. Bretagne S, Marmorat-Khuong A, Kuentz M, Latge JP, Bart-Delabesse E, Cordonnier C. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. J Infect 1997; 35: 7-15.
8. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 3223-8.

9. Verweij PE, Rijs AJ, De Pauw BE, Horrevorts AM, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Clinical evaluation and reproducibility of the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis. J Clin Pathol 1995; 48: 474-6.
10. Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W, et al. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra and interlaboratory reproducibility. J Clin Microbiol 1998; 36: 1612-6.
11. Denning DW. *Aspergillus* species, pp: 2674-85. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Pennsylvania.
12. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. J Clin Microbiol 2004; 42: 4744-8.
13. 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: 2184-6.
14. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. N Engl J Med 2003; 349: 2366-7.
15. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan Platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. Clin Infect Dis 2004; 38: 913-6.
16. Adam O, Auperin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. Clin Infect Dis 2004; 38: 917-20.
17. Tanriover MD, Metan G, Altun B, Haşcelik G, Uzun O. False positivity for *Aspergillus* antigenemia related to the administration of piperacillin/tazobactam. Eur J Intern Med 2005; 16: 489-91.
18. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. *Bifidobacterium* lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. Lancet 2004; 363: 325-7.
19. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. Mycoses 1997; 40: 353-7.
20. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. J Clin Microbiol 1997; 35: 257-60.
21. Chambers HF. Penicillins, pp: 261-73. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Pennsylvania.
22. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. J Clin Microbiol 2005; 43: 5214-20.
23. 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: 5362-3.
24. Machetti M, Furfaro E, Viscoli C. Galactomannan in piperacillin-tazobactam: how much and to what extent? Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3984-5.
25. Penack O, Schwartz S, Thiel E, Blau IW. Lack of evidence that false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results are due to treatment with piperacillin-tazobactam. Clin Infect Dis 2004; 39: 1401-2.
26. Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE. Reactivity of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: Clinical implications based on achievable concentrations in serum. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1989-92.