



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA FUNGAL
ETKENLERİN VARLIĞININ FARKLI
MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Ahu SÖNMEZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Fahriye EKŞİ

MART-2014

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA FUNGAL
ETKENLERİN VARLIĞININ FARKLI
MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr.Ahu SÖNMEZ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Fahriye EKŞİ**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA FUNGAL ETKENLERİN VARLIĞININ FARKLI
MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI
DR. AHU SÖNMEZ

12.03.2014

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(imza).....
Prof.Dr. Levent ELBEYLİ
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(imza).....
Prof.Dr. Tekin KARSLIĞİL
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
Doç.Dr. Fahriye EKŞİ
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof.Dr. Tekin KARSLIĞİL (imza)
2. Prof.Dr. Mustafa PEHLİVAN
3. Prof.Dr. Ayşen BAYRAM (imza)
4. Doç.Dr. Yasemin ZER (imza)
5. Doç.Dr. Fahriye EKŞİ (imza)

I. ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim süresince, bilgi, tecrübe ve emeğini esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Fahriye EKŞİ'ye, değerli hocalarım Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL, Prof. Dr. Ayşen BAYRAM, Doç. Dr. Yasemin ZER'e, tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mustafa PEHLİVAN'a, Uzm. Dr. Handan HAYDAROĞLU ŞAHİN'e birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme, eşime ve biricik kızım Öykü'ye çok teşekkür ederim.

Ahu SÖNMEZ
Gaziantep, 2014

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III. ÖZET.....	IV
IV. ABSTRACT.....	V
V. KISALTMALAR LİSTESİ.....	VI
VI. TABLO LİSTESİ.....	VIII
VII. ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
VIII. RESİMLER LİSTESİ.....	X
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Febril Nötropeni.....	3
2.1.1. Nötropenik hastalarda klinik özellikler.....	4
2.1.2. Değerlendirme ve tanı.....	5
2.2. İnvaziv Mantar Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi.....	7
2.3. Mantarların Yapısı.....	9
2.3.1.Hücre duvarı.....	9
2.4. Mantarların Taksonomisi ve Sınıflandırılması.....	10
2.5. <i>Aspergillus</i> Türleri.....	12
2.5.1. Taksonomi ve tarihçe.....	12
2.5.2. Makroskobik yapısı.....	14
2.5.3. <i>Aspergillus</i> 'larda mikroskobik morfoloji.....	14
2.5.4. Tür tanımı.....	16
2.5.5. <i>Aspergillus</i> türlerinin oluşturduğu hastalıklar.....	16
2.5.6. Patogenez.....	18
2.5.7. Konak savunması.....	19
2.5.7.1. Doğal immünite.....	19
2.5.7.2. Kazanılmış immünite.....	19
2.5.8. İnokulum ve inkübasyon süreci.....	20
2.5.9. İnvaziv aspergillozis için risk faktörleri.....	20
2.5.9.1. Olası virülans faktörleri.....	20
2.5.9.2. Hastaya ait risk faktörleri.....	22
2.5.9.3. Çevreye ait risk faktörleri.....	23
2.5.10. İA sınıflandırması.....	23
2.6. <i>Candida</i> Enfeksiyonları.....	24
2.6.1. Taksonomi.....	24
2.6.2. Mikrobiyolojik özellikler.....	24
2.6.3. Epidemiyoloji.....	26
2.6.4. Patogenez.....	27
2.6.5. Virülans faktörleri.....	28
2.6.6. <i>Candida</i> türlerinin yaptığı enfeksiyonlar.....	31
2.7. <i>Cryptococcus</i> Cinsi.....	33
2.8. <i>Fusarium</i> Türleri.....	35
2.9. Hastaların Sınıflandırılması.....	36
2.10. Tanı Yöntemleri.....	39
2.10.1. Mikrobiyolojik tanı.....	39

2.10.1.1. Örnek alımı ve saklanması	40
2.10.1.2. Konvansiyonel yöntemler	40
2.10.1.3. Serolojik yöntemler	41
2.10.1.4. Moleküler yöntemler	46
2.11. Antifungaller	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Hastalar ve Örnekler	52
3.2. Örneklerin Mikolojik İncelenmesi	53
3.2.1. Direkt mikroskopik inceleme	53
3.2.2. Kültür	53
3.2.3. İdentifikasyonu	54
3.2.3.1. Germ tüp (çimlenme borusu) testi	54
3.2.3.2. Mısır unu-Tween 80 agar besiyerinde mikroskopik görünümün incelenmesi	55
3.2.3.3. Otomatize identifikasyon yöntemi	55
3.3. Serolojik Testler	57
3.3.1. Galaktomannan antijen arama	57
3.3.1.1. Testin prensibi	57
3.3.1.2. Yöntem	58
3.3.1.3. Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması	59
3.4. Moleküler Yöntemler	59
3.4.1. İzolasyon kit içeriği	60
3.4.2. Test prensibi	60
3.4.3. Proteinaz K'nın hazırlanması	61
3.4.4. Testin uygulanışı	61
3.4.5. DNA amplifikasyonu	62
3.4.5.1. LightMix kit	62
3.4.5.2. Kit içeriği	62
3.4.5.3. Light Cyclus <i>A.fumigatus</i> çalışma MMX'inin ve kapillerlerin hazırlanması	62
3.4.5.4. M Mix	63
3.4.5.5. Testte kullanılan solüsyonların hazırlanışı	63
3.4.5.6. DNA amplifikasyon karışımı	64
3.4.5.7. Testin uygulanması	64
3.5. Histopatolojik İnceleme	65
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	66
4. BULGULAR	67
4.1. Direkt Mikroskopi ve Kültür Sonuçları	67
4.2. Galaktomannan Antijen Bulguları	69
4.3. PCR Bulguları	70
4.4. Kültür Sonuçlarıyla PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	71
4.5. <i>A. fumigatus</i> PCR ile GM (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarının karşılaştırılması	73
4.6. Histopatolojik Sonuçlarla, Galaktomannan ve <i>A. fumigatus</i> PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	75
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	94

III. ÖZET

FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA FUNGAL ETKENLERİN VARLIĞININ FARKLI MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr.Ahu SÖNMEZ

Uzmanlık Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahriye EKŞİ

Mart-2014, 109 sayfa

Nötropenik hastalarda fungal enfeksiyonların prognozu erken tanı ile yakından ilişkilidir. Bu çalışmada febril nötropenik hastalarda fungal etkenlerin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamıza Dahiliye Hematoloji Kliniğinde Febril Nötropeni tanısıyla takip edilen hematolojik maligniteli, kemoterapötik ilaç kullanan 101 erişkin hasta (64'ü kadın, 37'si erkek) dahil edildi. Hastalardan en az bir en çok beş olmak üzere, en fazla 199 atak boyunca gönderilen klinik örneklerde direkt mikroskopik inceleme ve kültür yapıldı. Bu hastaların her atağında, bir hafta içinde ardışık iki kere gönderilen serum örneklerinde ELİSA yöntemi ile galaktomannan (GM) antijeni ve plazma örneklerinde real-time PCR yöntemi ile *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* DNA'sı araştırıldı. Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü/Mantar Çalışma Grubu sınıflandırmasına göre takip edilen 199 atağın %1,5'u kesin invaziv aspergilloz (İA), %4'ü kandidemi olmak üzere, toplam %5,5'u kesin invaziv fungal enfeksiyon (İFİ), %4'ü yüksek olasılıklı İA, %4'ü düşük olasılıklı İA olarak tanımlandı. Kalan %86,5'i İFİ açısından riskli bulunmadı. Kan kültürü gönderilen 194 atağın %4.1'inde, kateter kültürü gönderilen 12 atağın ise %25'inde *Candida* spp. üredi. GM antijen testinin index değeri 0.5ng/ml olarak kabul edildiğinde; GM antijeni %86.43 atak boyunca negatif, %7.03 atakta bir pozitif, %5.52 atak da ardışık iki ve daha fazla pozitif, %1 atakta herhangi iki serumda pozitif bulundu. Hastaların 199 atağından %98.5'inde *C. albicans* DNA'sı saptanmazken, %1'inde bir pozitif, %0.5'inde ardışık iki ve daha fazla pozitiflik saptandı. Atakların %81.9'unda *A. fumigatus* PCR sonuçları negatif, %16.08'inde bir pozitif, %1'inde herhangi iki serumda pozitif, %1 atakta ise ardışık pozitiflik saptandı. Kesin İA olarak tanımlanan üç hastanın, GM antijen testi her üç hastada da ardışık pozitif bulundu. *A. fumigatus* PCR testleri ikisinde negatif, birinde ardışık pozitif bulundu. Febril nötropenik hastalarda fungal etkenlerin saptanması için konvansiyonel, serolojik ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Febril nötropeni, İnvaziv fungal enfeksiyon, kültür, GM, PCR

IV. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF FUNGAL AGENTS IN FEBRILE NEUTROPENIC PATIENTS WITH DIFFERENT MICROBIOLOGICAL METHODS

Research Asst. Dr. Ahu SÖNMEZ
Specialty Thesis, Department of Medical Microbiology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Fahriye EKŞİ
March-2014, 109 pages

The prognosis of fungal infections in neutropenic patients is closely associated with early diagnosis. In this study it is aimed to investigate the fungal agents in febrile neutropenic patients. 101 adult patients, (64 female, 37 male) followed as Febrile Neutropeny diagnosis in Internal Medicine Hematology Polyclinic with hematological malignancies and using chemotherapeutic drugs were included to the study. Direct microscopic investigation and culture were performed in clinical samples during 199 episodes in patients. Galactomannan antigen (GM) was investigated with ELISA and the DNA of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* was investigated with real-time PCR in sequential serum samples sent in a week of all episodes of these patients. Of the 199 episodes followed by European Organization for Research on Treatment of Cancer/Mycoses Study Group a total of 5,5% was defined as absolute invasive fungal infection (AFI), 4% was defined as higher probability IA, 4% was defined lower probability that 1,5% of these are absolute invasive aspergillosis (IA), 4% of are candidemia. The remaining 86,5% were not at higher risk for AFI. *Candida* spp was proliferated in 4.1% of blood cultures (4.1%), and in 25% of catheter cultures. When GM antigen test index accepted as 0.5ng/ml, GM antigen was found as negative in 86.43% of the episodes, found as one positive in 7.03% of the episodes, found as sequential two or more positive in 5.52% of the episodes and found as positive in any two serums in 1% of the episodes. While *C.albicans* DNA was not determined in 98.5% of 199 episodes, one positivity in 1% and sequential two and more positiveness were determined in 0.5% of the episodes. *A.fumigatus* PCR results of the 81.9% of the episodes determined as negative, 16.08% of the episodes determined as positive and positivity were determined in any two serums in 1% of the episodes and sequential positivity was determined in 1% of the episodes. GM antigen tests were found sequential positive in all three patients diagnosed as definite IA. We think that conventional, serological and molecular methods should be used for the detection of fungal agents in febrile neutropenic patients.

Keywords: Febrile neutropeny, Invasive fungal infection, culture, PCR, GM

V. KISALTMALAR LİSTESİ

ABPA	: Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
AKİT	: Allojenik Kemik İliği Transplantasyonu
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AmB	: Amfoterisin B
AML	: Akut Miyelositik lösemi
BAL	: Bronko Alveolar Lavaj
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CFU	: Colony Forming Unit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EIA	: Enzim Immunassay
ELİSA	: Enzyme Linked Immun Sorbent Assay
EMB	: Eozin Metilen Blue
EORTC	: European Organisation for Research on Treatment of Cancer
FDA	: Food and Drug Administration
FNH	: Febril Nötropenik Hasta
GM	: Galaktomannan
GA	: Güven aralığı
İA	: İnvaziv Aspergilloz
IFN γ	: İnterferon gama
Ig	: İmmünglobülin
IL	: İnterlökin
İK	: İnvaziv Kandidoz
İFİ	: İnvaziv Fungal Enfeksiyon
İPA	: İnvaziv Pulmoner Aspergilloz
KİT	: Kemik İliği Transplantasyonu
KOH	: Potasyum Hidroksit
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MM	: Multipl Myelom
MSG	: Mycoses Study Group
NaCl	: Sodyum Klorür
NHL	: Non Hodgkin Lenfoma
OKİT	: Otolog kemik iliği transplantasyonu
PA-EIA	: <i>Platellia Aspergillus</i> –Enzim Immuno Assay
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
pNA	: p-nitroanilidin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RIA	: Radyo İmmün Assay
RNA	: Ribo Nükleik Asit

Sap	: Salgısal Asit Proteinaz
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SSS	: Santral Sinir Sistemi
Th	: Yardımcı T hücresi
TRA	: Trakeal Aspirat
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tıbbi önemi olan mantarların taksonomik sınıflandırılması	11
Tablo 2. İnsanlarda en sık patojen olarak izole edilen <i>Aspergillus</i> türlerinde makroskopik (koloni rengi) ve mikroskopik görünüşleri	15
Tablo 3. Kandidoz için predispozan faktörler (83).....	27
Tablo 4. İzolasyon kit içeriği.....	60
Tablo 5. Nükleik asitlerin light Cyler cihazındaki siklusları.....	64
Tablo 6. Hastalardan gönderilen örneklerin atak sayılarına göre kültür sonuçlarının dağılımı. 68	
Tablo 7. Testin İndex değeri ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edildiğinde Galaktomannan sonuçlarının dağılımı.....	69
Tablo 8. Testin index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edildiğinde galaktomannan sonuçlarının karşılaştırılması.	70
Tablo 9. Tüm ataklardaki <i>C.albicans</i> PCR sonuçları.....	70
Tablo 10. Tüm ataklardaki <i>A.fumigatus</i> PCR sonuçları.....	71
Tablo 11. Kan kültürü ile <i>C.albicans</i> PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	71
Tablo 12. Kateter kültürü ile <i>C.albicans</i> PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	72
Tablo 13. İdrar kültürü ile <i>C.albicans</i> PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	73
Tablo 14. GM, index ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde çıkan sonuçlar ile <i>A.fumigatus</i> PCR sonuçlarının karşılaştırılması.	73
Tablo 15. <i>A.fumigatus</i> PCR ve Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarını tek pozitif değer anlamlı kabul edilerek karşılaştırılması	74
Tablo 16. <i>A.fumigatus</i> PCR sonuçlarının, Galaktomannan (İndex $\geq 0,5$ ng/ml) ardışık pozitif değerleri ile karşılaştırılması.....	75

VII. ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** *Aspergillus* cinsinin sınıflandırılması 13
- Şekil 2.** *A.fumigatus* PCR pozitif hastamızın yer aldığı çalışmada amplifikasyon eğrisi 65
- Şekil 3.** *C.albicans* pozitif bulunan hastamızın yer aldığı çalışmada amplifikasyon eğrisi..... 65

VIII. RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. <i>C.albicans</i> germ tüp görüntüsü	55
Resim 2. Vitek 2 YST İdentifikasyon Paneli.....	56

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde nütropenik hastalarda fungal enfeksiyonlar en önemli mortalite ve morbidite sebepleri arasındadır (1,2). Hematolojik kanser/transplant vakalarında özellikle uzun nütropeni süresi, organ hasarı ve önceden fungal enfeksiyon ve/veya kolonizasyon öyküsü olan yüksek riskli hasta gruplarında İnvaziv fungal enfeksiyon (İFİ) gelişme riski %15-25'dir (3,4). Gelişen fungal enfeksiyonların %90'nından çoğunda *Candida* ve *Aspergillus* türleri etkindir (5), ancak *Trichosporon*, *Pseudallescheria*, *Fusarium* ve *Scedosporium* türlerine bağlı nadir görülen fungal enfeksiyonlarda da artış gözlenmektedir (6,7).

Nütropenik hastalarda *Candida* enfeksiyonlarında mortalite %50 (8,9) ve *Aspergillus* enfeksiyonlarda ise %100 (10,11) gibi yüksek düzeylerde seyredabilmektedir. Daha önceki çalışmalarda nütropenik hastalarda fungal enfeksiyon tedavisi ne kadar erken başlanırsa prognozun da o kadar iyi olacağı gösterilmiştir. Bu sebeple bu enfeksiyonların erken tanı ve tedavisi çok önem taşımaktadır. Günümüzde İFİ'lerin erken tanısı açısından bize yardımcı olacak yeterli hassasiyet ve özgüllüğe sahip oturmuş bir tanı yöntemi henüz yoktur (12). Tanı, genelde klinik ve laboratuvar bulgularının birleştirilmesi esasına dayanır. Ancak klinik belirtiler çoğunlukla özgül değildir ve başka hastalıklarla karışabilir (13,14). Tanıda kullanılan direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri altın standart yöntemler olup tanıdaki önemini korumaktadır. Ancak hematolojik malignitesi olan hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması, trombositopeni gibi nedenlerle invaziv tanı yöntemlerinin yeterince uygulanamaması ve kültür sonuçları çıkana kadar geçen süre tedavide önemli gecikmelere yol açmaktadır. Bu nedenle erken tanı için geliştirilen testler özellikle kritik hastalarda tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Serolojik olarak mantar antijenlerinin saptanması ve moleküler yöntemlerle nükleik asit araştırılması tanıda önemli gelişmelere neden olmuştur (15). Galaktomannan (GM) antijen testi, 1,3 β-D

Glukan (BDG) testi ve moleküler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testleri üzerinde en çok çalışılan yöntemlerdir (12).

Bu çalışmada, İFİ riski yüksek febril nütropenik hastalarda, direkt mikroskopi, kültür, GM antijen testi ve real-time PCR yöntemlerini kullanarak fungal etkenlerin araştırılması ve kullanılan yöntemlerin irdelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Febril Nötropeni

Febril nötropeni; nötropenik bir hastada herhangi bir çevresel faktör olmaksızın oral ateş ölçümünün 38.3°C'den daha yüksek olmasıdır. En az bir saat süre ile ateşin devam etmesi febril konum olarak adlandırılır (16,17). Genellikle nötrofil sayısının 1000/mm³'den düşük olması nötropeni olarak kabul edilir (18). Ulusal Febril Nötropeni Derneği Çalışma Gurubu'nun hazırladığı kılavuzda ise ateşin oral veya aksiler olarak bir kez 38.3°C'den yüksek veya 1 saat süre ile 38-38.2°C olması olarak tanımlanır. Nötropeni ile nötrofil sayısı 500/mm³'den az olması veya nötrofil düzeyi 500-1000/mm³ arasında olup 48 saat içinde 500/mm³'ün altına düşmesi beklenen durumlar olarak ifade edilmiştir (19). Nötropeni genellikle malign bir hastalık tedavisi sırasında kemoterapinin yan etkisine bağlı ortaya çıkar. Febril nötropenide farklı patojenler enfeksiyöz komplikasyonlara neden olabilir.

Erken dönemlerde sıklıkla enfeksiyonlardan sorumlu olan patojenler bakterilerdir. Son 50-60 yıl içerisinde enfeksiyondan sorumlu bakterilerin yapısı farklılık göstermiştir. 1950-1960 yıllarında *Staphylococcus aureus* başlıca patojen iken 1960'lı yılların sonunda Gram negatif bakteriyel ajanlar (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas* spp.) febril nötropeniden sorumlu olmaya başlamıştır. 1970-1990 yılları arasında ise yeniden Gram pozitif ajanlar ortaya çıkmaya başlamıştır. 2000'li yıllardan itibaren tekrar Gram negatif organizmaların varlığı söz konusudur (17). Günümüzde febril nötropeniden sorumlu olan başlıca bakteriyel etkenler; Gram pozitif bakterilerden, koagülaz-negatif stafilokok, *S.aureus* ve enterokoklar, Gram negatif bakterilerden ise *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. ve *P.aeruginosa*'dır. *Leuconostoc* spp., *Corynebacterium jeikeum*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Capnocytophaga* spp., *Rhodococcus equi*, *Stomatococcus mucilaginosus* ve *Bacillus cereus* febril nötropenik hastalarda daha nadir olarak görülen etkenlerdir. *Candida* ve *Aspergillus* gibi fungal

enfeksiyonlar nütropenin uzadığı daha ileri dönemlerde gözlenir (20). FNH'larda en sık görülen viral etkenler DNA virüslerinden; Herpes Simplex Virüs (HSV), Varicella Zoster Virüs (VZV), Cytomegalovirüs (CMV), Ebstein Barr virüs (EBV) ve Adenovirüstür. RNA virüslerinden ise, İnfluenza, Parainfluenza, Enterovirus, Hepatit A (HAV) ve Respiratory Syncytial Virus (RSV)'dür. FNH'da paraziter etkenlerden *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis* görülebilir (21).

2.1.1. Nötropenik hastalarda klinik özellikler

Febril nötropenik hastaların yarısında gizli veya gösterilmiş bir enfeksiyon varlığı söz konusudur. Bakteriyemi sırasında hastaların en azından yarısında nötrofil sayısı $<100/\text{mm}^3$ 'dür. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan hastalarda funguslar sekonder enfeksiyon nedeni olabileceği gibi primer bir enfeksiyon olarak da ortaya çıkabilirler. Enfeksiyon kaynağı genellikle kemoterapiye sekonder mukozal hasar oluşan gastrointestinal sistemdir. Kateter varlığı veya sık enjeksiyon nedeni ile deri bütünlüğünün bozulması mikroorganizmaların deri yolu ile vücuda girişine zemin hazırlar. Ortaya çıkan enfeksiyon bölgeleri; kan dolaşımı, gastrointestinal sistem (enterokolit ve perirektal enfeksiyon), deri ve yumuşak doku (damar, kateter giriş yerleri) ve solunum sistemidir (sinüzit ve pnömoni). Febril nötropeni tanısı konulan hasta, en kısa sürede enfeksiyon odakları yönünden değerlendirilmeli, enfeksiyon etkenlerini ortaya çıkarmak için mikrobiyolojik incelemeler yapılmalıdır (17). Bu hastalarda inflamasyona ait semptom ve bulgular geri planda olabilir. Hastalarda inflamatuvar cevabın olmaması veya az olması enfeksiyonu saptamada güçlük yaratır. Bu nedenle ağız, farinks, özafagus, akciğer, perine, göz, deri ve damar kateteri gibi giriş yerleri çok dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Hastalarda klinik ipuçlarının az olabilmesi nedeni ile mikrobiyolojik ve radyolojik tüm olanaklar kullanılmalıdır. Laboratuvar çalışmaları, kan kültürlerine ilave olarak mutlaka tam kan, serum kreatinin seviyesi, kan üre-nitrojen, transaminaz düzeylerini de içermelidir.

Enfeksiyon odağı belli ise örnek Gram boyası ile boyanarak incelenmelidir. Kan kültürü periferik kan ve eğer var ise kateterden alınmalıdır. Ayrıca her enfeksiyon odağından kültür alınmalıdır. Gerekirse bronkoalveolar lavaj (BAL) yapılmalıdır.

Özellikle antibakteriyel ve antifungal tedaviye cevap vermeyen hastalarda, viral kültür yada ELISA-PCR-immunfloresan yöntemleri ile viral etkenler araştırılmalıdır. Daha sonra radyolojik işlemlere geçilmelidir. Semptom olmasa da tüm hastalara akciğer grafisi çekilmelidir. Toraks tomografisi akciğer infiltrasyonlarının tanısında yardımcı olabilir (İndium-111 sintigrafisi bazı hastalarda enfeksiyonu lokalize edebilir) (19).

FNH'da giderek artan oranda saptanan fungal enfeksiyonlar için, uzamış nötropeni, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, steroid kullanımı, santral venöz kateter, total parenteral beslenme ve hücrel immünitede bozukluk risk faktörlerini oluşturur (22).

İFİ febril nötropenik hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. *Aspergillus* ve *Candida* türleri FNH'larda en sık rastlanılan mantar etkenleridir (23). Sık karşılaşılan klinik tablolar arasında *Candida* türlerine bağlı üst gastrointestinal sistem enfeksiyonları, fungemi, kronik dissemine (hepatosplenik) kandidiyoz, fungal sinüzit, *Aspergillus*'a bağlı pnömoni ve dissemine enfeksiyon sayılabilir İnvaziv pulmoner aspergilloz (İPA), aspergillozun en korkulan ve mortalitesi en yüksek olan şeklidir. Balgam, idrar, dışkı gibi klinik örneklerden izole edilen *C.albicans*'ın klinik öneminin tartışmalı olmasına karşılık, tek bir kan kültüründe *Candida* üretilmesi önemli bir problem olarak değerlendirilir. En sık görülen *Candida* türleri sırası ile *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*'dir. Son yıllarda *C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.utilis*, *C.dublinskiensis* ve *C.gulliermondii* gibi türler artan sıklıkta görülmeye başlanmıştır. Daha nadir görülen diğer mantarlar *Trichosporon beigeli*, *Blastoschizomyces capitatis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula*, *Malassezia furfur*, *Pseudoallescheria*, *Fusarium* ve *Alternaria*'dır. *Pneumocytis jirovecii* enfeksiyonu daha çok hücrel yetersizlikte görülür (24,25).

2.1.2. Değerlendirme ve tanı

Ateşi olan nötropenik hastada öncelikle, tam bir fizik muayene yapılmalıdır. Bu şekilde, daha sonraki izlemde fizik muayenedeki değişikliklerin değerlendirilmesi daha kolay olur. Enfeksiyon odağı olabilecek periodontal alan, farenks, akciğerler, perine ve anüs, deri, kemik ilgi aspirasyon bölgesi, göz dibi, damar içi kateter giriş yerleri ve

tırnak çevresindeki dokular dikkatle incelenmelidir. Başlangıçta her hastadan tam kan sayımı, C-Reaktif Protein (CRP), transaminazlar, üre, kreatinin, sodyum ve potasyum istenmelidir. Bu parametreler her üç günde bir tekrar edilmelidir. Her hastadan en az iki ayrı venden kan alınarak kan kültürü yapılmalıdır. Santral venöz kateter varsa, bir örnek perifer venden, diğeri ise kateterden alınmalıdır. Kateter giriş yerinde inflamasyon ve akıntı varsa Gram boyama ve kültür yapılmalıdır. İshali olan hastalarda öncelikle *Clostridium difficile* toksini bakılmalıdır. Dışkı kültürü, ishali olan hastaya yapılmalıdır. Dışkı kültürünün rutin olarak yapılması tartışmalıdır. Vankomisine dirençli Enterococcus (VRE) görülme sıklığı fazla olan hastanelerde taşıyıcılığı saptamak için önerilebilir. Üriner sistem ile ilgili bulgu ve semptomları olan, idrar sondası bulunan veya anormal idrar tahlil sonucu olan hastalarda idrar kültürü yapılmalıdır. Bu hasta grubunda, idrar yolu enfeksiyonu olsa bile piyüri görülmeyebileceği akılda tutulmalıdır. FNH'larda Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) incelemesi rutin olarak önerilmez. Ancak santral sinir sistemi (SSS) ile ilişkili enfeksiyon düşünüldüğünde yapılmalıdır. Akciger grafisi solunum sistemi ile ilgili bulgusu olan her hastaya çekilmelidir. Semptomu olmayan hastalarda da daha sonra gelişebilecek olan bulguların veya ortaya çıkan infiltrasyonların değerlendirilmesi için elde bir akciğer grafisinin bulunması yararlıdır (16). Ateşi, tedavinin 5-7. günü devam eden olgularda mutlaka yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı akciğer tomografisi istenmelidir. Bu yöntem akciğer grafisi normal olan FNH'nin en az %50'sinde pnömoni varlığını göstermiştir (26). Pnömonik infiltrasyonu olan ve bir haftalık ampirik tedavi ile yanıt alınamayan hastalarda BAL ve Transbronşial biyopsi (TBB) yapılmalıdır. BAL, ek oksijen desteği ile PaO₂ düzeyi 60mmHg'da tutulabilen, trombosit sayısı 20000/mm³ üzerinde olan olgularda uygulanabilir. İlave olarak yutma güçlüğü varsa özafagus endoskopisi ve biyopsisi, deri döküntüsü varsa mikrobiyolojik ve patolojik inceleme için punch biyopsi yapılmalı ve sinüzit yakınmaları varsa bilgisayarlı tomografi çekilmelidir (16). Fungal enfeksiyon düşünülen olgularda doku tanısı daha değerli olmakla birlikte *Candida* enfeksiyonu ve aspergillozda BDG testi, aspergillozda GM testleri erken dönemde tedavi açısından yol gösterici olabilir (27). Kan kültürlerinde sonucun alınması için 48-96 saat alması febril nötropeni etkenlerinin mikrobiyolojik tanısında moleküler yöntemleri önemli bir çalışma alanı haline getirmiştir. PCR testi fungal enfeksiyon tanısında kullanılmakla beraber henüz kullanılan primerler ve yöntemler standardize edilememiştir. Testin

pozitif olarak yorumlanması için ardışık iki örnekte pozitiflik tespit edilmesi gerekirken, negatif hastalığın dışlanması açısından önemli bulunmaktadır (28).

2.2. İnvaziv Mantar Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Nötropenik hastalarda fungal enfeksiyonlar özellikle 1970'li yıllarda ve 1980'li yılların başında dikkati çekmeye başlamıştır. İnvaziv aspergilloz (İA)'daki artışta son yıllarda tanıda kullanılan görüntüleme ve laboratuvar yöntemlerinin gelişmesinin de payı vardır (29) Hematolojik kanser/transplant vakalarında özellikle uzun nötropeni süresi, organ hasarı ve önceden fungal enfeksiyon ve/veya kolonizasyon öyküsü olan yüksek riskli hasta gruplarında İFİ gelişme riski %15-25'dir (3,4). Son birkaç yılda sağlık alanında yapılan gelişmeler gerçek patojenler ve fırsatçı organizmaların oluşturduğu yaşamı tehdit eden enfeksiyonların sayısında beklenmedik bir artış olmasına yol açmıştır. Bu enfeksiyonlar risk altındaki popülasyonun artmasına bağlı olarak giderek yaygınlaşmaktadır. Bu popülasyonda AIDS'li hastalar, transplant alıcıları, kanser hastaları ve immün baskılayıcı tedavi alan diğer hastalar yer almaktadır. Transplant yapılan veya malignite tedavisi alan hastalarda yoğun ve geleneksel tedaviler daha derin ve daha uzun süren immün yetmezlik durumu oluşturmuştur. Benzer şekilde Yoğun Bakım Üniteleri'nde (YBÜ) invaziv izlem ve agresif tedavilerin kullanıma girmesiyle yaşamı tehdit eden hastalığı bulunan hastaların sağ kalma oranları artmıştır. Öte yandan bu gelişmeler, fungal enfeksiyonlar bakımından risk altındaki insan sayısında artış olmasına da katkıda bulunmuştur. Risk altındaki farklı gruplarda fungal enfeksiyonların insidansında belirgin değişiklikler yaşanmasına yol açan diğer gelişmeler, tedavi ve kemoprofilaksiste azol grubu antifungal ilaçların artan kullanımı ve ampirik tedavi için amfoterisin B (AmB)'nin yaygın kullanımı olarak sayılabilir. *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* gibi iyi bilinen organizmalara bağlı fırsatçı mantar enfeksiyonlarının prevalansında artışa ek olarak, zararsız saprofitler olarak bilinen, gitgide artan sayıda mantar da immün yetmezlikli bireylerde ciddi veya öldürücü enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir. Örneğin, tırnak ve kornea enfeksiyonlarının uzun zamandan beri bilinen bir etkeni olan *Fusarium* türlerinin günümüzde nötropenik kanser hastalarında ve kök hücre nakli alıcılarında ölümcül

yaygın enfeksiyon etkeni olduğu gösterilmiştir. Bu organizmaların önemli patojenler olduklarının ortaya çıkması hem klinik bulguları sık görülen bir hastalık olan aspergillozu taklit edebildiğinden, hem de bu organizmalar, febril nötropenik hastalarda mantar enfeksiyonundan şüphelenildiğinde ampirik olarak kullanılan, AmB'ye genellikle dirençli olduğundan tanı ve tedavide önemli sonuçlar doğurmuştur (30). Fırsatçı mikozlara sebep olarak en iyi bilinen etkenler *C.albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *A.fumigatus*'tur, pozitif mantar kültürü saptanan hastalarda ilk sırada *Candida* türleri daha sonra *Aspergillus* türleri gelir (31,32). Endemik mikozların prevalansının da (*Penicillium marneffeii*, *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma capsulatum*) endemik bölgelerdeki duyarlı kişilerde çevresel maruziyete bağlı olarak hızla arttığı bildirilmektedir (33). Ayrıca yakın zamanda, bir bitki patojeni olarak bilinen *Valsa sordida*'nın bağışık engelli bir lösemi hastasında fungal sinüzite neden olarak ölüme sebep olduğu yayımlanmıştır (34). Bu organizmalar kateter ilişkili fungemi ve peritonit, lokalize enfeksiyonlar (akciğer, cilt, paranazal sinüsler gibi) ve kan yoluyla yayılarak gelişen enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu fungusların birçoğunun önceden patojen olmadıkları bilinirken, günümüzde bağışıklığı baskılanmış hastalarda İFİ etkeni oldukları bildirilmiştir (31). Çok çeşitli patojenler İFİ ile ilişkili olabilmesine rağmen, *Candida* türleri geçmişte en sık sebep olan organizmalardır. Bununla birlikte, Avrupa'daki İFİ epidemiyolojisi son yıllarda *Aspergillus* türlerine kaymıştır ve diğer küf mantarları da gittikçe önemi artan patojenler haline gelmiştir. 1990'lara kadar, kandidoz Avrupa'da immün yetmezlikli hastalar arasında en sık görülen İFİ etkeniydi. O zamandan beri, İA insidansındaki artıştan da anlaşılacağı gibi, epidemiyolojide belirgin bir kayma olmuştur (35,36). Aynı zamanda son yıllarda predominant patojenik *Candida* türü de değişmiştir. 1990'ların başında *C.albicans*, *Candida* enfeksiyonlarının 2/3'ünden sorumlu iken dekad sonunda bu oran %50'ye inmiştir ve *C.krusei* ve *C.glabrata* gibi diğer türlerin oranı artmıştır (37). *C.glabrata* ile ilişkili mortalite oranı %49 olarak saptanmıştır (38). Bağışık engelli fungemili hastalarla yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada *C.krusei* için mortalite oranı %49 iken *C.albicans* için %28 bulunmuştur (39).

2.3. Mantarların Yapısı

Mantarlar bitkilerden farklı olup prokaryotlardan daha yüksek organizasyon gösteren ökaryot mikroorganizmalardır. Boyut olarak bakterilerden daha büyüktürler (mayalar 3-10 μm , küfler morfolojilerinden dolayı kesin olarak bilinmemekle beraber mayalardan daha büyüktür). Nükleusları bir zarla çevrili olup birden fazla kromozoma ve nukleolusa sahiptir. Sitoplazma zarlarında sterol bulunur, sitoplazmalarında mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı içerirler ve ribozomları 80S'tir. Mantarların hücre duvarları glukan, mannan, kitin ve kitozan açısından zengindir. Klorofil içermezler, heterotrofturlar, aerop ve fakültatif anaerop özellikli olabilirler ancak ototrof ve zorunlu anaerop olan bir mantar türü henüz bilinmemektedir. Bazı mantarlar dimorfizm (çift biçimlilik) gösterirler; hem maya, hem de küf şeklinde olabilirler (40).

2.3.1. Hücre duvarı

Mantar hücre duvarı, mantar hücresinin çevreyle ilişkisini sağlarken hücreyi osmotik basınçtaki değişiklikler ve diğer çevresel streslere karşı koruyan dinamik bir yapıdır (41). Hücre duvarının polisakkarit yapıdan zengin üç boyutlu bir yapısı vardır. Çalışmalarda mantar hücre duvarının primer olarak kitin, glukanlar, mannanlar ve glikoproteinlerden oluştuğu gösterilmiştir. Mantar hücre duvarı esas olarak içerdiği glukan, kitin, glikoprotein yapılarının dışında, hücre türüne göre değişiklik gösteren ilave minör hücre komponentleri de (melanin deriveleri, inorganik elementler, fosfatlar ve aminopolisakkaritler) içerir. Hücre duvarında bulunan glikoproteinler, yaygın olarak hem N- hem de O- bağlı karbonhidratlarla değişikliğe uğramıştır ve çoğu durumda glikozil-fosfotidil-inositol (GPI) bağları içerir. Glukan komponenti esas olarak uzun lineer β 1,3 bağlı glukozdan yani β -1,3 glukandan (β -glukan) oluşur. Kitin, duvarın glukan ve glikoprotein kısımlarına göre daha az miktarda yer alır ve β -1,4 bağlı rezidü N-asetil glikozamin zincirlerinden meydana gelir. Glikoprotein, glukan ve kitin komponentleri, hücre duvarı yapısının temelini oluşturan kompleks bir ağ oluşturmak üzere sıkı çapraz bağlarla bir arada olan komponentlerdir. Çoğu mantarda hücre

duvarının en merkezinde β -1-4 bağı ile kitine bağlanan dallı, β -1,3 1,6 glukoz (kor yapı) bulunmaktadır. Bu yapısal merkez, farklı mantar türlerine bağlı olarak farklı şekillerde olabilir ve genellikle fibrilerdir, alkali uygulaması sonrası ortadan kalkan amorf bir yapı içerisine gizlenmiştir (42).

2.4. Mantarların Taksonomisi ve Sınıflandırılması

Bakterilerin sınıflandırılmasında fizyolojik ve biyokimyasal özellikler baz alınmasına rağmen, mantarların sınıflandırılması büyük oranda görünümüne dayanır. Mantarlar mikroskopik yapıda spor oluşturarak ürerler. Üreme eşeysiz (aseksüel: yalnız mitoz vardır) veya eşeyli (seksüel: mayozla, öncesinde iki hücrenin çekirdekleri birleşir) yoldan olabilir. Eşeyli sporlar, mantarların *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota* olarak sınıflandırılmasında esas teşkil eder. Eşeysiz form veya anamorfun, (eşeyli şeklin veya telemorfun kaybolduğu form) çevreye hızla yayılma konusunda, oldukça başarılı olduğu kanıtlanmıştır. Bu mantarların telemorf (eşeyli) formlarının yokluğunda bile, anamorf formlarını (DNA sekanslarına dayanarak) *Ascomycota* ve *Basidiomycota* içine yerleştirmek mümkündür. Geçmişte bu eşeysiz mantarlar 'Fungi Imperfecti'(yada 'form-division *Deuteromycota*) adı altında yapay bir grup içerisinde sınıflandırılmış ve eşeysiz üreme yapılarının morfolojik karakteristiklerine göre yapay 'form-clas'lara bölünmüştür. Günümüzde, kesinlikle anamorfik olduğu düşünülen veya hiçbir telemorfunun saptanmadığı bu mantarlar için ayrı bir resmi gruplama yapılmamaktadır. Tıbbi önemi olan mantarların ana gruplarını gösteren basitleştirilmiş taksonomik şema Tablo 1'de gösterilmektedir (43).

Tablo 1. Tıbbi önemi olan mantarların taksonomik sınıflandırılması (43).

Bölüm: <i>Zygomycota</i>	
Sınıf: <i>Zygomycetes</i>	
Takım: <i>Mucorales</i>	<i>Absidia, Rhizopus</i>
Takım: <i>Entomophthorales</i>	<i>Basidiobolus, Conidiobolus</i>
Bölüm: <i>Basidiomycota</i>	
Sınıf: <i>Basidiomycetes</i>	
Takım: <i>Filobasidioles</i>	<i>Filobasidium, Filobasidiella</i> (<i>Cryptococcus</i> türlerinin teleomorfları)
Takım: <i>Agaricales</i>	<i>Schizophyllum</i>
Bölüm: <i>Ascomycota</i>	
Sınıf: <i>Archiascomycetes</i>	
Takım: <i>Pneumocystidales</i>	Pneumocystis
Sınıf: <i>Hemiascomycetes</i>	
Takım: <i>Saccharomycetales</i>	<i>Clavispora, Debaryomyces, Issatchenkia, Kluyveromyces</i> (<i>Candida</i> türlerinin teleomorfları); <i>Saccharomyces</i>
Sınıf: <i>Euascomycetes</i>	
Takım: <i>Onygenales</i>	<i>Arthroderma</i> (<i>Microsporum</i> ve <i>Trichopyton</i> türlerinin teleomorfları) <i>Ajellomyces</i> (<i>Blastomyces</i> ve <i>Histoplasma</i> türlerinin teleomorfları)
Takım: <i>Eurotiales</i>	<i>Emericella, Eurotium, Neosartorya</i> (<i>Aspergillus</i> türlerinin teleomorfları)
Takım: <i>Hypocreales</i>	<i>Gibberella, Nectria</i> (<i>Fusarium</i> türlerinin teleomorfları)
Takım: <i>Microascales</i>	<i>Pseudallescheria</i> (<i>Scedosporium</i> türlerinin teleomorfları)

Mantarların anatomik lokalizasyonlarına (yüzeysel, deri, deri altı ve sistemik) göre yaptıkları hastalıklar ise aşağıdaki gibidir (44):

1)Yüzeysel mantar enfeksiyonları

Malassezia furfur

Exophiala werneckii

Trichosporon beigeli

Piedraia hortae

2) Kutanöz mantar enfeksiyonları

Microsporum türleri

Trichophyton türleri

Epidermophyton floccosum,

Candida albicans ve diğeri *Candida* türleri

3) Subkutan mantar enfeksiyonları

Sporothrix schenckii

Phialophora verrucosum

Fonsecaea pedrosoi

Pseudallescheria boydii

Madurella mycetomatis

Alternaria, Scedosporium, Curvularia

Lacazia loboi

4) Sistemik mantar enfeksiyonları

a) Gerçek patojen mantarlar

Coccidioides immitis

Histoplasma capsulatum

Blastomyces dermatitidis

Paracoccidioides dermatitidis

b) Fırsatçı patojen mantarlar

Candida albicans ve diğeri *Candida* türleri

Cryptococcus neoformans

Aspergillus fumigatus ve diğeri *Aspergillus* türleri

Mucor, Rhizomucor, Rhizopus, Absidia türleri ve *Zygomycetes*

Fusarium

Geotrichum

Trichosporon

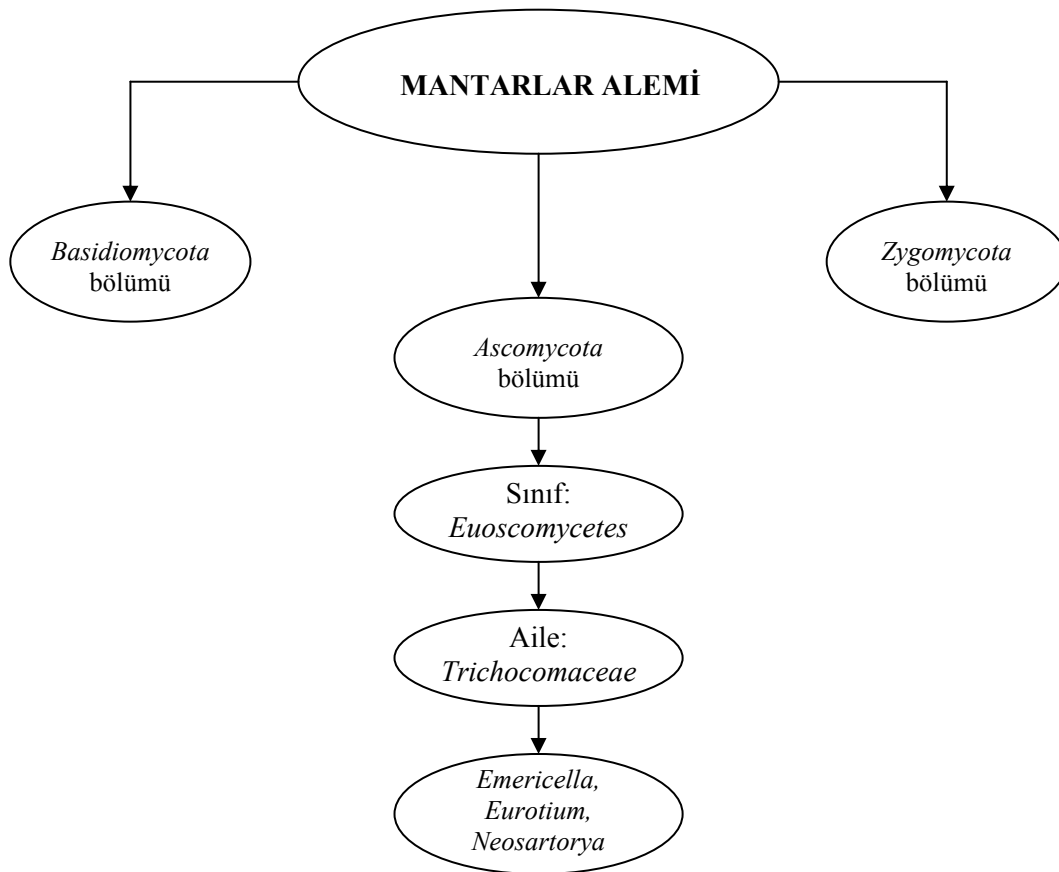
Pneumocystis jiroveci

2.5. *Aspergillus* Türleri

2.5.1. Taksonomi ve tarihçe

Aspergillus'lar tüm dünyada doğal ortamlarda yaygın olarak bulunan yaklaşık 200 türden oluşan bir cinstir (45). *Aspergillus*'ların primer olarak etken oldukları enfeksiyonlar 19. yüzyılın ortalarından itibaren bildirilmeye başlanmıştır (46).

Aspergillus'lar mantarlar (fungi, kingdom) aleminde *Ascomycota* bölümünün *Euoscomycetes* sınıfının *Eurotiales* takımının *Trichocomaceae* ailesinde *Emericella*, *Eurotium* ve *Neosartorya* telemorf formları olan 200'e yakın tür içeren bir genustur (47). Genustaki türlerin çok azı insanda enfeksiyon etkeni iken büyük bölümü doğada, toprakta ve çürümüş bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunan saprofit etkenlerdir (48). İlk kültür izolasyonlar 1944 yılında Culture Collection Unit, Northern Utilization Research Branch laboratuvarlarında yapıldı. Tür tayininde kültürel karakteristikler ve detaylı morfolojik yapılarının görülebildiği Czapek solüsyonu, arpa özlü agar ve mısır unlu agar kullanılmaya başlandı (49). İnsanda ilk aspergilloz olgusu, 1842 yılında tüberküloz kavitesinde aspergillomu olan bir hastanın balgamında bildirildi. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda görülen İA ise ilk defa 1953 yılında tanımlandı (46).



Şekil 1. *Aspergillus* cinsinin sınıflandırılması

Aspergillus, çok büyük bir genustur ancak az sayıda türü insan enfeksiyonlarıyla ilişkili bulunmaktadır. İnsanlarda en sık enfeksiyon etkenleri *A.fumigatus*, *A.flavus*,

A.niger, *A.nidulans* ve *A.terreus*'dur. Bunun dışında uzamış ve derin immün yetmezlikle birlikte invaziv enfeksiyona neden olan daha nadir görülen türler; *A.amstelodami*, *A.avenaceus*, *A.caesiellus*, *A.candidus*, *A.carneus*, *A.chevalieri*, *A.clavatus*, *A.glaucus*, *A.granulosus*, *A.oryzae*, *A.quadrilineatus*, *A.restrictus*, *A.sydowi*, *A.ustus*, *A.versicolor*, *A.wentii*, *Neosartorya fisherii*' dir (49).

2.5.2. Makroskobik yapısı

Aspergillus cinsi mantarların tür tanımlanmasında makroskobik özellikler oldukça önemlidir. Oluşturdukları koloni rengi, büyüklüğü identifikasyonda yol gösterici olup türlerin tanımlanmasında kolaylık sağlar. Koloni yüzeyleri başlangıçta küçük beyaz olup bir süre sonra türlere ve gelişme şartlarına göre sarı, yeşil, kahverengi veya siyah renge dönüşürler. Koloni rengi; mikroskopik komponentlerin (vegetatif hif, konidial baş) ve diğer yapıların rengine bağlı oluşur. Ayrıca koloninin rengi besiyerin yüzeyinde ve altında farklı olabilir. Genellikle kolonilerinin yüzeyi pudralı görünür. Türlerin tanımlanmasında büyüme oranı önemli karakteristik özelliktir. Böylece standart şartlarda büyüme sürecinde belli zamanlardaki koloni boyutu önemli bir özelliktir. Koloni sınırları kalın ve keskin sınırlı, ince ve diffüz, düz veya düzensiz lobüler, yüzeyel yada batık koloniler olabilir (45).

2.5.3. *Aspergillus*'larda mikroskobik morfoloji

Mikroskobik morfoloji, genelde tüm türlerde aynı olmakla birlikte bazılarında türe özgü olup, identifikasyon için anahtar rolü oynar (Tablo 2). Miçelyum denilen iyi gelişmiş dallanan septalı hifaları vardır. Hifalar ince ya da kalın ve az ya da çok sporlanabilirler. Hücreleri çoğu zaman çok çekirdeklidir. Miçelyum faz; etkin üreme ve bol konidiya üretimi ile uzama ve konidiofordan oluşan fazdır. Konidiofor ise ayak hücresi denilen özelleşmiş hücrelerden gelişir (45). *Aspergillus*'lar hif ve konidiaları yardımıyla seksüel ve aseksüel üreme gösterirler. Telemorfik üreme fazını laboratuvar ortamında göstermek zor olduğu için *Aspergillus*'lar genelde aseksüel üreme fazındaki

anamorfik yapılarının (hif ve konidiya) özelliklerine göre tanımlanmaktadır (50). Anamorfik tanımlama da önemli olan morfolojik yapılar şunlardır: Hif (filamentöz uzantılar); duvarları birbirine paralel, septalı ve hiyalinlidir. Konidiya (spor); aseksüel evrede üremeyi sağlayan yapıdır. Tek hücreli, bölmesiz, yüzeyi düzgün, pürüklü, dikensi, şeffaf yada renkli olabilmektedir. Konidiyofor; konidiya üreten hücreleri taşıyan özelleşmiş yapıya konidiyofor (fertil hif) denilmektedir. Rengi ve yüzeyinin düz, tırtıklı olması septalı ve septasız olması, konidiyofor uzunluğunun farklı olması türden türe farklılıklar gösterir. Vezikül; konidiyoforun üst yarısındaki şişkin bölüm olup *Aspergillus* cinsi için tipik bir yapıdır. Türler göre yüzeyinin belli bölümünden konidiyum üretimi sağlayan fiyalid denilen hücreler çıkar. Fiyalid; vezikülü kısmen veya tamamen örten dar boyunlu şişecik biçimindeki yapılardır. Fertil hif de denilir. Veziküle bitişik olan fiyalidlerin tek sıralı (uniseriate) veya çift sıralı (biseriate) dizilimleri, türden türe değişiklik gösterir. Sterigma; fiyalid yerine kullanılan bir başka terminolojidir. Tek sıra diziliimli yapılarda birincil sterigma (metula), çift sıra diziliimli yapılarda ise ikincil sterigma, konidiya oluşumunu sağlamaktadır. Bazı *Aspergillus* türlerinde Hülle hücreleri ve Ask keseleri gibi özel yapılara da rastlanmaktadır (45,51,52).

Tablo 2. İnsanlarda en sık patojen olarak izole edilen *Aspergillus* türlerinde makroskobik (koloni rengi) ve mikroskobik görünüşleri (53).

Türler	Makroskobik Görünüm (Koloni rengi)		Mikroskobik Görünüm		
	Yüzey	Taban	Konidiyofor	Fiyalid	Vezikül
<i>A.fumigatus</i>	Gri, mavi, yeşil	Bronzdan beyaza	Kısa (<30µm), düz, renksiz veya yeşil	Tek sıralı	Yuvarlak, kolumnar baş
<i>A.flavus</i>	Sarı-yeşil	Sarıdan kırmızı kahverengiye	Renksiz, pürüzlü	Tek sıralı veya iki sıralı	Yuvarlak, radyal baş
<i>A.niger</i>	Siyah	Beyazdan sarıya	Uzun, düz, renksiz veya kahverengimsi	İki sıralı	Yuvarlak, radyal baş
<i>A.terreus</i>	Tarçın, kahverengi	Beyazdan kahverengiye	Kısa (<30µm), düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, sıkı kolumnar
<i>A.versicolor</i>	Başlangıçta beyaz, sonra sarı, bronz, soluk yeşil veya pembe	Beyazdan sarıya veya kırmızı mor	Uzun, düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, dağınık radyal baş

2.5.4. Tür tanımı

Tanımlama da kullanılan özellikler şunlardır:

- Konidyalı başların biçimi ve rengi
- Sterigmata (fiyalidler) sayısı
- Vezikül biçimi
- Konidyoforların yapısı ve rengi
- Hülle hücrelerinin biçimi

Tanım için tarif edilmiş standart besiyerleri Czapek Dox agar (%3 sukroz) ve %2 Malt Özüğü agardır. *A.glaucus* ve *A.restrictus* grupları gibi ozmofilik türler tanıma uygun gelişme ve konidya oluşturmak için yüksek (%20-40) glukoz yoğunluğuna gereksinim duyarlar (51,52).

Patojenik *Aspergillus* türleri geniş kültür ısılarında, birçok besiyerinde hızlı ve kolaylıkla ürer. Nadiren kan kültürlerinde de üreme olabilir. 37°C’de üreme ile patojenik türler patojenik olmayanlardan ayrılabilir. *A.fumigatus* termotoleran bir tür olup 55°C’ye kadar üreyebildiği gibi 70°C’ye kadar da canlılığını koruyabilmektedir (45).

2.5.5. *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar

Önceleri ‘aspergillozis’ terimi, *Aspergillus* ile oluşmuş herhangi bir hastalığı veya kolonizasyonu tanımlamak için kullanılırdı. Oysa günümüzde daha çok invaziv veya allerjik hastalıkları belirtmek için kullanılmaktadır. Çoklu organ tutulumu söz konusu ise, “dissemine aspergillozis” adını alır. Aspergillom ise, akciğer ve sinus kavitelerinde meydana gelen mantar toplarını ifade etmektedir. *Aspergillus* türlerinin normal veya immün baskılanmış konakta yol açtığı hastalıklar şu şekilde sınıflandırılmıştır (54):

1. Normal konakta

A. Allerjik aspergillozis

- a. Allerjik bronkopulmoner aspergillozis (ABPA)
- b. Allerjik *Aspergillus* sinüziti, riniti veya astım

- c. Eksternal alerjik alveolitis/ hipersensitivite pnömonisi
- B. Yüzeysel veya invaziv olmayan enfeksiyon
 - a. Pulmoner aspergillom
 - b. Sinüs aspergillomu
- C. İnvaziv enfeksiyon
 - a. Otomikoz
 - b. Onikomikoz
 - c. Kutanöz aspergillozis
- 2. Doku zedelenmesi, cerrahi veya yabancı cisim ilişkili
 - A. Keratit ve/veya endoftalmit
 - B. Kutanöz veya yumuşak doku enfeksiyonu (yanık v.b.)
 - C. Cerrahi alan enfeksiyonu (protez kapak endokarditi, karaciğer transplantasyonu sonrası yara enfeksiyonu, subdural ampiyem)
 - D. Yabancı cisimle ilişkili enfeksiyon (katater, vasküler greft)
 - E. Aspergillom
 - F. Osteomyelit
 - G. Ampiyem/Plevral aspergillozis
 - H. Peritonit
- 3. Özellikle immünsistemi baskılanmış hastalarda
 - A. Primer kutanöz aspergillozis veya mukoza aspergillozisi
 - B. Sinoorbital aspergillozis
 - C. Pulmoner aspergillozis
 - a. Akut invaziv
 - b. Kronik nekrotizan
 - c. İnvaziv *Aspergillus* trekeobronşiti
 - D. Dissemine aspergillozis
 - E. Santral sinir sistemi aspergillozisi
 - F. Gastrointestinal enfarkt

Klinik örneklerden izole edilen herhangi bir *Aspergillus* türünün patolojik öneminin değerlendirilmesi, pozitif radyolojik bulgularla bile zordur. Çünkü *Aspergillus* türleri, rutin olarak solunum yolu, deri ve diğer örneklerden izole edilebilirler. Aspergillozla ilgili en inandırıcı kanıtlar biyopsi ile alınan akciğer dokusu gibi, normalde

steril olan yerlerden organizmanın izole edilmesi ve histopatolojik olarak gösterilmesidir. Sinüs dokusu, biyopsi örnekleri, kalp kapakları ve oftalmolojik örneklerde üretilebilirler. Ayrıca, operasyon sonrası cerrahi yara yeri enfeksiyonlarından da etken olarak izole edildikleri bildirilmiştir (43,55). Astım, allerjik sinüzit ve alveolit gibi allerjik hastalıklar sürekli olarak *Aspergillus* konidyası veya antijenine maruz kalan insanlarda miçel kolonizasyonu olmaksızın ortaya çıkar ve birçok durumda hastaların çevreden uzaklaştırılması klinik olarak iyileşmeye yol açar. Bunun tersine Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA), aspergilloma ve İA enfeksiyonları vücutta miçel üremesi ile ilişkili sendromlar olup, çoğunlukla tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (56).

2.5.6. Patogenez

A.fumigatus, insan aspergilloz enfeksiyonlarının %90'ından izole edildiği için patogenez araştırmalarında en çok çalışılan tür olmuştur. *A.fumigatus* çevresel karbon ve nitrojen dönüşümünde önemli rol oynayan saprofit bir mantardır. Doğal olarak organik yıkıntılar üzerinde, toprakta ürerler. Bu tür, dünyada yaygın olmamasına karşın hava kaynaklı konidiyumlu mantarlar arasında en yaygın olanıdır. Her konidiyal başlıkta binlerce konidiya oluşturarak yoğun bir biçimde sporlanmaktadır. Havaya yayılan söz konusu konidiyumlar akciğer alveollerine ulaşabilecek kadar küçüktür (2-3 µm) *A.fumigatus* konidiyasının havaya yayılması çevresel şartlar ve güçlü hava akımına bağlıdır. Konidiyaların küçük olma özellikleri, havaya yayıldıktan sonra, ev içinde veya ev dışında havada kalmalarını sağlamaktadır. Çevresel araştırmalar, tüm insanların günlük olarak en az yüzlerce *A.fumigatus* konidiyasını inhale ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla, birçok yatkınlık taşıyan hastada, diğer organlara da yayılım görülmesine rağmen, hastalık predominant olarak akciğerlerde oluşmaktadır (56). Daha az sıklıkla cerrahi yaralar (57), kontamine intravenöz kateterler veya kontamine bandaj uygulamaları gibi yollarla ciltten giriş sonrasında kutanöz enfeksiyonlar gelişebilmektedir (58). Bağışıklık sisteminin baskılanması sonrasında inhale edilmiş olan konidiyum genişler, germinasyon sonrası hif haline dönüşür. Akciğer dokusundaki germinasyonun inkübasyon süresi iki gün ile aylar arasında değişebilir. Organizmanın

37°C'de üreyebilme yeteneği ve üreme hızı, etkenin patojenitesini ve oluşan enfeksiyonun ilerleme hızını belirleyici özellikler arasındadır. En hızlı gelişen tür *A.fumigatus* olup besiyerine bağlı olarak germinasyon 5-12 saat içinde başlar (59).

2.5.7. Konak savunması

2.5.7.1. Doğal immünite

Aspergillus için özgül olmayan savunma faktörleri; anatomik bariyerler, mukus tabakası, silyaların hareketi ve akciğer sürfaktanı, fagositik hücrelerdir. Konidyalara karşı ilk hücrel savunma makrofajlar tarafından olur. Makrofajlar konidyaları öldürürken aynı zamanda salgıladığı sitokin ve kemokinlerle hücrel direncin koordinasyonunu da sağlar. Makrofajlardan kaçan şişmiş konidiya ve hifler, nötrofiller ve monositler tarafından öldürülmektedir. Bunların dışında, trombositlerde *Aspergillus* türlerine karşı savunmada rol almaktadır. Hif yapıları komplemanı hem alternatif hem de klasik yoldan, konidyumlar ise çok zayıf olarak alternatif yoldan aktive etmektedir (56,60,61).

2.5.7.2. Kazanılmış immünite

İA'daki kazanılmış bağışık yanıtları, Th aktivasyonunun iki şekli belirlemektedir. Th1 yanıtı, inflamatuvar sitokinlerden IFN γ , IL-2 ve IL-12'nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin (makrofaj ve PMNL) uyarılmasıyla birliktelik gösterir. Th2 tipindeki yanıt ise, genellikle minimal hücrel cevap ile ilişkilidir, IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini artırır, antifungal efektör hücre aktivitesinin baskılanmasına ve IFN γ üretiminin azalmasına yol açar (56). Sonuçta, diğer mantarlarda olduğu gibi Th1 sitokinlerin üretimi koruyucu olarak görülürken, Th2 baskın yanıtlar sergileyen konaklarda ilerleyen bir enfeksiyon gelişmektedir (62).

2.5.8. İnokulum ve inkübasyon süreci

İA gelişmesi duyarlı konağın yeterli inokulumla karşılaşması sonrası gelişir. Enfekte edici inokulum miktarının konağa bağlı olduğu söylenmektedir. Hastalığın gelişme süresi ise tam olarak açıklık kazanmamıştır. Nötropenik hastaların birçoğunda hastanede yatarken *Aspergillus* kolonizasyonu gelişmekle beraber İA'un derin nötropenin onikinci gününden önce başlamadığı belirtilmektedir (51).

2.5.9. İnvaziv aspergillozis için risk faktörleri

2.5.9.1. Olası virülans faktörleri

Aspergillus türlerinin hastalık oluşturabilmeleri için, konak dokusuna tutunmalarını, dokuya penetrasyonlarını ve özellikle fagositik hücreler gibi savunma elemanlarını etkisiz hale getirmelerini sağlayan bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (63).

Adezinler: *Aspergillus* konidiyumları fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albumin, immünglobülinler, kollajen ve sürfaktan gibi konakta dolaşımda veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanırlar (63). Bu bağlanma özgül olmayan fizikokimyasal etkileşimlerle ve/veya özgül reseptör-ligand ilişkisi aracılığıyla olabilir (56,63). Konidiyumların komplemanla veya mannoz bağlayan protein ve sürfaktan gibi diğer proteinlerle opsonizasyonu, konak savunmasının mikroorganizmaya karşı etkinliğini arttırabilir. Ancak *A.fumigatus* patojenitesinin artmasını sağlayan bir kompleman inhibitörü salgılar (59).

Pigmentler: Pigmentsiz sokak tipi *A.fumigatus* suşlarının, yeşil konidiyalı suşa göre daha az patojen olduğu gösterilmiştir. Dihidroksinaftalen melanin biyosentezinde rol alan, poliketid sentazı kodlayan ALB1 ve sitalon dehidratazı kodlayan ARP1 olmak üzere iki gen klonlanmıştır. İzojenik pigmentsiz mutantlarla yapılan çalışmalarla sokak tipi pigmentsiz suşlardan elde edilen sonuçlar uygunluk göstermiştir. Beyaz *A.fumigatus* konidiyasının komplemana daha çok bağlandığı ve duvarının daha geçirgen olduğu

gösterilmiştir. Ancak hemen hemen tüm sokak tipi konidiyaların yeşil ve invaze edici hiyalinler olması dolayısıyla, bu sonuçların hastalık kontrolü üzerinde pek fazla anlamı yoktur. Bunun dışında, steroid verilen farelere inokule edilen pigmentsiz konidiyaların İA oluşturamadığı görülmüştür (56).

Toksik Moleküller: *A.fumigatus* birçok toksik sekonder molekül oluşturmaktadır. En yoğun olarak çalışılanı ise, epipolitiiodioksopiperazin ailesine ait bir metabolit olan, gliotoksindir. Akut olarak toksik olan bu bileşiğin aynı zamanda bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliği vardır (63). Bu özelliklerinden dolayı, kemik iliği nakli yapılan hastalarda bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılmıştır. Gliotoksin makrofaj aracılı fagositozu inhibe eder ve antifagositik özelliğinden farklı bir mekanizmayla makrofajlarda apopitozu indükler. Ayrıca T ve B hücrelerinin aktivasyonunu ve sitotoksik hücrelerin oluşumunu da bloke eder. (64). *Aspergillus* cinsi mantarlar özel bir toksin sınıfı olan ribotoksinleri üretir. Ribotoksinler yaklaşık 17 kDa büyüklüğünde bir protein sınıfıdır ve restriktosin, α sarkin ve mitogillin gibi ürünleri içerir. Restriktosin *A.fumigatus* ve *A.restrictus* tarafından üretilen ve üzerinde en yoğun çalışılan ribotoksindir. Ökaryot ribozomları üzerine nanomolar konsantrasyonlarda çok toksik etkili olduğu gösterilmiştir. Gliotoksin, fumagillin ve restriktosin gibi metabolitlerin bağışıklık sistemini baskılayarak mantar büyümesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (63). Başka bir toksik madde olan hemolizin ise eritrositlerin parçalanmasından sorumludur (56). Bunların dışında *A.flavus* tarafından oluşturulan aflatoksinin bağışıklık sistemini baskılayıcı ve karsinojenik etkisinin olduğu, fagositozu, hücre içi öldürmeyi ve makrofajlar tarafından oluşturulan spontan süperoksit üretimini baskıladığı ileri sürülmüştür (61).

Enzimler: *Aspergillus* türleri kendi besin maddelerini karşılayabilmek için fosfataz, peptidaz ve proteazlar gibi çok çeşitli hücre dışı enzimleri üretme yeteneğine sahiptirler. (63). Proteazlar, proteinlerin peptid bağlarını (CO-NH) kıran ve peptid veya serbest aminoasitlerin oluşmasına neden olan reaksiyonları katalize ederler. *A.fumigatus*'un iki elastazı, bir serin proteazı ve metalloproteazı klonlanmış ve sekanslanmıştır. Elastin akciğer dokusunun %28'ini oluşturan ana yapısal bileşenlerinden biridir (59,64). Elastaz üreten türlerin 48-96 saat içinde akciğer dokularında hifal gelişim gösterdiği ve alveol

nekrozuna yol açarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Hücre dışı elastinolitik alkalın proteaz olan AFA1p'nin kollajen, fibrin, fibrinojen ve elastini parçaladığı gösterilmiştir (63). Bir diğer enzim grubu olan fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerde bulunan bağları hidrolize ederler. Fosfolipidler hücre membranının ana bileşenlerinden olduğundan doku invazyonu sırasında fosfolipazlarla parçalanırlar ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda *A.fumigatus* izolatlarının fosfolipaz A, B, C ve D salgıladıkları gösterilmiştir. Fosfolipazların hepsi 37°C'de ekspresse edilmektedir (65). Ayrıca *A.fumigatus*'ta üç katalaz ve iki süperoksit dismutaz bulunmuştur. Bu maddeler mantarı oksijen molekülünün, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin ve fagositler tarafından üretilen diğer serbest radikallerin hasarından koruyabilir (51).

2.5.9.2. Hastaya ait risk faktörleri

İA'da en önemli savunma mekanizması nötrofil fonksiyonu ve oksidatif öldürmedir. Bu nedenle, Polimorf nükleer lökositlerin (PMNL) disfonksiyonu olan AIDS ve kronik granümatöz hastalık gibi hastalıklarda İA insidansı artmıştır. Son zamanlarda T hücrelerin *Aspergillus*'a karşı immün yanıtındaki rolleri de belirginleşmeye başlamıştır. Nötrofillerin uyarısıyla oluşan yardımcı T hücre yanıtı, özellikle Th1 fagositik aktiviteyi arttırarak mantar enfeksiyonunun sınırlandırılmasına yardımcı olur. Bunun yanında Th2 aktivitesi, özellikle IL-4 ve IL-10 aracılığıyla, makrofaj ve nötrofil aktivitesini baskılayarak invazyonun ilerlemesine yol açabilir. Bu nedenle dokudaki Th1/Th2 hücre oranı *Aspergillus* enfeksiyonunun prognozunu değiştirebilir (66).

Kortikosteroid kullanımı İA açısından önemli bir risk faktörüdür. Kortikosteroidlerin *Aspergillus*'un büyümesini invitro şartlarda %30-40 hızlandırdığı gösterilmiştir. Bunun yanında kortikosteroidler, makrofajların ve nötrofillerin antifungal aktivitelerini bozar (67).

İA insidansı değişik hasta gruplarında farklılıklar gösterir ve nötropeninin süresiyle doğru orantılı olarak artar (49). Hematolojik malignansilere veya aplastik anemiye bağlı uzamış nötropenisi olan, allojenik kök hücre transplantasyonu veya akciğer transplantasyonu yapılmış olanlar, AIDS ve kronik granümatöz hastalığı

olanlar, yanık hastaları, uzun süreli kortikosteroid kullananlar yüksek risk grubunda yer alır. Her geçen gün immün baskılayıcı tedavi uygulamasının artmasıyla otoimmün hastalığı, multipl myelomu olan hastalarda da İA görülmeye başlanmıştır (66).

2.5.9.3. Çevreye ait risk faktörleri

Aspergillus, insanın yaşam ortamında bulunur. Saman yığınlarında spor yoğunluğu $10^6/\text{mm}^3$ 'ün üzerindedir. Hastane ortamında İA için en önemli çevresel risk faktörü havadaki spor yoğunluğudur ve İA gelişimi ile korele olduğu bulunmuştur (68). Spor yoğunluğu mevsimsel olarak değiştiği gibi, kontamine havalandırma sistemleri ve hastane inşaatı sonucu da havadaki spor sayısı artar. İA genellikle nozokomiyal enfeksiyon olarak kabul edilir, ancak özellikle allojenik kök hücre transplantasyonu sonrası geç dönemde, Graft versus host (GVH) hastalığına bağlı olarak gelişen İA olgularında tanı genellikle hastane dışında konur ve bu hastalarda enfeksiyonun kaynağı tartışmalıdır (69). İA'un inkübasyon periyodu bilinmediği için bu hastaların enfeksiyonu nereden aldıkları saptanamaz. Epidemiler sırasında genellikle havadan ve kontamine olduğu düşünülen yüzeylerden örnekler alınır, ancak kısa süreli spor yayılımına yol açan kontaminasyon kaynakları bilinmemektedir, bu da enfeksiyon kontrolünü zorlaştırmaktadır (66). Enfeksiyon kaynağının ve mikroorganizmanın giriş yerinin her zaman bilinmemesi, *Aspergillus* suşlarının genetik çeşitliliğinin fazla olması ve patojenite ile korelasyonunun sağlanamamış olması, çevrede aynı anda bir çok tipin bulunabilmesi ve bir hastanın birden fazla genotiple enfekte olabilmesi nedeniyle İA'ların epidemiyolojisini çalışmak zordur (66).

2.5.10. İA sınıflandırması

Interscience Conference on Antimicrobial Agents'ın (ICAAC) 1999 yılında yapılan Kongresinde, Belçika'daki Avrupa Kanser Araştırma Organizasyonu İnvaziv Fungal Enfeksiyon Çalışma Grubu (EORTC-IFICG) ile Bethesda Mantar Çalışma Grubu (NIAID-MSG) bir konsensus oluşturmuş ve İA tanımları standardize edilmiştir.

Hastalar kesin (proven), yüksek olasılıklı (probable), düşük olasılıklı (possible) olarak 3 grup şeklinde tanımlanmıştır (70). Daha sonra tanı tekniklerinde ilerlemeler ve tanımlamadaki gereklilikler nedeniyle sınıflama revize edilmiş ve 2003'den 2005 yılına kadar süren toplantılarla yeni bir sınıflama protokolü oluşturulmuş, hastalar yine üç grup şeklinde tanımlanmış ama grupların kapsamı değiştirilmiştir (71). EORTC/MSG kriterlerinin son hali "hastaların sınıflandırılması" bölümünde anlatılmıştır.

2.6. *Candida* Enfeksiyonları

2.6.1. Taksonomi

Candida'larla ilgili ilk bilgiler Hippocrates'a kadar uzanmaktadır. İlk olarak 1665'de Galen ve Peppy pamukçuğu göstermiş, 1839'da Langenbeck afttan bir mantar bulmuş ancak bunu tıfonun etkeni olarak bildirmiştir. Pamukçuğun mantar yapısında bir etkene bağlı olduğu 1841 yılında Berg ve 1844 yılında Bennet tarafından ortaya konulmuş, bu mikroorganizmaya 1843 yılında Rubin *Oidium albicans* adını vermiş, daha sonra 1890 yılında Zaptin *Monilia albicans* ve en son Berkhout 1923 yılında *Candida albicans* adını kullanmıştır (72,73). *Candida*'lar, Deuteromycetes (fungi imperfecti) sınıfının *Cryptococcales* takımında yer alır. Deuteromycetes sınıfı içerisinde seksüel fazları gözlenmemiş mantarlar bulunmaktadır (73).

2.6.2. Mikrobiyolojik özellikler

Candida'lar, ince duvarlı, oval, kapsülsüz, hareketsiz, Gram-pozitif, 1-3x4-6 µm boyutlarında, lateral tomurcuklanma ile aseksüel olarak üreyen, fakültatif anaerob mayalardır. Maya formu dışında kültür ve dokularda yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilirler (74). Yalancı hif, arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyumların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları bir hücreler zinciridir. *Candida* türleri arasında *C.albicans* ve çok daha seyrek izole edilen *C.dublinskiensis* ve *C.norvegensis* gerçek hifler de oluşturabilirler (75). Gerçek hifler ise apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (74). *Candida* türleri, Sabouroud

Dekstroz Agarda (SDA) ve kanlı agarda oda ısısında (22-26°C) ve 37°C'de kolayca üreyebilirler. Kültür için alınan örnekler hem 26°C hem de 37°C'de ayrı ayrı inkübe edildiğinde 37°C'de ürememe, saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Patojen kandidaların çoğu hem 26°C hem de 37°C'de ürerler. Üretildikleri ortamda neme ihtiyaç duyarlar (%30-40). En iyi üreme pH 4.5-5 arasındadır, ancak pH 3-7.5 arasında da üreyebilirler. Oda ısısında ve SDA besiyerinde 24-48 saatte krem renkli, opak, düzgün yüzeyli, 1-2 mm'lik tipik maya kokusu olan S tipi koloniler oluştururlar. Kandida kolonileri, S formundan R formuna kendiliğinden dönüşebilir. R tipi kolonilerin oluşumu daha çok miçellerin miktarının artması ile ilgilidir. *C.albicans* bazen ilk izolasyonlarda SDA'da buruşuk koloniler oluşturabilirler. Bunlar alt kültürlerinde S tipi kolonilere de dönüşebilirler. *C.albicans* kanlı agarda kısa, kenarları yıldızlı uzantıları olan koloniler oluştururlar (72,74).

Candida'ların hücre duvarı, konak ile başlıca etkileşimden sorumlu yapıdır ve çeşitli moleküllerin iç-dış ortamlar arasında geçişlerinde rolü vardır. Aynı zamanda maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) doğrudan görev alır. Ayrıca mantarın maya veya hif formunun karakteristik şeklinin korunmasından sorumludur ve hücreyi osmotik, kimyasal ve fiziksel hasarlara karşı korur (76,77). *C.albicans*'ın hücre duvarı, hücrenin kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturur. Hücre duvarının ana bileşenleri (%80-90) karbonhidratlardır. Proteinler (%6-25) ve lipidler (%1-7) minör duvar bileşenleri olarak bulunurlar. Karbonhidratlar ise başlıca üç temel polisakkarit yapısında bulunur: 1) proteinlerle kovalent olarak bağlanmış mannoz veya mannan polimerleri (mannoproteinler). 2) β -1,3 ve β -1,6 bağları içeren dallanmış glukoz polimerleri olan β -glukanlar. 3) β -1,4 bağları içeren, dallanmamış N-asetil-D glukozamin (GlcNAc) polimerlerinden oluşan kitin (78).

Mikrofibriler polimerler olan β -glukanlar ve kitin, duvarın yapısal komponentleridir. Hücreye güçlü fiziksel özellikler sağlayan sert iskeleti oluştururlar. β -glukanlar, hücre duvarı ağırlığının %47-60'ını oluşturan ana bileşenidirler. Kitin ise küçük (%0.6-9) ama önemli bir komponenttir (78). Düşük kitin düzeyli mutantların, osmotik olarak hassas olduğu ve anormal morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir (77). Öte yandan mannan, yapısal polimerler olan β -glukanlar ve kitinin içine gömüldükleri amorf matriksi ve hücre duvarı karbonhidratlarının %40'ını oluşturur. Bu karbonhidratlar içerisinde en önemlisi mannan olup, hücre duvarının majör antijenik komponentidir ve

mannoprotein yapısında olan fimbriyaların epitelyal hücelere bağlanmada rolleri vardır (78). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı elektron dansitesindeki farklılığa göre ayrılan ve değişik kalınlıkta en az beş tabaka içermektedir (75,79). Bu tabakalanma, hücre duvarı bileşenlerinin (β -glukan, kitin ve mannan) her tabakada niteliksel olarak değil, nicelik olarak farklı oranlarda bulunmasından kaynaklanmaktadır (78,79). Maya hücresi ve germ tüp (hif) hücre duvarı kompozisyon olarak benzerdir, bununla birlikte rölatif miktarları morfolojiye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (78). Örneğin, *C.albicans* hif hücre duvarında mayadakinin üç katı kitin bulunur (78,80). Hücre membranı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde rol alır. Kitin sentetaz gibi, duvar bileşenlerinin sentezinde rolü olan enzimler de membranda bulunurlar. Ayrıca *C.albicans*'ın morfogenezi (maya-hif dönüşümü ve hifal uçtan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alırlar. *Candida*'ların hücre zarında; fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inozitol gibi fosfolipidler bulunur. Tüm mantarlarda olduğu gibi, *Candida*'ların da hücre membranında bulunan sterol, membran lipidlerinin %20'sini oluşturur. Sterolün %95'i ergosterol formundadır. Ergosterol, antifungal ilaçlar için en önemli hedeftir (75).

2.6.3. Epidemiyoloji

Candida türleri, özellikle *C.albicans*, normal nüfusun yaklaşık %20'sinin kommensal florasında (orofarenks, gastrointestinal sistem, vajen, deri) bulunur (81). *C.albicans*, florada en sık bulunan tür olmakla beraber deri florasında diğer türlere göre daha az yer alır. Ayrıca *C.albicans* çevrede de ender olarak bulunur. (75). *Candida* türleri, hafif seyreden, deri ve mukoz membranları tutan yüzeysel enfeksiyonlardan, hayatı tehdit edici, invaziv, birçok sistemi tutan enfeksiyonlara kadar değişen bir spektrumda klinik tablolara neden olur. *Candida*'nın çoğalması ve konak savunmasına karşı gelebilmesi için bağışıklık sisteminde bazı değişikliklerin meydana gelmiş olması gerekir (82). *C.albicans* tüm kandidozlarda en sık görülen etkindir. Ancak son yıllarda albicans dışı türler de sistemik kandidoz olgularında %46'lık bir oranda daha sık

görülmektedir. Kandidoz etkeni olarak albicans dışı türlerin artması, geniş etki alanlı antibiyotik ve antineoplastik ilaçların kullanımı, damar içi kateterizasyon, nötropenik ve immüsuprese hastaların sayıca artması, flukonazolün yaygın kullanımı ve ayrıca hastane ortamında personelden bulaşmaya bağlanmaktadır. Kandidoz için predispozan faktörler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Kandidoz için predispozan faktörler (83)

Kutanöz ve mukozal kandidoz	Fizyolojik faktörler: Gebelik, ileri yaş, bebeklik Travmatik faktörler: Maserasyon, yanık, diğer enfeksiyonlar Hematolojik faktörler: Hücrel immün yetersizlik, AIDS Endokrin faktörler: Diabetes mellitus İyatrojenik faktörler: Antibakteriyel kullanımı, doğum kontrol hapi
Sistemik kandidoz	İyatrojenik faktörler: İmmüsupresyon, organ nakli, cerrahi, Steroid tedavisi, sitotoksik ilaçlar, antibakteriyel antibiyotikler, kateterler, hiperlimantasyon, protez kalp kapağı Hematolojik faktörler: Kronik granümatöz hastalık, aplastik anemi, agranülositoz, lösemi, lenfoma Diğer faktörler: Malinite, malnütrisyon, travma, intravenöz ilaç bağımlılığı, periton diyalizi
Kronik mukokutanöz kandidoz	Hematolojik faktörler: Hücrel immün yetmezlik Endokrin faktörler: Hipoparatiroidizm, demir metabolizması bozuklukları Diğer faktörler: Timoma, heredite, A hipovitaminozu

2.6.4. Patogenez

Candida’lar insan organizması üzerinde 3 şekilde bulunabilirler:

- 1) **Flora üyesi olarak:** Çeşitli *Candida* türleri vücudun belirli bölgelerinde yerleşerek bu bölgelerde bulunan diğer flora üyesi mikroorganizmalarla birlikte denge halinde yaşamlarını sürdürürler. Bu denge bozulmadığı sürece hastalık oluşturmazlar.
- 2) **Kolonize olarak:** Uzun süre yüksek dozda antibiyotik, kortikosteroid, immün sistemi baskılayıcı ilaç kullanımı, çeşitli kronik hastalıklar gibi hazırlayıcı faktörlerin varlığı sonucu vücudun belirli bölgelerinde az sayıda bulunan *Candida*’lar sayıca çoğalarak o bölgeye yerleşirler. Bu duruma kolonizasyon adı verilir.

- 3) **Enfeksiyon etkeni olarak:** Vücutun belirli bölgelerinde kolonize olan *Candida*'lar, ya buldukları bölgede ya da çevreye yayılarak enfeksiyon oluştururlar (84). *Candida*'lar fırsatçı enfeksiyon yapan mantarlardır (82,84).

2.6.5. Virülans faktörleri

Adezyon: *Candida*'ların mukozal epitelyum ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun da ilk aşamasıdır ve kandidozun ortaya çıkmasında önemli bir adımdır (85). *Candida*'ların adezinleri, integrin analogları (memelilerdeki CR-2 benzeri olan C3d reseptörü ve CR-3 benzeri olan iC3b reseptörü), fibronektin reseptörü, adeziv mannoproteinler (hücre duvarının en dışında mannoproteinlerden oluşan radyal uzantılı fibriller), N-Acetylglucosamine bağlayıcı protein, salgısal asit proteinaz, faktör 6, laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan protein olarak tanımlanmaktadır (76). *C.albicans* aderansı en fazla olan türdür (76,85).

Dimorfizm: Bazı mantarlar, dimorfizm denen, biri küf evresi diğeri maya evresi olmak üzere, en az iki yapı özelliği gösterirler (86). *Candida* türleri içerisinde miselyum (küf) üreterek çoğalabildiği bilinen tek tür *C.albicans*'tır (85). *C.albicans*, deri ve mukozalarda kommensal olarak, patojen olmayan morfotipi olan maya hücreleri şeklinde bulunur. Patojen morfotipe değişimine neden olan en önemli faktörler deri bütünlüğünün bozulması, antibiyotik ve oral kontraseptiflerin kullanımına bağlı olarak vajen florasının değişmesi ve çeşitli nedenlere bağlı olarak konağın bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır (87).

Fenotipik değişim: Fenotipik değişim, geri dönüşümlü olan, *C.albicans* suşlarında spontan olarak sıklıkla gözlenen bir olaydır. İki şekilde oluşabilir; a) Tipik olarak *C.albicans* WO-1 suşunda gözlenen, yuvarlak tomurcuklanan hücrelerden oluşan beyaz kubbeli koloniden, büyük, uzun, asimetric tomurcuklanan hücrelerden oluşan gri düz koloniye dönüşüm, beyaz-opak (w-o) dönüşümü olarak adlandırılır ve 10^{-4} sıklıkta oluşur. b) Koloni morfolojisinde 10^{-2} - 10^{-4} sıklıkta oluşan değişim sonucu, düzgün (smooth), tüylü (fuzzy), düzensiz (irregular), yıldız (star), halka (ring), noktalı (stippled)

ve şapka (hat) koloni morfolojileri ortaya çıkabilmektedir. Fenotipik değişimle ilgili klinik açıdan en önemli özellikler, bu değişimin antifungal ilaçlara duyarlılığı, konak hücreye adezyonu, antijeniteyi, aspartil proteinaz aktivitesinin düzeyini, nötrofil ve oksidanlara duyarlılığı etkiliyor olmasıdır (75,85,87).

Slime faktör ve biyofilm oluşturma: İlk kez 1982’de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktörü protein, hekzoaminler, nötral şekerler ve fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır. Bu faktör %40 karbonhidrat ve %27 protein içeren glikokaliks yapısında, hücre dışı bir maddedir. Slime faktörü mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan sorumludur. Bu yüzeylerde fibrin, fibronektin ve slime faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta ve bu biyofilmden oluşan mikroorganizma çoğu kez sepsise yol açmaktadır (88).

Tıbbi gereçlerin implantasyonundan sonra ilk olay, tükürük, mukus, serum veya kan gibi gereci çevreleyen farklı vücut sıvılarındaki çeşitli makromoleküllerin (fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin vb.) yüzey üzerinde birikerek “conditioning film- hazırlayıcı film” oluşturmalarıdır. Mikroorganizmalar genellikle çıplak gerecin yüzeyine değil, bu film tabakasına tutunurlar. İlk adezyon geri dönüşümlü gevşek bir tutunma tarzındadır. Bu, ekzopolimer üretimi ile sıkı bir tutunmaya dönüşür. Ekzopolimerler, makromoleküllerin oluşturduğu film tabakasını saran slime (glikokaliks) tabakasını oluşturur. Mikroorganizmalar, bu slime tabakası içinde çoğalarak ve ekstraselüler matriks salgılamaya devam ederek kalın bir film tabakasına yol açarlar, buna biyofilm denir (89).

Biyofilm matriksinin yapısında, oranları *Candida* türüne göre farklılık göstermekle birlikte, karbonhidrat, protein, heksozamin, fosfor ve uronik asit bulunur (90). Farklı *Candida* türlerinin, hatta farklı *C.albicans* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri farklıdır. Bununla birlikte, biyofilm oluşumu ile en çok ilişkilendirilen tür *C.albicans*’tır (91). Birçok çalışma *Candida* biyofilmlerinin klinik olarak önemli antifungaller olan amfoterisin B, flukonazol, flusitozin, itrakonazol, ketokonazol, nistatin, terbinafin ve yeni azollere (vorikonazol ve ravukonazol) dirençli olduğunu göstermiştir (92). Bununla birlikte amfoterisin B (AMB)’nin lipid formülasyonları

(lipozomal AMB ve AMB lipid kompleks) ve ekinokandinler (kaspofungin ve mikafungin) biyofilme karşı etkili bulunmuştur (89,92).

Salgısal aspartik proteinaz (Sap): *C.albicans*'ın hücre dışı proteinaz enzimi ilk kez 1965 yılında Staib tarafından bulunmuştur (93). Kimyasal özelliklerinden dolayı salgısal asit proteinaz, karboksil proteinaz isimleri de kullanılır (75). *Candida* asit proteinazı düşük pH'ye ihtiyaç duyar, fizyolojik pH, *Candida* proteinazının aktivitesine engel olur (93,94). *Candida*'nın asit proteinaz sekresyonu uygun glukoz konsantrasyonuna bağlıdır. Glukozun, proteinazı indükleyen kritik konsantrasyonu türler arasında değişir. Diabetiklerin kandidoza tipik yatkınlığında, yüksek glukoz varlığında fungal proteinazın indüklenmesinin rolü olduğu düşünülür (93). Enzim, *C.albicans* kökenlerinin çoğu tarafından ve daha az oranda *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenlerince üretilir. *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii* ise nadiren salgılar (75,95). Asit proteinazların, *Candida*'ların mukozalara kolonizasyonunun erken dönemlerinde rol aldığı gösterilmiştir (85,94). Asit proteinazın mayayı konağın savunma sistemine karşı koruduğuna dair bulgular vardır. Proteinaz salgılayan suşların, fagositoza ve hücre içi öldürmeye karşı daha dirençli oldukları gösterilmiştir (94). Salgısal asit proteinaz enzim ailesi, 10 farklı gen tarafından kodlanmaktadır (SAP 1-10) (95,96). SAP gen ekspresyonunun mantarın mayadan hife geçişi (dimorfizmi) ve fenotip değişimi ile ilişkisi olduğu bulunmuştur. SAP1, SAP2 ve SAP3 genlerinin yalnızca maya hücrelerinde, SAP4, SAP5 ve SAP6'nın ise hif hücrelerinde eksprese olduğu; SAP1'in *C.albicans*'ın opak fenotipinde, SAP2 ve SAP3'ün ise hem opak hem de beyaz fenotipte eksprese olduğu belirtilmiştir (85).

Fosfolipaz: Fosfolipaz (PL) terimi, gliserofosfolipidlerdeki bir ya da daha fazla ester bağını hidrolize etme yeteneği olan bir grup enzim için kullanılır. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipidleri kullanmakla birlikte, her enzim spesifik bir ester bağına etki eder (97). Nitekim fosfolipazlar, fosfolipid molekülündeki hedefleri olan spesifik ester bağlarına göre A, B, C ve D şeklinde sınıflandırılırlar (97) *C.albicans* tarafından salgılanan fosfolipazlar, epitelyal hücre membranını parçalayarak ve hifal yapının sitoplazmaya girmesini sağlayarak, kandidozdaki konak doku invazyonunda önemli bir rol üstlenir (98). Son zamanlarda *albicans* dışı *Candida* türlerinin de fosfolipaz

üretimini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, *C.albicans*'a kıyasla, albicans dışı türlerin salgıladığı fosfolipaz miktarı belirgin derecede düşüktür. Örneğin, *C.krusei*'nin fosfolipaz aktivitesi, *C.albicans*'inkinin yaklaşık onda biri kadardır (97).

Esteraz: Esteraz aktivitesi, patojen *Candida* türlerinin biyotiplendirilmesi sırasında bulunmuştur. Enzimin aktivitesi, yalnızca tek karbon kaynağı olarak Tween 80 ve diğer tweenleri içeren besiyerinde gözlenmektedir. Tween, polioksietilensorbitan bileşiklerinin bir karışımıdır (99). Tween opasite testinde besiyerinde opasite gözlenmesi hidrolizin göstergesidir ve *Candida* türlerinin lipolitik enzim üretimi ile ilişkilidir. Serbest kalan yağ asitleri besiyeri içerisinde bulunan kalsiyuma bağlanırlar ve oluşan bu kompleks inokülasyon bölgesinin etrafında çözünmeyen kristaller olarak görülürler (100).

2.6.6. *Candida* türlerinin yaptığı enfeksiyonlar

Candida türlerinin yapmış olduğu enfeksiyonlar aşağıdaki gibidir (101):

Hematojen enfeksiyonlar

- 1-Kandidemi
- 2-Endoftalmit
- 3-Vasküler katater ilişkili enfeksiyonlar
- 4-Septik trombofilebit
- 5-İnfektif endokardit
- 6-Artrit
- 7-Osteomiyelit
- 8-Menenjit
- 9-Piyelonefrit
- 10-Pulmoner kandidiyazis
- 11-Kronik dissemine kandidiyazis (Hepatosplenik kandidiyazis)

Non hematojen enfeksiyonlar

A) Yüzeysel enfeksiyonlar

- 1-Kutanöz kandidiyazis
- 2-Orofaringial kandidiyazis
- 3-Vajinit

B) Derin yerleşimli enfeksiyonlar

- 1-Özefageal kandidiyazis
- 2-Sistit
- 3-Peritonit
- 4-Trakeit/ bronşit

Kandidemi: *Candida* türleriyle gelişen nozokomiyal fungeminin hastanede yatış süresini ortalama 30 gün uzattığı ve tek başına %38 mortaliteye neden olduğu gösterilmiştir (102). Kandidemi için <1 yaş ve >65 yaş grubunun, kanser hastalarının, diyabet hastalarının ve santral venöz kateter (SVK) taşıyan hastaların daha fazla risk altında olduğu belirlenmiştir. *Candida*'ların kan dolaşımına ulaşmaları başlıca gastrointestinal sistem (GİS) mukozasından, damar içi kateterler yoluyla, pyelonefrit gibi lokalize enfeksiyon odağından olmaktadır (103). Hastanede yatan hastada, hücrel bağışıklığı baskılayan bir enfeksiyon veya travma ile birlikte geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, mukozal yüzeylerde *Candida*'nın aşırı çoğalmasına neden olur. Daha sonra nötrofil migrasyon ve mikrobisidal aktivitesinin baskılanması ve GİS mukozasının bütünlüğünün bozulması, enfeksiyonun yayılımıyla sonuçlanır (103,104). Özellikle (santral venöz kateter) SVK'li hastalarda, *Candida*'nın damar içi kateter yüzeyinde kolonizasyonu da kan dolaşımına önemli bir geçiş yoludur. Çalışmalar göstermiştir ki; kandidemi yönünden en riskli hastalar "immün sistemi baskılanmış hastalar" ve "yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar" olmak üzere iki gruptur (103). Nozokomiyal kandidemili hastalarda yapılan bir çalışmada en güçlü risk faktörü olarak uygulanan antibiyotik sayısı saptanmıştır. Üçten fazla antibiyotik alanlarda kandidemi riski hiç antibiyotik almayan veya en fazla iki antibiyotik alanlara göre 12.5 kat yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada kandan başka vücut bölgelerinden *Candida* izole edilmesi, hemodiyaliz ve "Hickmann" kateteri diğer anlamlı risk faktörleri olarak saptanmıştır (104).

Kandidemi etyolojisinde en sık etken olan *C.albicans*'tır. İkinci sırada ABD'de *C.glabrata* yer alırken, Avrupa'da *C.tropicalis* veya *C.parapsilosis* etken olmaktadır. *C.glabrata* flukonazolün profilakside kullanıldığı hastalarda ve yaşlılarda artan sıklıkta görülmekte ve bu türe bağlı enfeksiyonlar daha ağır ve ölümcül seyretmektedir. *C.parapsilosis* daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidemiye yol açmaktadır. *C.tropicalis* kandidemileri daha çok nötropeni ve mukoziti olan, özellikle flukonazol profilaksisi almamış olan hastalarda görülmektedir. *C.krusei*'ye bağlı kandidemiler daha çok hematolojik malignitesi olanlarda ve/veya kemik iliği ve kan alıcılarında, özellikle flukonazol profilaksisi uygulanan hastalarda görülür (103).

Kandidüri: *Candida* türleri için üriner sistem kolonizasyonunu, enfeksiyondan ayıracak basit bir yöntem yoktur. Hastanın risk faktörlerini buldurması, semptom ve fizik muayenede bulgularının olmaması ve laboratuvar incelemesinde lökositozun bulunmaması alt üriner sistem kolonizasyonunu düşündürür. Bakteriyel üriner sistem enfeksiyonunda piyüri varlığı ve kantitatif idrar analizi kolonizasyon ile enfeksiyon arasındaki farkı ortaya koymasına karşı, piyüri ve lökositoz gibi enfeksiyonu düşündüren bulgular kandidürinin enfeksiyon tanısında açık tanı kriterleri değildir. İdrar sedimentinde psödohiflerin varlığı veya yokluğu da problemi çözmede yararlı olmamıştır. İdrarda kandida kültürlerinde, kanlı agar ve SDA gibi çeşitli besiyerlerinde üretilen kandidaların koloni sayısı konusu da tartışmalı olmakla beraber tek Kateter örneğinde veya düzgün alınan orta akım idrarında 10.000 CFU/ml aşan *Candida* sayılarının böbrek enfeksiyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (105,106).

2.7. *Cryptococcus* Cinsi

Cryptococcus cinsi çok sayıda tür içerir bunlardan bazıları; *C.neoformans*, *C.albidus*, *C.laurentii*, *C.luteolus*, *C.terreus*, *C.uniguttulatus*. Bunlar arasında tek insan patojeni olarak kabul edilen *C.neoformans*'tır, ancak *C.albidus* ve son zamanlarda tanımlanan *C.adeliensis*'de olmak üzere birkaç diğer tür, ender de olsa, ileri derece de düşkün hastalarda etken olarak saptanmıştır. *Cryptococcus*, şekli yuvarlaktan ovale kadar değişebilen maya benzeri bir mantardır. Büyüklüğü değişken olup çapı 3,5-8 µm

veya daha fazladır. Tek tomurcuklanma gösterir ve yavru hücre ana hücreden dar bir boyunla ayrılır. Bazen birden çok tomurcuklanma ve yalancı hif oluşumu gösterebilir. Karakteristik olarak polisakkarit (galaktoksilomannan) bir kapsülü vardır; kökene ve kullanılan besiyerine bağlı olarak kapsül, hücre çevresinde, genişle çok zor görülebilecek bir incelik arasında değişebilen çapta ve açık renkte bir alan olarak saptanır. Çini mürekkebi ile yapılan direkt preparasyonlarda veya polisakkariti saptama amacıyla müsikarmin ile boyanmış doku preparasyonlarında kapsül kolaylıkla görülebilir. Kapsül maddesinden ötürü, kolonileri tipik olarak mukoid olup zamanla kuru ve mat bir görünüm alırlar. Çok ince kapsüllü kökenler, *Candida* kolonilerine benzer görünümde olabilirler. Cinsin tüm üyeleri üreaz oluşturur, çeşitli karbonhidratları kullanır ve nonfermentatiftirler (43). *C.neoformans*, önemli insan patojeni mantarlar arasında, Heterobasidiomycetes sınıfından bir maya olarak tanımlanmış ilk mantardır. *C.neoformans*'ın belirlenmiş en az beş serotipi vardır: A, B, C, D ve hibrid bir serotip olan A/D. A ve D serotipleri telemorfik evre olan *Filobasidiella neoformans* oluştururken, B ve C serotipleri ise başlangıçta *Filobasidiella bacillispora* olarak tanımlanmış telemorfik evreyi oluştururlar. A ve D serotipleri bağışıklığı bozulmuş bireylerde hastalık yapmaları nedeniyle fırsatçı patojenler iken, B ve C serotipleri ise bağışıklığı sağlam bireylerde hastalık oluşturmaları nedeniyle primer patojenlerdir. Serotipler standart laboratuvar testleri ile ayırt edilemezler. *C.neoformans*'ın farklı serotiplerinin epidemiyolojileride farklıdır. *C.neoformans* var. *grubii* ve *C.neoformans* var. *neoformans* (sırasıyla A ve D serotipleri) tüm dünyada yaygın olan serotiplerdir. *C.neoformans*'ın çevreden ilk izolasyonu, 19.yüzyılın sonlarında Sanfelice'nin mayayı şeftali suyunda saptaması ile olmuştur. Bu tarihten sonra, *C.neoformans* var. *grubii* ve *C.neoformans* var. *neoformans*'ın en sık olarak kuru güvercin (ve diğer kuş) dışkısı ve bu dışkı ile kontamine toprakla ilişkili olduğu bulunmuştur. Primer kriptokok enfeksiyonu, mantarın solunum yolundan akciğerlere girmesiyle başlar. Bunun ardından, genellikle enfeksiyon kan yolu ile beyin ve meninkslere yayılır. Deri, kemik ve eklemlere de yayılım olabilir. İnsan bağışık yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu olmayan kişilerdeki kriptokokkoz, özellikle de kriptokok menenjit; lupus eritamotozus, sarkoidoz, lösemi, lenfoma ve Cushing sendromu gibi altta yatan bir hastalık varlığında ortaya çıkar. Kriptokokkoz, AIDS hastalarının yaklaşık %45'i için AIDS'i ilk tanımlayan hastalık olarak bildirilmiştir.

AIDS’de görülen kriptokok menenjitinde, kriptokok antijen titrelerinin saptanması ile kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürlerinin yapılması tanının konulmasında yararlı olmaktadır. *Cryptococcus* türlerinin tümü nonfermentatif aeroblardır. Türlerin ayrımı çeşitli karbonhidratların asimilasyonu ve KNO_3 indirgenmesine göre yapılır. Fikse edilmiş dokuda ayırımı Fontana-Masson boyası ile yapılabilir. Bu boya hücre duvarındaki melanin prekürsörlerini saptar. Müsikarmin boyasıda kapsülü boyar ve böylece *Cryptococcus* türlerinin benzer morfolojiye sahip mayalardan ayırımında yardımcı olur (43).

2.8. *Fusarium* Türleri

Fusarium türleri insan ve hayvanlarda enfeksiyon ve toksikoz oluşturabilen, karmaşık yapılı toprak saprofiti ve fakültatif bitki patojenidirler. İnsanlarda gözlenen enfeksiyonların en sık karşılaşılan etkeni *F.solani*’dir. Ancak *F.oxysporum*, *F.moniliforme*, *F.verticillioides*, *F.proliferatum*, *F.napiforme*, *F.nygamai*, *F.subglutinans* ve *F.sacchari* gibi diğer *Fusarium* türleri de enfeksiyon etkeni olabilir. *F.solani* mantar keratitin en yaygın nedenidir. *Fusarium* türleri tarafından oluşturulan ve insanlarda hastalığa neden olan çok sayıda toksin ve metabolit vardır. Özellikle kontamine olmuş gıda ürünlerinin tüketilmesiyle hastalık oluşturur. *Fusarium*’un oluşturduğu invaziv enfeksiyon sık görülmemesine karşın, hematolojik kanserli nötropenik hastalarda, solid organ transplant alıcılarında ve allojenik kemik iliği alıcılarında yaygın enfeksiyon insidansının arttığı görülmektedir. Bu hastalarda prognozun kötü sonuçlanmasıyla ilişkili en önemli faktörler, kalıcı seyreden nötropeni ve kortikosteroid kullanımınıdır. Solunum yolu, gıda ve travmatik inokülasyon öne sürülmesine rağmen, invaziv enfeksiyon gelişmiş bir çok olguda giriş yolu bilinmez. Bazı hastalarda enfeksiyon onikomikozun ardından gelişebilir ve sıklıkla da selülit ile ilişkilidir. Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda, hastane su sistemi de bir enfeksiyon kaynağı olarak bildirilmiştir. Hastalık keratit, onikomikoz, yanık, nekrotik deri dokusu ve ülserlerin kolonizasyonu, sinüzit, miçetom dahil derin doku enfeksiyonu, endoftalmit, peritonit, endokardit, osteomyelit, artrit, deri altı ve beyin abseleri şeklinde kendini gösterebilir. Yayılım göstermiş *Fusarium* enfeksiyonlarının sık görülen klinik

bulguları deri lezyonları, fungemi, rinoserebral tutulum, pnömoni veya bunların kombinasyonlarıdır. Deri lezyonlarının biyopsisi tanıda yardımcı olabilir. İnvaziv Aspergillozlu olgularda, *Aspergillus* türlerinin kan kültürlerinde düşük oranda izole edilmesinin aksine, yayılım gösteren *Fusarium* enfeksiyonunda kandan yüksek bir izolasyon oranı (%60) vardır. Direkt incelemede, *Fusarium* türlerinin hifleri; büyüklük (3-6 µm), septum oluşumu, dallanma tarzı ve damar invazyonuna eğilim göstermeleri bakımından *Aspergillus*, *Paecilomyces* veya *Scedosporium* türlerine benzer. Hifler, hem invaziv Aspergillozda yaygın bir şekilde görüldüğü gibi birbirine eşit kalınlıkta ikiye dallanma (45°'lik açıyla dallanarak) hem de dik açıyla dallanma sergilerler. Fiyalitlerin yanısıra mikrokonidyumlar, nadiren makrokonidyumlar ve tomurcuklanan hücreler kan damarlarının lümenlerinde veya oksijenlenen dokularda bulunabilirler. İmmünohistokimyasal yöntemler bazı hiyalen küflerin oluşturduğu enfeksiyonların ayırımında yardımcı olabilirler, fakat çapraz reaksiyon sorun oluşturur, bu nedenle serolojik testlerin kullanımı yaygın değildir. Kesin tanı için mantarın izolasyon ve identifikasyonunun yanısıra, mantar elemanlarının dokuda gösterilmesi gerekir (43).

2.9. Hastaların Sınıflandırılması

İFİ'li hastaların komplike olması, tanıların aynı şekilde karmaşık olması, çalışmalara değişik hasta grupları alınması ve verilerinin toplanmasındaki güçlükler nedeniyle 2000 yılında Avrupa'dan bir grup ve ABD'den bir grup bir araya gelerek klinik araştırmalarda ortak bir dil konuşulmasını sağlamak için bir uzlaşma metni oluşturmaya karar verdiler. Avrupa tarafını EORTC (Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu), ABD tarafını ise MSG (Mikoz Çalışma Grubu) oluşturmaktaydı. Çeşitli toplantıların ardından 2002 yılında EORTC/MSG İnvazif Fungal İnfeksiyonlar Tanımları yayınlandı (70). Bu tanımlar ya da bu kılavuz 2008 yılında yenilendi (71). İlk kılavuz ile son kılavuz arasında en önemli farklar, ilk kılavuz hematolojik kanser ve kök hücre nakli ile ilgili iken, son kılavuzda buna solid tümör ve immunsupresse hastalar da eklenmiştir. Son kılavuzda, şüpheli fungal enfeksiyon tanımı

daraltılırken, olası fungal enfeksiyon tanımı genişletilmiştir. Ateş bir host faktörü olmaktan çıkmış, radyolojik bulgular genişletilmiştir. Bu uzlaşma metnine göre invaziv fungal enfeksiyon olasılığını arttıran durumlar 3 alt başlıkta incelenmektedir:

1. Host (konakçı) faktörleri
2. Klinik faktörler
3. Mikrobiyolojik faktörler.

Konak faktörleri:

- 10 günden fazla devam eden $<500/\text{mm}^3$ nötrojeni
- Kortikosteroid kullanımı (3 haftadan fazla)
- İmmünsupresif ajan kullanımı (90 gün içerisinde)
- Herhangi bir immün yetmezlik hastalığı olması
- KİT uygulanması

Klinik faktörler:

- Alt solunum yolu enfeksiyonu (Radyolojik olarak, halo sign bulunan ya da bulunmayan iyi sınırlı mantarla uyumlu dens alan, air crescent bulgusu, kavite)
- Sinonazal enfeksiyon (Sinüzite ek olarak, paranasal bariyerleri aşarak orbitaya yayılım, göze vuran akut ağrı, siyah skarı bulunan ülser bulgularından birinin varlığı)
- SSS enfeksiyonu
- Dissemine Kandidiyazis

Mikrobiyolojik faktörler:

- Direkt: Sitolojik, direkt mikroskopik ya da kültür pozitifliği.
- İndirekt: GM antijen testi, BDG testi pozitifliği.

Bu faktörlerin varlığına göre hastalar 3 grup şeklinde tanımlanmıştır

1. Kesin (proven)
2. Yüksek olasılıklı (probable)
3. Düşük olasılıklı (possible)

Kesin İFİ:

Kesin invaziv fungal enfeksiyon diyebilmek için etkenin görülmesi şarttır. Buna göre doku faktörleri olarak da tanımlayabileceğimiz:

- a. Histopatolojik, sitopatolojik veya doğrudan mikroskopik inceleme ile iğne aspirasyonunda veya biyopsi örneğinde hifa oluşumuna eşlik eden doku hasarı (mikroskopik veya görüntüleme ile infiltrat ya da lezyon)
- b. Normalde steril olan, ancak klinik veya radyolojik olarak enfeksiyon ile uyumlu anormal bir bölgeden alınan kültürden küf üretilmesi (BAL, sinüs kavitesi ve idrar hariç) varsa buna kesin İFİ demek mümkündür. Kan kültürü ise *Aspergillus* için geçerli değilken, *Fusarium* için geçerlidir.

Mayalarda ise,

- a. Maya veya psödohif gösteren mukoza dışı alanların biyopsi/iğne aspirasyonu,
- b. Normalde steril olan, ancak klinik veya radyolojik olarak enfeksiyon ile uyumlu anormal bir bölgeden alınan kültürden maya üretilmesi,
- c. Uyumlu klinik bulgu ve belirti olanlarda kan kültüründen *Candida* ve diğer mayaların üretilmesi kesin İFİ tanısı için geçerlidir.

Bunlar olmadığı zaman, doğrudan (sitoloji, mikroskopi veya kültür) balgamda, BAL'da, bronş fırçalama örneğinde veya sinüs aspiratında küf örneği, yani küf mantarına işaret eden fungal yapı ya da kültür ile küf mantarı (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes* veya *Scedosporium* spp.) gösterilmesi veya dolaylı testlerle (antijen ya da hücre duvarı yapısı saptanması) plazma, serum, BAL veya BOS'ta GM ile aspergilloz tanısı, serumda BDG ile kriptokok ve zigomikoz dışı İFİ tanısı konabilir. Ancak bu testlerin hiçbiri kesin İFİ tanısı koymak için yeterli olmayıp, olası İFİ hastalarının tanımı için geçerlidir

Yüksek olasılıklı İFİ:

- En az bir konak faktörünün yanında, bir mikrobiyolojik ve bir klinik faktör varlığı.

Düşük olasılıklı İFİ:

- Bir konak faktörünün yanında, bir klinik veya mikrobiyolojik faktör varlığı (70,71).

2.10. Tanı Yöntemleri

Günümüzde nütropenik hastalarda mantar enfeksiyonları en önemli mortalite ve morbidite sebepleri arasında sayılmaktadır (1,2). Hematolojik kanser/transplant vakalarında özellikle uzun nütropeni süresi, organ hasarı ve önceden fungal enfeksiyon ve/veya kolonizasyonu öyküsü olan yüksek riskli hasta gruplarında İFİ gelişme riski %15-25'dir (3,4). Gelişen fungal enfeksiyonların %90'ından çoğunda *Candida* ve *Aspergillus* türleri etkindir (5). Nütropenik hastalarda *Candida* enfeksiyonlarında mortalite %50 (8,9) ve *Aspergillus* enfeksiyonlarında ise %100 (10,11) gibi yüksek düzeylerde seyredabilmektedir. Daha önceki çalışmalarda nütropenik hastalarda fungal enfeksiyon tedavisi ne kadar erken başlanırsa prognozun da o kadar iyi olacağı gösterilmiştir (107). Bu sebeple bu enfeksiyonların erken tanı ve tedavisi çok önem taşımaktadır.

Günümüzde İFİ'lerin erken tanısı açısından bize yardımcı olacak yeterli hassasiyet ve özgüllüğe sahip oturmuş bir tanı yöntemi henüz yoktur (12). Halen hastalardan alınan doku örneklerinde mantar hücrelerinin gösterilmesi veya bu örneklerin kültürlerinde etken mantarın üretilmesi tanıda altın standarttır. Oysa febril nütropeni grubu hastalarda, trombositopeni ve genel durum bozuklukları sebebi ile biyopsi ve derin doku örneklemeleri genelde pek mümkün olmamaktadır (12). İFİ'ler de tanı klinik bulgular, radyolojik ve laboratuvar tanısının birleştirilmesine dayanmaktadır (13,108).

2.10.1. Mikrobiyolojik tanı

Günümüzde fırsatçı mantar enfeksiyonlarının rutin tanısındaki algoritmayı konvansiyonel yöntemler ve bu yöntemlere eşlik edecek şekilde uygulanması önerilen serolojik ve moleküler yöntemler oluşturmaktadır (109).

2.10.1.1. Örnek alımı ve saklanması

Mikrobiyolojik tanı için örnek alınan bölge, kültürün duyarlılık ve özgüllüğünü belirleyen en önemli faktörlerdendir. Bununla ilgili en tipik örnek, İnvaziv Pulmoner Aspergillozlu (İPA) olgularda tanı için en başarılı örneğin balgam değil, doku örneği olmasıdır. Ancak bu olgularda uygun ve steril örneklerin alınması, çeşitli nedenlerden ötürü her zaman mümkün olmamakta, örnekteki mantar miktarının azlığı ve bilgi, deneyim eksikliği gibi faktörler de konvansiyonel yöntemlerin tanıdaki duyarlılığını düşürebilmektedir (32).

İdeal olanı, aşırı sıcak ve soğuklardan etkilendiği göz önünde bulundurularak örneklerin 2 saat içinde oda sıcaklığında saklanması ve gönderilmesidir. Örneğin mantar kültür için işleme alınması gecikecek ise Santral Sinir Sistemi (SSS) örnekleri 30°C’de, diğer örnekler +4°C’de kısa bir süre saklanabilir. GM, BDG antijenleri ile *Aspergillus* DNA’sının arandığı PCR testi için gönderilen örnekler 72 saat içinde çalışılacaksa +4°C’de, daha uzun süre saklanacaksa –20°C’de saklanmalıdır (110).

2.10.1.2. Konvansiyonel yöntemler

Günümüzde mikrobiyolojide kullanılan konvansiyonel tanı yöntemleri, invaziv fırsatçı mikozların kesin tanısındaki yerini korumaktadır. Erken tanıya yardımcı olabilecek bazı serolojik testlerin (GM, BDG) ve moleküler yöntemlerin de (PCR) rutinde konvansiyonel yöntemlere eşlik edecek şekilde uygulanması önerilmektedir (109).

Konvansiyonel yöntemler: Konvansiyonel yöntemler aşağıdaki gibi iki gruba ayrılmaktadır:

- a) Mikroskopik inceleme
- b) Kültür

Mikroskopik inceleme: Klinik örneğin direk mikroskopik incelemesi, hızlı olası ön tanı sağlaması ve özellikle daha sonra kültürde bir küf mantarı üremesi durumunda

kültür sonucunun değerlendirilmesine yardımcı olması nedeniyle değerli bir yöntemdir. Bu amaçla, çini mürekkebi, potasyum hidroksit gibi ıslak preparat hazırlama yöntemlerinin yanı sıra, Gram ve kalkoflor beyazı gibi boyama yöntemleri kullanılarak mantarlara ait çeşitli yapılar görülebilir (32).

Doku örneklerinde ise gomori metenammin gümüş boyası ile en iyi görüntüleme sağlanır. Periyodik asit schiff boyası ile septalı hifler görülebilir. Hemotoksilen eozin ile canlı doku bazofilik, ölü doku eozinofilik izlenebilir ancak güvenilir değildir (111). Ayrıca, mikroskopik incelemede tomurcuklanan hücreler ve yalancı hifler, boyalı preparatlarda ise Gram pozitif boyanan 8-10 µm boyutunda oval veya yuvarlak *Candida* hücreleri görülebilir. Preparatlarda yalancı hiflerin görülmesi *Candida*'nın doku içerisine girdiğinin, başka bir deyişle enfeksiyonun işareti olarak kabul edilir (84).

Kültür: Konvansiyonel yöntemlerin temelini oluşturan kültür ise, kesin tanı için altın standarttır. En önemli avantajları, cins ve tür düzeyinde tanımlama ve olası direnç tahmini şansı tanınması ve etken suş için antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Kültürün, özellikle küf mantarlarına bağlı gelişen enfeksiyonlarda uzun inkübasyon süresi gerektirmesi, erken tanıya yardımcı olamaması, kontaminasyon sorunu nedeniyle özgüllüğünün düşük olabilmesi en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır (32). Ayrıca İFİ'lerde kan kültürleri her zaman pozitif olmayabilir, *Candida* ve *Fusarium* enfeksiyonlarında %50, *Aspergillus* enfeksiyonlarında ise en fazla %5 civarında pozitif olabilmektedir (112). Nötropenik olmayan vakalarda solunum yolu sekresyonlarında mantar üretmenin çok fazla bir anlamı olmamakla birlikte sigara öyküsü olmayan, nötropenik vakalarda fungal üreme anlamlı kabul edilmelidir (113,114). Lösemi, kök hücre transplant alıcıları gibi ciddi immün sistem baskılanması olan riskli hastalardan alınan örneklerde görülen üremelerin %80-90'ını invaziv hastalık göstergesidir (115).

2.10.1.3. Serolojik yöntemler

Aspergillus enfeksiyonlarında, hastanın örnek verememesi nedeniyle direkt tanı yöntemleri ile tespitinin her zaman mümkün olmaması, ampirik yada profilaktik

antifungal kullanımı sonucu *Aspergillus* kültürünün negatif olması, İA'da mortalite oranlarının yüksek olması, erken tanı ve tedavi başlamanın gerekliliği, serolojik testlerin önemini ortaya çıkarmaktadır (116). *Aspergillus* antijenlerine karşı antikorların serolojik olarak gösterilmesi, bağışık engelli olmayan hastalarda görülen iki aspergilloz formu olan aspergilloma veya Alerjik Bronkopulmoner Aspergillozis'in (ABPA) tanısında faydalı olmaktadır. Her iki tabloda da mantarların dokuda üreme yetenekleri çok sınırlı olmasına karşın, organizmaya karşı güçlü bir humoral yanıt görülmektedir. ABPA'lı hastaların serum örneklerinde devamlı olarak yüksek düzeyde IgG ve IgE antikorları bulunmaktadır. Aspergillomalı hastaların serum örneklerinde de özellikle IgG1 ve IgG2 alt tipleri saptanmaktadır (56,117). Sistemik *Aspergillus* enfeksiyonlarının tanısında kullanılacak serolojik testler immündefüzyon, ELISA, Radio Immün Assay (RIA), İmmün Floresan Antikor (IFA) testidir (118). Bağışıklık sistemi sağlam konakların tersine, bağışık engelli hastalarda dokularda *A.fumigatus* üremesi ile anti-*Aspergillus* antikor titresinin artımı arasında bir korelasyon yoktur. Gerçekten, bağışık engelli kişilerde *Aspergillus* türlerine karşı antikorların varlığı, invaziv bir enfeksiyondan çok bağışık baskılayıcı tedavi öncesi oluşan antikorları göstermektedir. Antikor titresindeki artış İA'da iyileşmeye işaret ederken, antikorun olmaması veya azalan bir antikor düzeyinin gözlemlenmesi kötü prognozu düşündürmektedir. Dolayısıyla, İA'da antikor düzeyinin gösterilmesi tanısız olmayıp prognozu değerlendirmek amacıyla kullanılabilir (56).

Antijen Aramaya Yönelik Serolojik Testler

Galaktomannan: *Aspergillus*'un hücre duvarına özgü bir polisakkarittir. Yapısı α -mannoz rezidülerinden oluşan bir temel zincir ve kısa $\beta(1,5)$ -galaktofuranoz rezidülerinden meydana gelen yan zincirlerden oluşmaktadır (119). GM, İA'nın erken tanısında bir tarama testi olarak kullanılabilir (54). Food and Drug Administration (FDA) onayı ile 2003 yılında İA'nın tanısı için European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında GM bulunmaktadır. GM, klinik bulgular ortaya çıkmadan 5-8 gün öncesinden pozitifleşebilmektedir (120). Galaktomannan varlığının araştırılmasına dayalı

metodlardan biri, Platellia *Aspergillus*–Enzim Immuno Assay (PA-EIA) (Platellia *Aspergillus* BioRad, Fransa) ve diğeri de Lateks aglütinasyon (LA) (LA, Pastorex *Aspergillus*, BioRad, Fransa) testidir. Çalışma sonuçları, LA yöntemleriyle karşılaştırıldığında 1ml kandaki galaktomannanın 10 kat daha düşük konsantrasyonlarını tesbit edebilen PA-EIA yönteminin daha başarılı olduğunu göstermiştir (121). Stynen ve arkadaşlarınca geliştirilen sandviç ELISA yöntemi rat monoklonal antikoru Eb-A2’yi kullanmaktadır (Platellia *Aspergillus* BioRad, Fransa) (122). ELISA testi serolojik bir test olup işaretli katı faz yöntemlerinden biridir. Ortak mekanizma, reaktiflerden birisinin (antijen veya antikor) katı bir faza bağlanarak hareketsizleştirilmesi ve daha sonra özgül birleşmenin işaretli bir reaktif (konjugat) kullanılarak gösterilmesidir. Konjugatı işaretlemek içinde enzimler kullanılır. Yöntemin saptama sınırı, sandviç enzim immün assay ile 0,5-1 ng galaktomannan/ml serum şeklindedir. Bu test 2003 yılında FDA tarafından tanı amacıyla kullanılmak üzere onaylanmıştır. Sonuçlar Galaktomannan İndeksi (GMI) olarak belirtilir. Amerika Birleşik Devletleri’nde onaylandığı şekliyle GMI değeri 0,5 ve üzerinde ise pozitif kabul edilir. Avrupa ve diğer ülkelerde bu sınır (eşik) 0,5-1,5 arasında değişmekte olup, bu ülkelerde de son yıllarda 0,5 ve üzerindeki indeks değeri daha çok kabul görmektedir. Bu yöntemde en az %90 doğruluk elde edebilmek için riskli hastalarda testin en az haftada iki kez yapılması gerektiği bildirilmiştir (123) Serolojik tanı BAL, idrar, serum gibi sıvılarda GM aranmasına dayanır. İA için riskli olan ağır immün yetmezlikli hastalar *A.fumigatus*’a karşı yeterli antikor cevabı oluşturamazlar, bu nedenle tanıda dolaşımdaki GM antijenine karşı oluşmuş poliklonal antikorlar veya monoklonal antikorlar kullanılır. Sistemik mantar enfeksiyon varlığında bu antijenler kanda geçici süre bulunurlar ve karaciğerde kupfer hücreleri tarafından endositoz yoluyla immünkompleksler şekliyle elimine edilirler. Birbirini takip eden iki pozitif sonucun varlığı İA için doğrulayıcı olmaktadır. Bu durumda duyarlılık ve özgüllüğü yaklaşık %90’dır. Enfeksiyonların 2/3’ünde, pozitif galaktomannan sonucu klinik semptomların, radyolojik değişikliklerin veya diğer tanı yöntemlerince pozitif sonucun elde edilmesinden önce saptanır. Diğer taraftan bazı çalışmalarda, galaktomannan tesbitinde PA-EIA platellia *Aspergillus* testinin yüksek özgüllüğüne rağmen, bazı zamanlarda düşük duyarlılık göstermesinin altı çizilmektedir (121). PA- EIA platellia *Aspergillus* testi sistemik vücut sıvılarında enfeksiyon olmamasına rağmen yalancı

pozitif reaksiyon vererek (%1-18) *Aspergillus* antijeni saptayabilir. Yalancı pozitif sonuçlar özellikle intestinal bariyerlerinin bütünlüğünün tam gelişmemiş olmasından dolayı yeni doğanlar ve bebeklerde antijen ile kontamine yiyeceklerden galaktomannanın alınması ile olur. Anne sütünde ve formül mamalarda yüksek konsantrasyonda bulunan *Bifidobacterium bifidum*'un çarpaz reaksiyonu ile de yalancı pozitiflik olabilmektedir. Erişkinlerde ise kemoterapi alanlarda gastrointestinal sistemin hasarlanması sonucu diyetdeki galaktomannanın absorpsiyonunun artması ile de yalancı pozitiflik gözlenebilir. Ayrıca fungal orjinli ilaçlar, örneğin; antibiyotikler (ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit) yalancı pozitif sonuçlara yol açmaktadır. *Aspergillus* galaktomannan antijeni ile *Penicillium* spp., *Paecilomyces variotii* ve *Alternaria* türleri arasında çarpaz reaksiyon gösterilmiştir. Fakat bu mantar türleri nadir insan patojenleri olduklarından, klinikle ilgileri önemli görülmemektedir. Aynı zamanda bakteriyemili hastalar ve otoreaktif antikorları olan hastalarda da yanlış pozitif reaksiyonlar gözlenmiştir (14). GM antijen testlerinde yalancı negatif test sonuç oranı %5'in altındadır. Yalancı negatif sonuç için sebeplerden biri anti- *Aspergillus* antikorlarının yüksek titresidir. Bu antikor yüksekliği antijenin EbA 2'ye bağlanmasını engelleyerek maskeleyerek yapmaktadır. Bu yüzden serumun immün komplekslerinin inaktive edilmesi için 100°C'ye ısıtılması önemlidir. Bu olgularda testin eşik değerinin düşürülmesi yalancı negatifliği azaltmaktadır (124). Serum için FDA onayı alan bu test, BAL örneklerinde de kullanılmış ve özgüllük %87 olarak belirlenmiştir. Bu örnek grubu için onay alınmamış olmasına karşın, araştırma sonuçlarına göre, İA riskli immün süprese hastalarda bronkoskopi yapılması durumunda, BAL'da da bu testin çalışılması önerilmektedir (123).

GM antijen testinin duyarlılığı enfeksiyonun durumuna bağlıdır. İPA gibi lokalize enfeksiyonlarda, sistemik enfeksiyonlara göre dolaşan antijenlerin saptanmasında duyarlılık düşer. GM seviyelerindeki düşme iyi prognazla ilgilidir. Fakat antijenin yokluğu enfeksiyonu dışlamaz. GM varlığı antifungal tedaviye cevap ile de koreledir. Serum örneklerinin devamlılığı, antifungal tedavide kullanılan ilaçlara cevabın değerlendirilmesinde, alternatif tedavilerin gerekliliğinin belirlenmesinde faydalıdır. Nötropenik hastalarda İA taranması için araştırmacılar antijenin kandaki geçici varlığından dolayı günde bir ve haftada en az iki defa bakılmasını önerirler. Aspergilloz tedavisi altındaki hastalarda da antijenin iki haftalık aralıklarla takibi

önerilir. Pratikte aspergilloz için yüksek riskli hastaların takibinde haftada iki kez galaktomannan bakılmalıdır (123,125). Hayvan modelleri ve insanlardaki çalışmalar, GM değerlerinin *Aspergillus* fungal yükü ile korele olduğunu ve İA seyri açısından prognostik marker olarak işlev görebileceğini göstermiştir (126).

1,3-β-D-glukan (Beta Glukan): *Aspergillus*'ların hücre duvarında bulunan bir diğer komponentte (1-3)-β-D-glukan'dır. β-glukanlar doğada yaygın olarak bulunurlar. Fungal β-glukanlar hem çözünebilir hem de partiküllü formda olabilirler. Çözünebilir formdaki β-glukan, monositlerin fagositozunu inhibe edebilir. Bunu fagositler üzerinde β-glukanlar için bulunan reseptörleri bloke ederek yaparlar. Beta Glukan tanı metodu, 'horseshoe crab'dan (Kuzey Amerika Atlantik sahilindeki bir Artropod) pürifiye edilen proteolitik koagülasyon kaskadının aktivasyonuna dayalıdır. BDG'nin gösterilmesi için renk esaslı yöntem tanımlanmıştır. Bu deneyin komponentleri, özgül olarak BDG duyarlı hemolenf pıhtılaştırıcı yolu tetikleyen faktör G ve bu proteolitik kaskadın son komponenti tarafından parçalanan kromojen Leu-Gly-Arg-pNA tripeptidden oluşmaktadır. Bu deney BDG'nin pikogram düzeyinde miktarını ölçebilmekte ve sistemik fungal enfeksiyon sırasında bu polisakkaridin varlığını göstermek için kullanılabilir. Tanıda kullanılabilen tüm ticari testlerin (Fungitec-G; GlucateLL; β-glukan test Wako WAKO; β-glukan Test Maruha) duyarlılık ve özgüllükleri farklıdır. Geliştirilen bu testlerin ilki (Fungitec-G Test) Limulus faktör G'nin glukana afinitesini kullanır. Koagülasyon kaskadının Faktör-G'sini aktive edebilme yeteneği sayesinde tespit edilir. G-faktörün özellikle α subunitine bağlanır ve serin proteaz β subunitini aktive eder. Bu testte kromojenik substrattan p nitroanilidini (pNA) açığa çıkarır. Salınan pNA 450nm absorpsiyonda saptanır. Yapılan çalışmalarda *C.albicans*'ın miçelyal formunun yüksek Limulus faktör-G aktive edebilme yeteneği ve insan kanında β-glukanın gösterilmesinin derin yerleşimli mikozların erken tanısı için önemli olduğu gösterilmiştir. Testin duyarlılığı %90, özgüllüğü %84-100 arasında bulunmuştur ve 20pg/mL ve üstü düzeyde β-glukan varlığı pozitif olarak kabul edilmiştir. Fungitec-G'dekine benzer olarak GlucateLL metodu da Limulus enzimini kullanır. Bu yöntem Limulus ameobocyte lysate (LAL)'dan β-glukan için spesifik olan bakteriel endotoksin faktör-C'nin ayrıştırılması esasına dayanır. 2004 yılında FDA onayı almış GlucateLL testi için önerilen sınır değer 80 pg/ml olup, yayınlarda 60 pg/ml kabul edilmekle birlikte,

bazı çalışmalarda bu değer 120pg/ml olarak belirlenmiştir. 60 pg/ml'nin sınır değer olarak kabul edildiği çalışmalarda, örnek sayısı ile değişmekle birlikte, testin duyarlılığı %65-100, özgüllüğü ise %87-96'dır. Bu testin duyarlılığı *Candida* türleri için %83, *Aspergillus* türleri için %80, *Fusarium* türleri için ise %100 olarak belirlenmiştir. İA şüphesi olan hastalarda haftada 2 defa çalışıldığında duyarlılık ve özgüllüğün arttığı bulunmuştur. Araştırmacılar β -glukan ve galaktomannanın beraber tespitinde özgüllüğün %100'e ulaştığını bildirmektedirler. Eş zamanlı çalışıldığında her iki antijenin pozitif olması İA için değerliyken testlerden sadece birinin pozitif olması yalancı pozitiflik olarak kabul edilmelidir (127,128). Testin en önemli dezavantajı belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır. İA tanısı için EORTC/MSG tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında β -glukan antijen arama testi de bulunmaktadır (71).

Mannan ve Antimannan Testleri: Glukanlar gibi mannanlar da *C.albicans* hücre duvarının majör bileşenidir, fakat glukanların aksine, mannanlar hücre yüzeyine non-kovalent şekilde bağlanmıştır. Mannan immün modülatör özellikleri olan oldukça immünojenik bir polisakkarit antijendir. Mannan, kandidanın hücre duvarının kuru ağırlığının %30'unu oluşturur. Sistemik kandidoz için riskli hastalarda dolaşan mannan antijeni ve antimannan antikorlarının takibi tanıda önemlidir (125). Mannan ve antimannan araştırılmasının İK için yüksek riskli olguların erken tanısında özellikle kültürlerin ve histopatolojinin negatif olduğu veya örneklerin alınmadığı olgularda kullanılabileceği belirtilmiştir (129).

2.10.1.4. Moleküler yöntemler

Direkt tanı ve kültürü içeren konvansiyonel tanı yöntemleri ile mantarın üretilmesi altın standart iken kültür yöntemlerinin zaman alıcı olması, enfeksiyon bölgesinden örnek almanın zor, invaziv olması, alınan örneklerde kültür pozitifliğinin sınırlı olması, tanıda yeni yöntem arayışı ihtiyacını doğurmuştur (45).

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asit düzeyinde

saptanmasıdır. PCR yöntemi, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Duyarlılığı ve özgürlüğü yüksektir. Ancak klinik örneklerde mantar DNA ve RNA'sını ekstrakte edici standart prosedürlerin olmaması testin duyarlılığını azaltır (45). Moleküler tanıya yönelik literatürde klasik PCR, nested-PCR, Realtime PCR, RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) ve Multiplex PCR gibi yöntemlerle yapılan birçok çalışma bulunmaktadır.

Klasik PCR: Hedef organizmanın belirli bir nükleotit dizisini, primerler, dNTP'ler ve polimeraz enzimini kullanarak, denatürasyon-yapışma-sentezlenme siklusları ile çoğaltılması ve çoğaltılan nükleik asitlerin agaroz, poliakrilamid jel elektroforez ya da etidyum bromürle boyanan jelde gözlenmesini sağlayan moleküler test yöntemidir ve duyarlılığı diğer testlere göre daha düşüktür.

Nested-PCR: Yüksek duyarlılık gereken hedefler için uygulanan PCR yöntemidir. İki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada bölgeye özgü primerler kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilir. İkinci aşamada ise birinci turda çoğaltılan bölgenin içinde bir bölge hedef alınarak buraya özgü primerlerle, PCR'ın yapıldığı yöntemdir.

Rep-PCR: Bu yöntem genom içerisinde tekrar eden kodsuz DNA fragmanlarının (amplikon) çoğaltılmasına dayanır. Bu teknik bakteri veya mantarların suş seviyesinde ayrılmasını sağlar.

RT-PCR: Bu yöntem RNA hedeflerini çoğaltılması için kullanılır. Hedef RNA öncelikle revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Bundan sonraki aşamada cDNA kullanılarak normal PCR ile çoğaltma işlemi yapılır.

Multiplex PCR: Bu yöntemle iki veya daha fazla hedef bölgeye özgül primerlerin kullanılmasıyla farklı çoğaltma ürünlerin elde edildiği yöntemdir.

Real-Time PCR: Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç alınabilen PCR yöntemidir (130).

Enfeksiyonun erken safhalarında mantar DNA'sını saptamaya imkan sağlayan bir tekniktir. Moleküler tanı için BAL, kan ve doku örnekleri kullanılabilir (131).

Son yıllarda İFİ'lerin tanısında kullanılabilecek panfungal veya fungusa özgü PCR teknikleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin direkt bakı ve kültüre göre duyarlılığı daha yüksek olmasına rağmen, kolonizasyon veya subklinik enfeksiyonlarda da pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Bunun yanında geliştirilen kalitatif ve kantitatif PCR yöntemlerinin protokollerindeki farklılık, standardizasyon sorunu ortaya çıkarmaktadır. Bu yöntemlerde hedef bölge olarak mantar nükleer rRNA'sından üç gen bölgesi seçilebilmektedir. Bunlar 26S veya 28S, 18S ve 5.8S geni ile aralarındaki ITS bölgeleridir. Amplifikasyon ürünlerinin belirlenmesinde DNA probları, mikroarray, floresan in situ hibridizasyon ve pirosekanslama kullanılabilir. Bunların yanında hızlı amplifikasyon ve kantitatif değerlendirme sağlayan gerçek zamanlı PCR da uygulamaya girmiştir. Önemli olarak, gerçek zamanlı PCR teknolojileri, fırsatçı mantarların genus ve türlere özgül olarak tanımlanması için spesifik DNA sekanslarının amplifikasyonu sonrasında hızlı ve etkili bir yöntem sunmaktadır (örneğin 18S ribozomal alt ünitelerin ITS1 bölgeleri). Ayrıca kontaminasyona daha az yatkın olan gerçek zamanlı PCR protokolleri, DNA ekstraksiyonu için otomatik sistemlerle birlikte mevcut PCR testlerinin güvenilirliğinin standardizasyonuna ve gelişmesine yönelik önemli bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır. Gerçek zamanlı PCR dolaşımdaki fungal DNA miktarının saptanmasına olanak sağlaması nedeniyle, antifungal ilaçlarla tedavinin izlemi sırasında fungal yükün indirekt bir parametresi olarak da kullanılabilir (132-134). Gerçek zamanlı PCR, PCR amplifikasyonunu görünür hale getirme olanağı sağlayan floresan işaretli proplar veya şelat edici boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olduğu anında izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir. Gerçek zamanlı PCR hata olasılığını azaltır, kantitatif sonuç verir, pozitif/negatif sorusunu hızla yanıtlar. Reaksiyonun optimizasyonu daha kolaydır, jel hazırlama, jele yükleme gibi basamakları ortadan kaldırır. Belirleme yöntemi olarak özel boyalarla işaretli propların kullanıldığı Taqman®, moleküler beacons, FRET®, Scorpions®, Amplifluor™ gibi yöntemler ya da SYBR Green®, etidyum bromür gibi özgül olmayan şelat edici boyaların kullanıldığı yöntemler mevcuttur (135).

Moleküler tanıda hem yalancı pozitifliklere hem de yalancı negatifliklere rastlanılmaktadır. Konidiyumların solunum havasında yoğun olarak bulunmasından

dolayı yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilir. Geçekten de sağlıklı kişilerden elde edilen BAL örneklerinin %25 kadarı PCR ile pozitif çıkabilmektedir (56). Kan örneklerinin steril koşullarda hava geçirmeyen tüplere alınması gerekmektedir. Ancak laboratuvar ortamında amplikonlara bağlı kontaminasyonlarda gelişebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı DNA eldesi sırasında negatif kontrolle çalışılması otomatik ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması ve amplifikasyon için gerçek zamanlı PCR yönteminin tercih edilmesi önerilmektedir (136). Yalancı negatiflikler, *Aspergillus* DNA'sının beş dakikadan daha az olan yarı ömrü, DNA'nın geçici olarak kanda bulunması, antifungal profilaksi nedeni ile fungal yükün azalması, ekstraksiyonun etkinliği, amplifikasyonun başarısızlığı gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca sonuçların yorumlanması da çok önemli olmaktadır (137).

2.11. Antifungaller

Yirminci yüzyılın başında mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek uygun antifungaller bulunmamaktaydı. 1951 yılında bulunan polien bir antibiyotik olan nistatin oral ve topikal, 1956'da bulunan diğer bir polien antibiyotik olan AmB sistemik tedavide kullanılmaya başlanmıştır. 1957'de sitostatik madde olarak sentezlenen flusitozin tek başına kullanıldığında direnç gelişimine sebep olduğundan, AmB ile birlikte kullanılmaya başlandı. 1958'de griseofulvin yüzeysel mikozların oral tedavisinde etkili bulundu. 1960'lı yıllardan itibaren antifungal etkili azol türevleri, sırasıyla benzimidazol, klotrimazol, mikonazol, ekonazol, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazol kullanıma girdi. Son yıllarda yeni geliştirilen antifungaller iki grup içinde yer almıştır. Bunlar, azol bileşikleri olan vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol, isovukonazol ve ekinokandinler içinde yer alan kaspofungin, mikafungin ve anidulafungindir (138).

Antifungal ilaçlar toksik etkilerini, mantar hücresinin zarına, duvarına, sitoplazmasına, mikrotübüler proteinlerine bağlanarak gösterirler. Bu etki "fungostatik" (üremeyi durdurucu) veya "fungisit" (öldürücü) olabilir. Azoller lanosterolün ergosterole dönüşümünde gerekli enzim olan sitokrom P-450 enzimine bağımlı C-14 alfa demetilaz enzimini inhibe ederek etkisini gösterir. Ergosterol fungal plazma

membranında bulunan başlıca steroldür. Başta hücre zarının akışkanlığı, bütünlüğü, kitin sentezi gibi zarda bulunan enzimlerin fonksiyonunun düzenlenmesi gibi hücresel olaylarda önemlidir. Bir nükleozit analogu olan flusitozin dışındaki antifungal ilaçlar, ya AmB gibi hücre zarındaki ergosterole bağlanarak veya azoller gibi ergosterol biyosentezinin çeşitli basamaklarını inhibe ederek etkilerini gösterirler.

Antifungal ilaçları etki mekanizmalarına göre kısaca özetlersek;

1. Antifungal antibiyotikler:

a) Polienler: Bu grup antifungaller mantar hücresinin sterol halkasına bağlanıp, membran özelliğini bozarlar.

- Amfoterosin B
- Nistatin

b) Griseofulvin: Duyarlı fungus hücrelerinde mikrotübül proteinine bağlanarak mitozu inhibe etmek suretiyle fungistatik etki yapar. Dermatofit mantarların yaptığı yüzeysel enfeksiyonlara karşı etkilidir (139).

2. Azoller: Tüm azol bileşikleri, lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek antifungal etki gösterir. Bu enzim, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzimdir. Ergosterol sentezinin inhibisyonu mantar hücre membran sentezinin sonlanmasıyla sonuçlanır.

- Flukonazol
- İtrakonazol
- Vorikonazol
- Posakonazol
- Ravukonazol
- Ketokonazol

3. Primidinler (Nükleozit Analogu): Nükleik asit sentezini inhibe ederler. Bunlar primidin metabolizmasını bozar ve böylece mantar hücreindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir.

- 5-Flusitozin

4. Ekinokandinler: Geniş etki spektrumuna sahip lipopeptit yapısındaki bileşiklerdir. Ekinokandinler glukan sentezini inhibe ederek mantarın hücre duvarı sentezini inhibe ederler.

- Caspofungin

- Anidulafungin
- Mikafungin

5. Alilamin türevleri: Skualen epoksidazı selektif bir şekilde inhibe ederek ergosterol sentezini erken bir basamakta bloke ederler. Ayrıca, bu inhibisyon sonucu hücre içinde aşırı miktarda toplanan skualen aracılığıyla fungus hücre membranı fonksiyonunu ve hücre duvarı sentezini bozarlar.

- Terbinafin
- Naftifin (139)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar ve Örnekler

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar'larında yapıldı. Bu çalışmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 13.03.3012/129 sayılı kararı ile etik kurul onayı alındı.

Çalışmamıza Nisan 2012-Temmuz 2013 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dahiliye Hematoloji Kliniğinde Febril Nötropeni tanısıyla takip edilen 101 hasta dahil edildi. Hastalarımızın 64'ü (%63.4) kadın, 37'si (%36.6) erkek, yaş ortalamaları 44.6 ± 16.828 idi. Hastalar hematolojik malignitesi olan, kemoterapötik ilaç kullanan, nötrofil sayısı $\leq 500/\text{mm}^3$ olup aynı zamanda ölçülen oral ve/veya axiller ateşleri $\geq 38.3^\circ\text{C}$ olan erişkinlerden oluşmaktaydı. Bu hastaların 49'u (%48.5) Akut Miyelositik lösemi (AML), 13'ü (%12.9) Akut Lenfositik Lösemi (ALL), 10'u (%9.9) Multipl Myelom (MM), 8'i (%7.9) Non Hodgkin Lenfoma (NHL), 3'ü (%3) Miyelodisplastik Sendrom (MDS), 3'ü (%3) Santral Sinir Sistemi (SSS) Lenfoması, 3'ü (%3) Aplastik anemi, 3'ü (%3) Mantle Cell Lenfoma, 2'si (%2) Foliküler Lenfoma, 2'si (%2) Periferik T Cell Lenfoma, 1'i (%1) Anaplastik Large Cell Lenfoma, 1'i (%1) Hodgkin Lenfoma, 1'i (%1) Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), 1'i (%1) Anjioimmunoblastik Lenfoma, 1'i (%1) Burkitt Lenfoma hastasıydı. Febril nötropeni tanısıyla takip edilen 101 hastanın 42'sine (%41.6) KİT yapılmış, 59'una (%58.4) KİT yapılmamıştı. KİT yapılan hastalardan 20'sine (%47.62) Allojenik kemik iliği transplantasyonu (AKİT), 21'ine (%50) Otolog kemik iliği transplantasyonu (OKİT), 1'ine (%2.38) ise AKİT+OKİT uygulanmıştı. Bu hastaların en az bir, en fazla beş atakları İFİ açısından takip edildi. Birinci atakta 101 hasta'dan, ikinci atakta 61 hasta'dan, üçüncü atakta 29 hasta'dan, dördüncü atakta 7 hasta'dan ve beşinci atakta 1 hasta'dan laboratuvarımıza gönderilen örnekler değerlendirildi.

Hastalardan GM antijen testi, *A.fumigatus* PCR ve *C.albicans* PCR testleri çalışmak için 199 atak, kan kültürü için 194 atak, idrar kültürü için 61 atak, balgam kültürü için 34 atak, katater kültürü için 12 atak, TRA için iki atak, BAL, boğaz sürüntüsü, yara, beyin biyopsi materyali ve plevra materyali kültürü için birer ataklarında laboratuvarımıza gönderilen klinik örnekleri çalışma kapsamına alındı. Kültür amacıyla gönderilen klinik örnek sayıları 443 kan, 229 idrar, 40 balgam, 20 kateter, iki trakeal aspirat (TRA), bir BAL, bir boğaz sürüntüsü, bir yara sürüntüsü, bir beyin biyopsi materyali ve bir plevra örneğinden oluştu. Solunum yolu örnekleri ve yara sürüntü örneklerine direkt mikroskopik değerlendirme ve kültür, gönderilen diğer klinik örneklere ise kültür yapıldı. Bu hastaların her bir atağında, bir hafta içinde ardışık iki kere gönderilen 813 serum örneğinde ELİSA yöntemi ile GM antijeni ve 818 plazma örneğinde *A.fumigatus*, 749 plazma örneğinde *C.albicans* DNA'sı real- time PCR yöntemi ile araştırıldı. Çalışmaya alınan hastalar EORTC kriterlerine göre gruplandırıldı (71).

3.2. Örneklerin Mikolojik İncelenmesi

3.2.1. Direkt mikroskopik inceleme

Hastalardan gönderilen solunum yolu örnekleri, yara sürüntü örneği ve beyin biyopsi örneği'ne direkt mikroskopik inceleme yapıldı. Örnekler %10'luk KOH ile muamele edilip lam lamel arasında ışık mikroskopunda x20-40'lık objektifle incelenerek mantar elamanları araştırıldı.

3.2.2. Kültür

Hastalardan gönderilen kan kültürü dışındaki klinik örnekler %5 koyun kanlı agar (bioMerieux, Fransa) ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar (bioMerieux, Fransa) ve iki adet SDA (bioMerieux, Fransa) besiyerine ekildi. Kanlı agar ve EMB besiyerleri 24-48 saat, SDA besiyerinden biri 37°C'de diğeri de 25°C'lik etüvlerde 3 hafta inkübe edildi. Haftada 3 defa üreme olup olmadığı değerlendirildi. İdrar kültürlerindeki

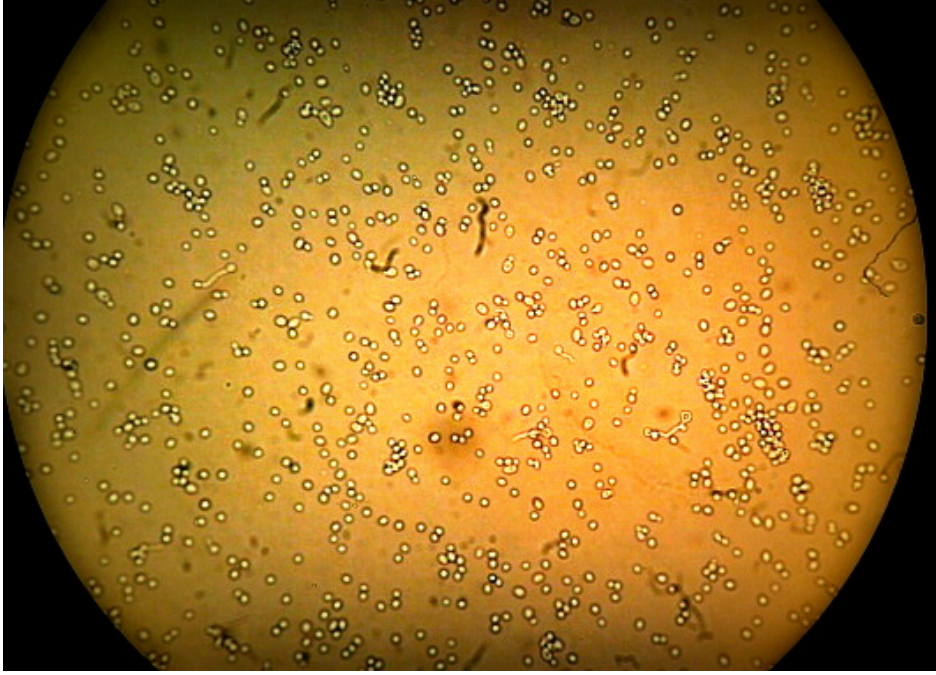
üremelerde, 10^4 CFU/ml anlamlı kabul edilerek (105,106), idrar ve diğer kültürler de üreyen kolonilere Gram boyama yapıldı. Gram (+) boyanan krem-sarı renkli, hamurumsu-mukoid yapıda, kendine özgü maya kokusu veren koloniler, germ tüp (çimlenme borusu) testi, Mısır unu-Tween 80 agar besiyerinde mikroskopik görünüm açısından araştırıldı. Bu kolonilerin aynı zamanda Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonları yapıldı. Bu çalışmada kalite kontrol için *C.albicans* ATCC 14053 ve *C.lusitaniae* ATCC 34449 suşları kullanıldı.

Kan Kültürü: BacTAlert (bioMerieux, Fransa) otomatize kan kültürü sisteminde üreme gösteren kan kültürü şişelerinden, %5 koyun kanlı agar (bioMerieux, Fransa) ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar (bioMerieux) besiyerlerine yapılan ekimler etüvde 24-48 saat inkübe edildi. Gram boyasında, Gram (+) boyanan maya hücreleri saptanan kültürlerden SDA besiyerine pasaj yapıldı. İnkübasyon sonunda krem-sarı renkli, hamurumsu-mukoid yapıdaki, kendine özgü maya kokusu veren kolonilerin konvansiyonel ve otomatize sistemle identifikasyonu yapıldı.

3.2.3. İdentifikasyonu

3.2.3.1. Germ tüp (çimlenme borusu) testi

Test edilecek olan maya kolonisinden öze ile bir miktar alınarak 0.5 ml insan serumu içerisinde süspansiyon yapıldı. 37°C 'de maksimum 3 saat inkübe edildikten sonra süspansiyonundan bir damla alınarak lam-lamel arasında ışık mikroskopunda $\times 40$ 'lık büyütmede incelendi. Maya hücrelerinden çıkan, maya hücresinin yarısı kadar genişlikte, 3-4 katı uzunlukta olan, başlangıç noktasında boğumlanma olmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık göstermeyen filament şeklindeki uzantılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp oluşturan maya suşları *C.albicans* olarak tanımlandı.



Resim 1. *C.albicans* germ tüp görüntüsü ( alışmamızdan)

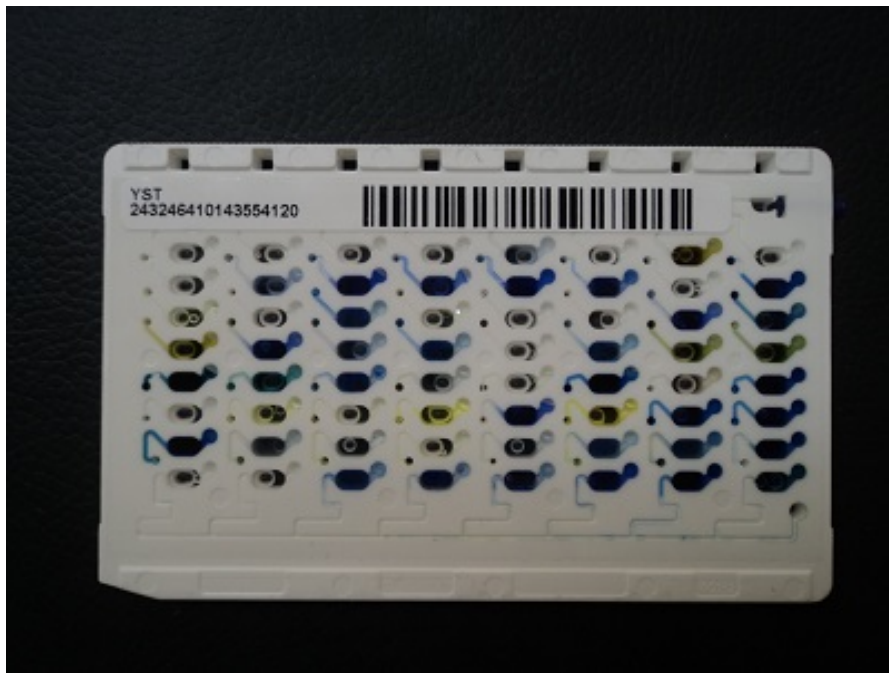
3.2.3.2. Mısır unu-Tween 80 agar besiyerinde mikroskobik görünümün incelenmesi

Mısır unu-Twen 80 agara Dalmau tekniğine uygun olarak ekim yapıldı. Bunun için saf maya kolonilerinden iğne uçlu  ze ile bir miktar alınarak birbirine paralel olarak dört çizgi şeklinde, besiyerini yırtmadan ve özeyi dibe kadar batırmadan ekim yapıldı. Ekim çizgilerinin üzerine lamel kapatılarak 26 C'de 72 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda ekimler ışık mikroskobunda 10x ve 40x objektif ile incelendi.

3.2.3.3. Otomatize identifikasyon yöntemi

Suşların biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonu için Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi kullanıldı. Inkübasyon sonunda krem-sarı renkli, hamurumsu-mukoid yapıdaki, Gram (+) maya hücreleri saptanan kültürlerden, 2 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar YST kartlarına önerilen şekilde dağıtıldı ve cihaza yerleştirildi. Vitek 2 sistemi tam otomatik bir identifikasyon sistemidir. Aynı zamanda mikrodilüsyon prensibine göre antibiyotik

duyarlılık testleride yapılabilmektedir. Boyu 5.5 cm, eni 9 cm boyutlarında, üzerinde 64 adet kuyucuk ve her kuyuda, liyofilize yapıda, bir metabolit veya farklı konsatrasyonlarda antibiyotik içeren özel plastik kartlar şeklindedir (Resim 2). Bakteri inokulumunun vakum prensibine dayalı bir dağıtıcı ile dağıtılmasının ardından, herbir kuyucuk mikrolitre boyutunda doldurulmuş olur. Bu kartlarda barkodlama sistemi ile seviyelendirilmiş ve cihaza girmeden önce kartları alıp tanımlayan “smart taşıyıcı” bilgisayar çipi kullanmaktadır. Kartlar dolum yerinden okuyucu inkübatöre taşınır ve testin sonunda otomatik olarak bir kutuya atılmaktadır.



Resim 2. Vitek 2 YST İdentifikasyon Paneli

Vitek YST identifikasyon kartı

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1) L-Malate asimilasyonu | 24) L-Sorbose asimilasyonu |
| 2) L-Lysine Arylamidase | 25) L-Rhamnose asimilasyonu |
| 3) Leucine Arylamidase | 26) Xylitol asimilasyonu |
| 4) Arginine GP | 27) D-Sorbitol |
| 5) Erythritol asimilasyonu | 28) Saccharose/Sucroseasimilasyonu |
| 6) Glycerol asimilasyonu | 29) Urease |
| 7) Tyrosine Arylamidase | 30) Alpha-Glucosidase |
| 8) Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase | 31) D-turanose asimilasyonu |
| 9) Arbutine asimilasyonu | 32) D-Trehalose asimilasyonu |

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 10) Amygdaline asimilasyonu | 33) Nitrate asimilasyonu |
| 11) D-Galactose asimilasyonu | 34) L-arabinose asimilasyonu |
| 12) Gentiobiose asimilasyonu | 35) D-Galacturonate asimilasyonu |
| 13) D-Glucose asimilasyonu | 36) Esculin hydrolyse |
| 14) Lactose asimilasyonu | 37) L-Glutamate asimilasyonu |
| 15) Methyl-A-D-Glucopyranoside asimilasyonu | 38) D-Xylose asimilasyonu |
| 16) D-Cellobiose asimilasyonu | 39) DL-Lactate asimilasyonu |
| 17) Gamme-Glutamyl-transferase | 40) Acetat asimilasyonu |
| 18) D-Maltose asimilasyonu | 41) Citrate asimilasyonu |
| 19) D-Raffinose asimilasyonu | 42) Glucuronate asimilasyonu |
| 20) PNP -N-Acetyl-Galactosaminidase 1 | 43) L-Proline asimilasyonu |
| 21) D-Mannose asimilasyonu | 44) L-Keto-D-Gluconate asimilasyonu |
| 22) D-Melibiose asimilasyonu | 45) N-acetyl-Glucosamine asimilasyonu |
| 23) D- Melezitose asimilasyonu | 46) D-Gluconate asimilasyonu |

3.3. Serolojik Testler

Serolojik test olarak ELİSA yöntemi ile 101 febril nötropeni hastasının 199 atağı boyunca toplam 813 serumda GM antijeni araştırıldı.

3.3.1. Galaktomannan antijen arama

3.3.1.1. Testin prensibi

Platelia Aspergillus (*Platelia Aspergillus*, BioRad, Fransa) kiti serumda GM'ı saptayabilen enzim bağlı katı faz yöntemidir. Testte tavşan monoklonal antikorları ELISA çukurlarında kaplanmış olarak ve peroksidazla işaretlenmiş olarak bulunur.

3.3.1.2. Yöntem

ELISA çukurcukları aliminyum folyo kaplı paketinden çıkarıldı ve oda ısısında 15-20 dakika bekletildi.

1. Yıkama solüsyonu (Tris NaCl pH 7.4 buffer,%1 Tween 20 ve %0.01 sodyum metiolat) distile su ile 10 kat sulandırıldı.
2. Kontrol serumları (pozitif, negatif ve eşik serumu) 1 ml steril su ile sulandırılıp iyice karıştırıldı.
3. Konjugat (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikoları) %0.01 meiolat içerir ve kullanılmaya hazır.
4. Serum işleme solüsyonu (EDTA asid solusyonu) kullanılmaya hazır.
5. Substrat buffer (sitrik asit, sodyum asetat, pH 5.2 %0.009 hidrojen peroksid ve %4 dimetilsülfoksit) kullanılmaya hazır.
6. Kromojen solüsyonu tetrametilbenzidin içerir ve subsrat buffer ile 50 kat seyreltilir.
7. Reaksiyonu durdurma solüsyonu 1.5 N sülfirik asit içerir ve kullanılmaya hazır.
8. Steril eppendorf tüpüne 300 µl serum ve 100 µl serum işleme solüsyonu (%4 EDTA) konuldu.
9. İyice karıştırılıp ependroflarda ısı bloğunda 120°C'de 6 dakika bekletildi.
10. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve üstteki sıvı bölüm çalışıldı.
11. Aynı işlemler kontrol serumları için de yapıldı.
12. ELISA çukurlarında birinci çukur pozitif, ikinci çukur negatif, üç ve dördüncü çukur eşik değer kontrol çukuru olarak kullanıldı.
13. Serumların üstteki sıvı bölümünden 50µl ve konjugattan 50µl çukurlara konuldu.
14. Aynı şekilde kontrol çukurlarına da 50µl kontrol serumları ve konjugat konuldu.
15. ELISA plağının üzeri yapışkan film ile kaplandı.
16. 37°C'lik etüvde 90 dakika bekletildi. ELISA plağından yapıştırıcı film çıkarılıp yıkama solüsyonu ve otomatik yıkama ile beş kez yıkandı.
17. ELISA plağında yıkama solüsyonunun kalmamasına dikkat edildi.

18. Hızlı bir şekilde ve direkt ışıktan korunarak daha önce karışımı yapılan substrat kromojen (tetramethylbenzidin) solüsyonundan 200 µl eklendi.
19. Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletildi.
20. Her çukura eşit zamanlı olarak 100 µl reaksiyon durdurma solüsyonundan (1.5 N sülfürik asid) eklendi.
21. Son olarak da 450 nm (referans aralığı 620 nm) dalga boyunda optik okuyucuda sonuçlar okundu.

3.3.1.3. Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

- a) İndeks değeri eşik kontrol serumunun optik dansitesi olarak belirlendi.
- b) Her serum için indeks hesaplandı:

$$\text{İndeks} = \frac{\text{Örneklerin optik dansitesi}}{\text{Esik serumun optik dansitesi}}$$

İndeks: <0.5: negatif

≥0.5 ve pozitif indeks olarak değerlendirildi

- c) Testi geçerli saymak için aşağıdaki sonuçların gerçekleşip gerçekleşmediğine bakıldı

İndeks kontrol (OD): Her kontrol serumun cut off değeri

OD kontrol eşik serum 0.3 -0.8 arasında

$$\text{Pozitif İndeks} = \frac{\text{OD pozitif kontrol}}{\text{OD esik kontrol serumu}} >1.50$$

$$\text{Negatif İndeks} = \frac{\text{OD negatif kontrol}}{\text{OD esik kontrol serumu}} <0.4 \text{ olması gerekiyordu.}$$

- d) Çalışmamızda, GM ≥1 pozitif indeks kabul edilerek de sonuçlar hesaplandı ve istatistiksel değerlendirmelerde kullanıldı.

3.4. Moleküler Yöntemler

Hastalardan 199 atak boyunca gönderilen 818 plazma örneğinde *A.fumigatus* 'un, 749 plazma örneğinde *C.albicans* 'ın nükleik asit izolasyonu için MagNA Pure L.C

(Roche, ABD) kiti kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. İzole edilen DNA'lardan *A.fumigatus* ve *C.albicans* saptamak için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (Real Time PCR) ile Light Cycler 2.0 cihazında LightMix Kit (Roche, ABD) kullanılarak araştırıldı.

3.4.1. İzolasyon kit içeriği

İzolasyon kit içeriği Tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4. İzolasyon kit içeriği

Reaktifler	İçerik/Fonksiyon
Wash Buffer I	Her biri 100 ml'lik 2 şişe PCR inhibitörlerini uzaklaştırma
Wash Buffer II	Her biri 60 ml'lik 2 şişe Tuz, protein ve benzerlerini uzaklaştırma
Lysis/Binding Buffer	100 ml'lik 1 şişe Hücre lizisi ve DNA'nın bağlanması
Proteinaz K	6 cam flakon, liyofilize Proteinlerin sindirilmesi
Magnetik Cam Partiküller (MGPs) Süspansiyonu	6 cam flakon, MGP süspansiyonu DNA'nın bağlanması
Elution Süspansiyonu	100 ml'lik 1 şişe DNA Elüsyonu Proteinaz K'nın yeniden sulandırılması Elüsyon dilüsyonu

3.4.2. Test prensibi

İzolasyon prosedürü manyetik mikropartikül teknolojisine dayanmaktadır. Numuneler kaotropik tuz ve Proteinaz K içeren özel bir tamponla inkübe edilerek parçalanır. Manyetik Cam Partiküller (MGP'ler) eklenir ve DNA bunların yüzeyine bağlanır. Bağlanmayan maddeler çeşitli yıkama adımlarıyla uzaklaştırılır ardından saflaştırılan DNA düşük tuz tamponuyla elüsyona tabi tutulur. MagNA Pure LC DNA izolasyon prosedürünün temel adımları şunlardır:

- 1) Numune, Numune Kartuşunun kuyucuklarına yerleştirilir.

- 2) Lizis/Bağlanma Tamponu numuneye eklenir böylece tam hücre lizisi ve nükleik asitlerin salınması gerçekleşir. Nükleazlar denatüre olur.
- 3) Numunelere Proteinaz K eklenir ve proteinler sindirilir.
- 4) Kaotropik tuz şartları, izopropanol ve yüksek iyonik güçler sayesinde DNA, manyetik cam partiküllerin (MGP) silika yüzeyine bağlanır,
- 5) DNA bağlanmış MGP'ler manyetik olarak artık parçalanmış numuneden ayrılır
- 6) DNA bağlanmış MGP'ler bağlanmamış maddeleri uzaklaştırmak, örneğin proteinler (nükleazlar), hücre membranları ve heparin veya hemoglobin gibi PCR inhibitörleri ve kaotropik tuz konsantrasyonunu azaltmak için yıkama tamponuyla tekrar tekrar yıkanır
- 7) DNA bağlanmış MGP'ler manyetik olarak artık numune debrisini içeren yıkama tamponundan ayrılır
- 8) Saflaştırılmış DNA Elüsyon Kartuşunun kuyucuklarında MGP'lerden elüe edilir, MGP'ler Reaksiyon sonunda tutulur ve atılır.

3.4.3. Proteinaz K'nın hazırlanması

Her bir Proteinaz K flakonu önce 3.0 ml Elüsyon tamponu ekleyerek sulandırıldı. Flakonu kapatıp liyofilizati tamamen çözmek için vorteks ile iyice karıştırıldı. Tamamen çözüldükten sonra, 5.0 ml final konsantrasyonuna ulaşmak için ilave olarak 2,0 ml Elüsyon Tamponu ekleyip tekrar vorteks ile karıştırıldı.

3.4.4. Testin uygulanışı

Örnekler çalışmadan önce 15-25°C oda sıcaklığına getirildi. 300 µl MPLC Lysis binding buffer alınıp Sample Cartridge içine pipetleme yapıldı. Üzerine 200 µl numune ilave edildi. MPLC cihazı kullanılarak test prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Elde edilen DNA ekstraktı Light Cycler 2.0 cihazında LightMix Kiti (Roche, ABD) kullanılarak hedef bölge çoğaltıldı.

3.4.5. DNA amplifikasyonu

Hastaların plazma örneklerinde DNA belirlenmesi için real-time PCR uygulandı

3.4.5.1. LightMix kit

LightMix Kit, bir nükleik asit ekstaksiyonunda fungal DNA varlığını gösteren fungal 18s RNA bölgesini tespit eder. *C.albicans* genomunun 490 bp ve *A.fumigatus* genomunun 504 bp'lik uzun parçası primerlerle amplifiye edildi ve LightCycler Red 640 ile etiketlenmiş spesifik problarla tespit edildi.

3.4.5.2. Kit içeriği

LightMix Kit, *C.albicans* ve *A.fumigatus*'un her bir 32 PCR reaksiyonu için önceden karıştırılmış liyofilize edilmiş primer ve probları içermektedir. Kit ayrıca 10^5 hedefe denk *C.albicans* ve *A.fumigatus* kontrol DNA'sı da içermektedir. Bu reaktiflerle LightCycler 1.x/2.0 Cihazı ile LightCycler FastStart DNA Master HybProbe kullanılarak 10 *C.albicans* ve *A.fumigatus* DNA kopyası tespit edildi. LightMix Kit kullanılarak yapılan amplifikasyon işlemlerinin tamamı, *A.fumigatus* ve *C.albicans* için ayrı ayrı spesifik primer ve problar kullanılarak yapıldı. Aşağıda *A.fumigatus* için çalışma prensibi anlatıldı. Tüm prosedür *C.albicans* PCR çalışması içinde aynı şekilde uygulandı, bu nedenle tekrar anlatılmadı.

3.4.5.3. Light Cycler *A.fumigatus* çalışma MMX'inin ve kapillerlerin hazırlanması

- 1) İzolasyonu yapılan numune sayısı + Negatif kontrol + Pozitif Kontrol ile birlikte gerekli mix sayısı hesaplandı. Gerekli mix miktarı pipetlerin durumuna göre +1 veya +2 eklenek hesaplandı.

- 2) Total sayıya yetecek miktar için gerekli *Aspergillus* ve *Candida* miksi ayrı bir ependorf tüpte ayarlandı.
- 3) Uygun sayıda Light Cycler Kapilleri Carousel Centrifuge Adapter'üne (2-8°C'de duran Cooling Blok) yerleştirildi.
- 4) Hazırlanan çalışma mastermix'inden 15 µl uygun Light Cycler kapillerlerine yüklendi.
- 5) Uygun kapillerlere 5µl önceden hazırladığımız ekstraktlardan ilave edildi. Her bir ilave sonrası kapillerlerin kapakları kapatıldı.
- 6) Kapillerler 500–1000 rpm'de 5-10 saniye santrifüj edildikten sonra mix ve ekstraktın dibine çökmesi sağlandı.
- 7) Light Cycler cihazına yükleme yapıldı.

3.4.5.4. M Mix

- 1) 1a solüsyon: Lightcycler Fast Start Enzyme
- 2) 1b solüsyon: Lightcycler Fast Start Reaction Mix + Hyb Probe (Fast Start Taq DNA Polimeraz, Reaction Buffer dNTP mix ile dUTP ya da dTTP, 10mM MgCl₂)
- 3) 25 M MgCl₂
- 4) dH₂O

3.4.5.5. Testte kullanılan solüsyonların hazırlanışı

1. 1b solüsyonda 60 µl alınıp 1a içinde karıştırılarak Mix M hazırlandı.
2. Primer-prob içine 66 µl, standartlara 40 µl PCR-grade su eklendi ve hazırlandı.

3.4.5.6. DNA amplifikasyon karışımı

2µLM mix:
2µLprobe-primer karışım
1.6 µL25 mM MgCl ₂
9.4 µLdH ₂ O

Her hasta için toplam 15 µL hazırlanan mix üzerine 5 µL DNA izolatları eklendi

3.4.5.7. Testin uygulanması

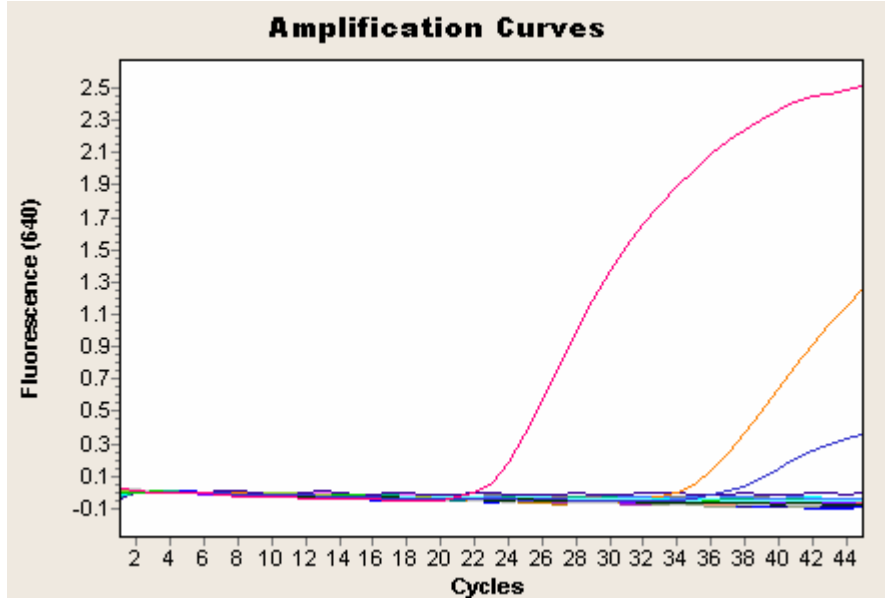
Amplifikasyon için kullanılacak M mix için Lightcycler Fast Start Reaction Mixt Hyb Probe'dan 60 µL alıp 1 Lightcycler Fast Start Enzyme içine konup karıştırıldı. Hazırlanan M mix üzerine MgCl₂, Primer-prob karışımı ve distile su çalışmada hasta sayısına uygun miktarlarda eklenerek PCR amplifikasyon karışımı hazırlandı. Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve kapillere 15 µL dağıtıldı. Standartlar, negatif kontrol, pozitif kontrol ve hasta örneklerinden elde edilmiş DNA izolatlarından 5'er µL kapillere dağıtıldı. LightCycler 1.x/2.0 (Roche) PCR cihazına yerleştirildi. Örneklerdeki nükleik asit 'light cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Nükleik asitlerin light Cycluser cihazındaki siklusları

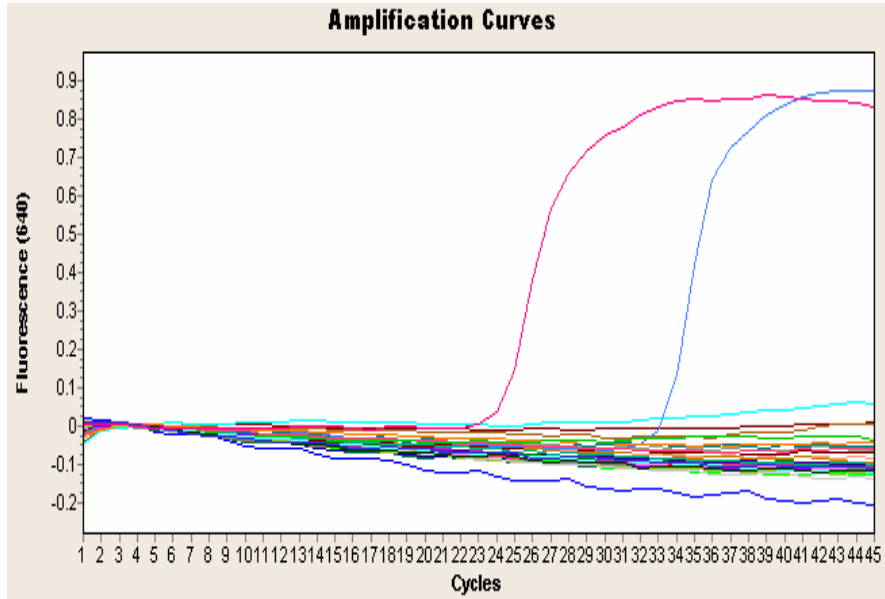
Denatürasyon	1 siklus	95°C'de 10.00 dakika
Amplifikasyon	45 siklus	95°C'de 5 saniye
		62°C'de 15 saniye
		72°C'de 25 saniye
Melting	1 siklus	95°C'de 20 saniye
		40°C'de 20 saniye
		85°C'de 00 saniye
Cooling	1 siklus	40°C'de 30 saniye

Oluşan floresan eğrileri LightCycler software version 4.1 ile değerlendirildi. Kalite kontrol için; kit içeriğindeki pozitif kontrol kullanılırken, negatif kontrol için su

kullanıldı. LightCycler 1.x/2.0 cihazı ile 60 dakika içerisinde (45 döngü ve erime eğrisi) elde edildi.



Şekil 2. *A. fumigatus* PCR pozitif hastamızın yer aldığı çalışmada amplifikasyon eğrisi



Şekil 3. *C. albicans* pozitif bulunan hastamızın yer aldığı çalışmada amplifikasyon eğrisi

3.5. Histopatolojik İnceleme

Hastalara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları hasta dosyalarından elde edildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Kategorik değişkenler arasındaki ilişki ki-kare analizi ile test edildi. Altın standart ile karşılaştırılan yöntemler için spesifite değerleri ve %95 güven aralıkları hesaplandı. Ayrıca yöntemler arasındaki uyuma KAPPA istatistiği ile bakıldı. Tanıtıcı istatistik olarak frekans, yüzde ve ortalama \pm std.sapma değerleri verildi. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 11,5 paket programı kullanıldı ve $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çalışmamızda yaptığımız istatistiksel değerlendirmelerde hasta ve örnek sayısı kullanılmadan hastaların nötropenik atak sayıları esas alınarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Dahiliye Hematoloji Kliniği'nde Febril Nötropeni tanısıyla takip edilen 101 hastanın 199 atağı araştırıldı. Bu ataklardan 11'i (%5.5) EORTC sınıflandırmasına göre kesin İFİ olarak tanımlandı. Kesin İFİ olarak tanımlanan ataklardan üçünde (%1.5) hastaların beyin biyopsi materyalinde histopatolojik olarak hifal elemanlar tesbit edilerek kesin İA, sekiz atakta (%4) ise kandidemi tespit edildi. Takip edilen 199 atağın sekizi (%4) yüksek olasılıklı İA, sekizi (%4) düşük olasılıklı İA olarak tanımlanırken, bu sınıflandırmanın dışında kalan 172 (%86.5) atak ise İFİ açısından riskli bulunmadı.

4.1. Direkt Mikroskopi ve Kültür Sonuçları

Laboratuvarımıza gönderilen, 40 balgam, iki TRA, bir BAL, bir boğaz sürüntüsü, bir yara sürüntüsü, bir plevra ve bir beyin biyopsi örneğinde direkt mikroskopi ile mantar elemanları arandı. Ancak direkt mikroskopi yapılan klinik örneklerde mantar elemanlarına rastlanmadı.

Çalışmamızda takip edilen 101 hastanın 194 febril nötropeni atağında toplam 443 kan kültürü laboratuvarımıza gönderildi. Toplam 194 ataktan 124'ünde (%63.9) kan kültüründe üreme olmazken, 62'sinde (%32) bakteriyel etkenler, yedisinde (%3.6) çeşitli *Candida* türleri üredi. Üreyen *Candida* türlerinin dördü *C.glabrata*, biri *C.parapsilosis*, biri *C.albicans*, biri de *C.tropicalis* olarak identifiye edildi. Hastaların bir (%0.5) atağında ise *C.parapsilosis* ve bakteriyel etken olmak üzere miks enfeksiyon tespit edildi. Kan kültüründe *Candida* türleri üreyen dört hastadan, üçü AML, biri NHL, bir atağında kan kültüründe, diğer atağında kateter kültüründe *Candida* türü üreyen hasta ise NHL hastasıydı.

Hastalardan 61 atak boyunca 229 idrar örneği gönderildi. Toplam 61 ataktan 54'ünde (%88.5) üreme görülmedi, dördünde bakteriyel etkenler (%6.55), üçünde

(%4.9) *Candida* türleri üredi. Üreyen *Candida* türlerinin ikisi *C.glabrata* ve biri *C.albicans* olarak tanımlandı. Bu üç hastanın ikisi NHL, biri MDS'lu hastalardı.

Hastalardan 34 atak boyunca 40 balgam kültürü gönderildi. Toplam 34 ataktan 25'inde (%73.5) üreme tesbit edilmedi, yedisinde (%20.6) bakteriyel etkenler, ikisinde (%5.9) *Aspergillus* spp. üremesi saptandı. Balgam kültürlerinde görülen *Aspergillus* spp. üremesi, tek kültürde olup hastaların takip edilen diğer balgam kültürlerinde üreme görülmedi.

Hastalardan 12 atak boyunca 20 kateter kültürü gönderildi. Toplam 12 ataktan altısında (%50) üreme olmazken, üçünde (%25) bakteriyel etkenler, ikisinde (%16.6) *Candida* türleri, birinde (%8.3) ise *Candida* türü ve bakteriyel etken birlikte üredi. Bu *Candida* türleri ikisinde *C.albicans* ve birinde *C.tropicalis* olarak tanımlandı. Sadece kateter kültüründe *Candida* üremesi görülen hasta Aplastik anemi hastasıydı.

Gönderilen iki TRA, bir BAL, bir yara, bir boğaz, bir plevra, bir beyin biyopsi materyali kültürlerinde herhangi bir üreme saptanmadı. Hastalardan gönderilen örneklerin atak sayılarına göre kültür sonuçlarının dağılımı ise Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. Hastalardan gönderilen örneklerin atak sayılarına göre kültür sonuçlarının dağılımı.

Örnek	Üreme yok n (%)	Bakteri n (%)	Bakteri ve <i>Candida</i> spp. n (%)	<i>Candida</i> spp. n (%)	<i>Aspergillus</i> spp. n (%)	Toplam atak sayısı (%)
Kan	124 (63.9)	62 (32)	1 (0.5)	7 (3.6)	0	194 (100)
İdrar	54 (88.5)	4 (6.6)	0	3 (4.9)	0	61 (100)
Balgam	25 (73.5)	7 (20.6)	0	0	2 (5.9)	34 (100)
Kateter	6 (50)	3 (25)	1 (8.3)	2 (16.6)	0	12 (100)
Diğer	7 (100)	0	0	0	0	7 (100)

Diğer; İki TRA, bir BAL, bir yara, bir boğaz, bir plevra, bir beyin biyopsi materyali.

4.2. Galaktomannan Antijen Bulguları

101 febril nötropeni hastasının 199 atağı boyunca, her atakta haftada iki defa, ortalama beş serum örneği olmak üzere toplam 813 serumda GM antijeni arandı. Testin index değeri 0.5ng/ml olarak kabul edildiğinde; GM antijeni 172 (%86.43) atak boyunca negatif, 14 (%7.03) atakta bir pozitif, 11 (%5.52) atakta ardışık iki ve daha fazla pozitif, iki (%1) atakta herhangi iki serumda pozitif (önce pozitif, sonra negatif, daha sonra pozitif) bulundu. Testin index değeri ≥ 1.0 ng/ml olarak kabul edildiğinde ise; 190 (%95.47) atakta tümü negatif, altı (%3) atakta bir pozitif, üç (%1.5) atakta ardışık iki serumda pozitif olarak bulundu. Testin Index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve 1 ng/ml kabul edildiğinde GM sonuçlarının dağılımı Tablo 7’de gösterildi.

Tablo 7. Testin Index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edildiğinde Galaktomannan sonuçlarının dağılımı.

	Tümü negatif n (%)	Bir pozitif n (%)	Ardışık iki ve daha fazla pozitif n (%)	Herhangi iki pozitif n (%)	Toplam n (%)
Galaktomannan index ≥ 0.5ng/ml	172 (86.43)	14 (7.03)	11 (5.52)	2 (1)	199 (100)
Galaktomannan index ≥ 1 ng/ml	190 (95.47)	6 (3)	3 (1.5)	0 (0)	199 (100)

GM index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve 1 ng/ml kabul edilerek sonuçlar karşılaştırıldı. Buna göre her iki index değerinde atakların 172’si negatif, dördü bir pozitif, üçü ardışık pozitif olarak tespit edildi. GM index ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde, bir pozitif bulunan 12 atak, index 1ng/ml kabul edildiğinde negatif, ardışık pozitif bulunan altı atak negatif, ardışık pozitif bulunan iki atak bir pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, GM index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edilerek karşılaştırıldığında, index değerleri arasındaki fark orta düzey uyumlu bulundu (Kappa = 0.414, p=0.000). Testin index değerini ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edilerek galaktomannan sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 8. Testin index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve ≥ 1 ng/ml kabul edildiğinde galaktomannan sonuçlarının karşılaştırılması.

		Galaktomannan (index ≥ 0.5 ng/ml)			Toplam	
		Tümü negatif	1 pozitiflik	Ardışık 2 ve daha fazla pozitiflik		
Galaktomannan (index ≥ 1 ng/ml)	Tümü negatif	N	172	12	6	190
		%	100.0	75.0	54.5	95.5
	1 pozitiflik	N	0	4	2	6
		%	0	25.0	18.2	3.0
	Ardışık 2 ve daha fazla pozitiflik	N	0	0	3	3
		%	0	0	27.3	1.5
Toplam		N	172	16	11	199
		%	100.0	100.0	100.0	100.0

Tablo 7’de GM index değeri ≥ 0.5 ng/ml kabul edilerek yapılan değerlendirmede ortaya çıkan “herhangi iki pozitif” değerleri, Tablo 8’de “1 pozitiflik” kategorisi içerisine dahil edildi, iki index değerinin karşılaştırması bu doğrultuda yapıldı.

4.3. PCR Bulguları

Araştırma kapsamına alınan 101 febril nötropeni hastasından 199 atak boyunca, her atakta haftada iki kere olmak üzere *C.albicans* DNA’sı araştırmak için 749, *A.fumigatus* DNA’sı araştırmak için 818 plazma örneği gönderildi. Hastaların takip edildiği 199 atak boyunca 196’sında (%98.5) *C.albicans* DNA’sı saptanmadı. İkisinde (%1) bir pozitiflik saptanırken, birinde (%0.5) ardışık iki ve daha fazla pozitiflik saptandı. Tüm ataklardaki *C.albicans* PCR sonuçları Tablo 9’da gösterildi.

Tablo 9. Tüm ataklardaki *C.albicans* PCR sonuçları.

<i>C.albicans</i> PCR	N	%
Tümü negatif	196	98.5
Bir pozitif	2	1
Ardışık iki pozitif	1	0.5
Toplam	199	100

Hastalarımızın 199 atağında 163’ünde (%81.9) *A.fumigatus* PCR sonuçları negatif, 32’sinde (%16.08) bir pozitif, ikisinde (%1) herhangi iki pozitif, iki (%1) atakta

ise ardışık pozitiflik saptandı. Tüm ataklardaki *A.fumigatus* PCR sonuçları ise Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Tüm ataklardaki *A.fumigatus* PCR sonuçları.

<i>A.fumigatus</i> PCR	N	%
Tümü negatif	163	81.9
Bir pozitif	32	16
Herhangi iki pozitif	2	1
Ardışık iki pozitif	2	1
Toplam	199	100

4.4. Kültür Sonuçlarıyla PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Çalışmamızda 194 atak boyunca kan kültürü gönderildi. Bu atakların 192'sinde eş zamanlı *C.albicans* PCR'ları çalışıldı. Atakların 183'ünde her iki test negatif, 1'inde ise her iki test de pozitif bulundu. Atakların altısında kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülürken *C.albicans* PCR testi negatif, atakların ikisinde ise kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülmezken *C.albicans* PCR'ları pozitif bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda testin spesifitesi %98.92 (% 95 GA, 96.15-99.87), negatif prediktif değeri (NPD) % 96.83 (%95 GA, 93.22-98.83) olarak saptandı. Amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti sadece *C.albicans* DNA'sını tespit edebilmektedir. Bizim araştırmamızda kan kültürlerinde üreyen *Candida*'ların dördü *C.glabrata*, ikisi *C.parapsilosis*, biri *C.albicans*, biri de *C.tropicalis* olarak identifiye edildi. Kan kültüründe üreyen *C.albicans* suşunun *C.albicans* PCR ile de tespit edildiği görüldü. Kan kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Kan kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

	Kan kültürü negatif n (%)	Kan kültürü pozitif n (%)	Toplam n (%)
PCR negatif	183 (98.9)	6 (85.7)	189 (98.4)
PCR pozitif	2 (1.1)	1 (14.3)	3 (1.6)
Toplam	185 (100)	7 (100)	192 (100)

Hastalardan 12 atak boyunca 20 kateter kültürü gönderildi. Atakların 3'ünde (%25) *Candida* türleri üredi. Bunların ikisi *C.albicans* ve biri *C.tropicalis* olarak tanımlandı. *C.albicans* PCR sonuçlarını, kateter kültürü sonuçları ile karşılaştırdığımızda testin spesifitesi %100 (%95 GA, 66.37-100), NPD %81.82 (%95 GA, 48.22-97.72) olarak tespit edildi. Amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti *C.albicans* DNA'sına spesifik bir kit olmakla beraber kateter kültüründe saptanan iki *C.albicans*'dan birini tespit edebildi. Kateter kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 12. Kateter kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

	Kültür negatif n (%)	Kültür pozitif n (%)	Toplam n (%)
PCR negatif	9 (100)	2 (66.7)	11 (91.7)
PCR pozitif	0 (0)	1 (33.3)	1 (8.3)
Toplam	9 (100)	3 (100)	12 (100)

İdrar kültürü gönderilen 61 ataktan üçünde *Candida* spp. üremesi görüldü. Bunların ikisi *C.glabrata* biri *C.albicans* olarak tanımlandı. İdrar kültüründe *C.albicans* üremesi olan hastanın kan ve kateter kültüründe de *C.albicans* ürediği saptandı. *C.albicans* PCR sonuçları idrar kültürü ile karşılaştırıldığında, spesifite %98.28 (%95 GA, 90.76-99.96), NPD %96.61 (%95 GA, 88.29-99.59) olarak saptandı. İdrar kültüründe üreyen *C.albicans* suşunun *C.albicans* PCR ile de tespit edildiği görüldü. İdrar kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 13'de gösterildi.

Tablo 13. İdrar kültürü ile *C.albicans* PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

				İdrar kültürü		Toplam
				<i>Candida</i> spp. negatif	<i>Candida</i> spp. pozitif	
PCR	Negatif	n	57	2	59	
		%	98.3	66.7	96.7	
	Pozitif	n	1	1	2	
		%	1.7	33.3	3.3	
Toplam		n	58	3	61	
		%	100	100	100	

4.5. *A. fumigatus* PCR ile GM (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarının karşılaştırılması

Hastalarımızın takip edilen 199 atağında 145'inde her iki testde negatif, 2 atakta her iki testde bir pozitif, sadece bir atakta her iki testte ardışık pozitif sonuç verdi. GM ile negatif çıkan 27 atağın, 26'sında *A.fumigatus* PCR'da bir pozitiflik, birinde herhangi iki serumda pozitiflik saptandı. GM ile ardışık pozitiflik tespit edilen 11 ataktan, ikisi *A.fumigatus* PCR ile negatif, üçü bir pozitif, biri ise *A.fumigatus* PCR'da da ardışık pozitif bulundu. GM index ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde çıkan sonuçlar ile *A.fumigatus* PCR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 14'de verildi.

Tablo 14. GM, index ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde çıkan sonuçlar ile *A.fumigatus* PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

				Galaktomannan (index ≥ 0.5 ng/ml)				Toplam
				Tümü negatif	1 pozitiflik	Herhangi 2 pozitiflik	Ardışık 2 ve daha fazla pozitiflik	
PCR	Tümü negatif	n	145	11	1	7	164	
		%	84.3	78.6	50.0	63.6	82.4	
	1 pozitiflik	n	26	2	1	3	32	
		%	15.1	14.3	50.0	27.3	16.1	
	Herhangi 2 pozitiflik	n	1	1	0	0	2	
		%	0.6	7.1	.0	.0	1.0	
	Ardışık 2 ve daha fazla pozitiflik	n	0	0	0	1	1	
		%	0.0	.0	.0	9.1	.5	
	Toplam		n	172	14	2	11	199
			%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

A.fumigatus PCR ve Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarını tek pozitif değer anlamlı kabul ederek karşılaştırdığımızda, ataklardan 145'inde iki testin sonucu da negatif, sekizinde ise pozitif bulundu. Ataklardan 27'sinde GM negatif, *A.fumigatus* PCR pozitif, 19'unda GM pozitif, *A.fumigatus* PCR negatif bulundu. *A.fumigatus* PCR, GM ile karşılaştırıldığında spesifite %84.30 (%95 GA, 77.99-89.39), NPD ise %88.41 (%95 GA, 82.50-92.88) olarak saptandı. İki yöntem uyumluluk açısından değerlendirildiğinde, testler arasında zayıf uyum saptandı (Kappa = 0,124, p=0,077). *A.fumigatus* PCR ve Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarını tek pozitif değer anlamlı kabul ederek karşılaştırılması Tablo 4.15'de gösterildi.

Tablo 15. *A.fumigatus* PCR ve Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarını tek pozitif değer anlamlı kabul edilerek karşılaştırılması

			Galaktomannan İndex ≥ 0.5 ng/ml		Toplam
			Negatif	Pozitif	
<i>A.fumigatus</i> PCR	Negatif	n	145	19	164
		%	84.3	70.4	82.4
	Pozitif	n	27	8	35
		%	15.7	29.6	17.6
Toplam		n	172	27	199
		%	100.0	100.0	100.0

A.fumigatus PCR'daki herhangi bir pozitifliği, GM'daki (İndex $\geq 0,5$ ng/ml) ardışık pozitifliklerle karşılaştırdığımızda, ataklardan 156'sında her ikisinde negatif, 5'inde her ikisinde pozitif bulundu, 30 atakda GM negatif, *A.fumigatus* PCR pozitif, sekiz atakda GM pozitif *A.fumigatus* PCR negatif bulundu. Bunun sonucunda testin spesifitesi %83.87 (%95 GA, 77.78-88.85), NPD %95,12 (%95 GA, 90.61-97.87) olarak bulunurken, iki test arasında zayıf uyum (Kappa=0.125, p=0.041) saptandı. *A.fumigatus* PCR sonuçlarının, Galaktomannan (İndex $\geq 0,5$ ng/ml) ardışık pozitif değerleri ile karşılaştırılması Tablo 16'da gösterildi.

Tablo 16. *A.fumigatus* PCR sonuçlarının, Galaktomannan (İndex $\geq 0,5$ ng/ml) ardışık pozitif değerleri ile karşılaştırılması.

			Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) ardışık pozitif		Toplam
			Negatif	Ardışık pozitif	
PCR	Negatif	n	156	8	164
		%	83.9	61.5	82.4
	Pozitif	n	30	5	35
		%	16,1	38.5	17.6
Toplam		n	186	13	199
		%	100,0	100,0	100,0

4.6. Histopatolojik Sonuçlarla, Galaktomannan ve *A. fumigatus* PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Histopatolojik olarak beyin biyopsisinde hifal elemanlar tespit edilen 3 hastanın gönderilen kültürlerinde herhangi bir fungal üreme tespit edilmedi. Bu hastaların GM sonuçları index değeri ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde üçünde de (%100) ardışık pozitiflik bulundu. İndex değeri 1 ng/ml kabul edildiğinde ise iki (%66.7) hastada bir pozitiflik, bir hastada (%33.3) ardışık pozitiflik bulundu. Bu hastaların ikisinde (%66.7) *A.fumigatus* PCR sonuçları negatif, birinde (%33.3) PCR sonucu ardışık pozitif bulundu. Histopatolojik inceleme altın standart olmasına rağmen, tüm hastalarımıza uygulanamadığı için karşılaştırılan testlerde sensitivite ve spesifite hesaplanamadı.

5. TARTIŞMA

Nötropeni, nötrofil sayısının $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olduğu veya kısa süre içerisinde $500/\text{mm}^3$ 'ün altına düşmesi beklenen durumlar; ateş ise vücut ısısının tek ölçümde 38.3°C ve üstünde veya birer saat arayla yapılan iki ölçümde $38.0-38.2^\circ\text{C}$ arasında olması olarak tanımlanmıştır (28). Kemoterapötik ilaçların kemik iliğini baskılaması sonucu ortaya çıkan nötropeni, malignitesi olan hastalarda enfeksiyona zemin hazırlayan en önemli faktördür. Enfeksiyonun sıklığı ve şiddeti nötropenin derinliği ve uzaması ile ilişkilidir. Trombositopeni, hastanın beslenme durumu, diyabet gibi altta yatan hastalıklar da enfeksiyon riskini arttıran diğer risk faktörleridir (22). Bu hastalarda yüzeysel ve derin fırsatçı mantar enfeksiyonları sıktır. Orofarengeal kandidiyazis, özefageal, sinopulmoner, rinoserebral, hepatosplenik ve SSS enfeksiyonları bunların başlıcalarıdır. En sık *Candida* türleri olmak üzere, ikinci sırada *Aspergillus* türleri izler. *Zygomycetes* sınıfında bulunan mantarlar (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp.), *C.neoformans* ve son yıllarda mantar olarak tanımlanan *Pneumocystis jiroveci* daha seyrek olarak fırsatçı mikroorganizmalara yol açar. Ancak doğada bulunan her türlü mantarın bu enfeksiyonlara neden olabileceği unutulmamalıdır (18).

Erken ve doğru tanı febril nötropeni tedavisinde kritik öneme sahiptir. Uygun tedavi alan febril nötropenik hastalarda bile mortalite oranının %5'e çıkabildiği bildirilmiştir (28). Lösemi hastaları, solid tümör ve lenfoma hastalarına göre, nötropenin uzun sürmesi nedeniyle enfeksiyon açısından daha yüksek risk altındadır (140). Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların tamamı hematolojik malignitesi olan, kemoterapötik ilaç kullanan hastalardı. Hastalarımızın 49'u (%48.5) AML, 13'ü (%12.9) ALL, 10'u (%9.9) MM, sekizi (%7.9) NHL, 21'i (%20.8) diğer hematolojik maligniteler olmak üzere ilk sırada AML, ikinci sırada ALL yer almaktaydı. Hörmüt Öz ve ark. (141) immün yetmezlikli 57 hastada İA araştırdıkları çalışmalarında, bu hastaların 49'unun hematoloji hastası olduğunu, bunların da 28'inin AML, dokuzunun ALL hastası olmak üzere AML ve ALL'nin en çok hasta grubunu oluşturduğunu

bildirmişlerdir. Akın ve arkadaşlarının (142) 119 febril nötropeni hastasında yaptığı çalışmada, altta yatan hastalıklar 86 hastada AML, 22 hastada ALL, iki hastada KİT, yedi hastada lenfoma, iki hastada diğer hematolojik maligniteler olarak bulunmuştur. Köroğlu ve ark. (143) 2010-2013 yılları arasında yaptıkları çalışmada, 108 febril nötropeni hastasının, eşlenik hematolojik malignitelerini, 64 (%60) NHL, 22 (%20) AML ve 22 (%20) hastada ALL olduğunu bildirmişlerdir. Tanrikulu ve ark. (144) yaptıkları çalışmada 37 febril nötropeni hastasından 25'inin AML, 22'sinin ise ALL hastası olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, kan kültüründe *Candida* üremesi görülen dört hastadan, üçü AML, biri NHL hastası, kan kültürü ve kateter kültüründe *Candida* üremesi görülen hastanın NHL, sadece kateter kültüründe *Candida* üremesi görülen hastanın ise Aplastik anemi hastası olduğu tespit edildi. Pagano ve ark. (145) yaptıkları çalışmada mantar gelişiminin en sık %12 ile AML'de, %6.5 ile ikinci sıklıkta ALL hastalarında görüldüğünü bildirmişlerdir.

Mantar enfeksiyonları, febril nötropenik hastalarda önemli bir sorun oluşturmaktadır ve bu enfeksiyonların tanısı hala zordur (28). Mantar enfeksiyonlarında görülen klinik bulgular etkene özgü olmadığından tanıya katkıları sınırlı olmakta, histopatolojik ve radyolojik bulgular tanıya ilişkin önemli ipuçları sağlayabilmekte ancak kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerle konmaktadır. Ancak konvansiyonel yöntemler tanıda yeterli duyarlılığa sahip değildir. Altın standart olarak kabul edilen histopatolojik inceleme ve derin dokulardan alınan kültür yöntemlerinin uygulanması çoğunlukla bu hastaların genel durumlarındaki bozukluklardan veya trombositopeniden dolayı mümkün olamamaktadır (32). Bizim çalışmamızda 194 atakta 443 kan, 61 atakta 229 idrar, 34 atakta 40 balgam, 12 atakta 20 kateter, yedi atakta TRA, BAL gibi diğer örnekler araştırma amacı ile laboratuvarımıza gönderildi. Gönderilen örnek sayılarından da anlaşılacağı gibi, bu hastaların febril nötropeni atağında maligniteli hastalar olması özellikle solunum yolunun invaziv örneklerinin çok az sayıda elde edilebilmesi ile sonuçlandı. İA tanısında direkt dokudan alınan örnekte patolojik ve kültür yöntemi ile mantarın gösterilmesi altın standart yöntem olarak kabul edilir. Direkt bakının kültüre göre daha duyarlı ve hızlı tanı değeri vardır. Ancak *Aspergillus* hifleri *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium* türleri ve daha birçok küfün görüntüsü ile karıştırılabilmektedir (14,52). Çalışmamızda Dahiliye Hematoloji Kliniği'nde Febril

Nötropeni tanısıyla takip edilen 101 hastanın 199 febril nötropenik atağı takip edildi. Takip edilen ataklardan 11'i (%5.5) EORTC sınıflandırmasına göre kesin İFİ olarak tanımlandı. Kesin İFİ tanısı alan ataklardan üçünde (%1.5) hastaların beyin biyopsi materyallerinde histopatolojik olarak hifal elemanlar tesbit edilerek kesin İA, sekiz atakta (%4) ise kandidemi tespit edildi.

Kandidemiler invaziv *Candida* enfeksiyonlarının %50-70'ini oluşturur. Kandidemilerde en sık etken *C.albicans* olmakla birlikte albicans-dışı türlerin görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalar içinde *Candida*'ların dördüncü sıraya yerleştiği belirtilmektedir ve kandideminin hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzattığı ve mortalite oranının ise %40-60 arasında olduğu bildirilmektedir. *Candida* cinsi içinde çok sayıda tür olmakla birlikte hastaların çoğunda etken olarak beş tür (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*) izole edilmektedir. *C.albicans* tüm bölgelerde en fazla izole edilen tür olmakla beraber görülme sıklığı bölgelere göre değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Kanada'da *C.glabrata*, *C.albicans*'dan sonra kandidemi etkeni olarak ikinci sıklıkta izole edilen tür iken, Kuzey Amerika hariç diğer bölgelerde *C.parapsilosis*, *C.albicans*'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizden bildirilmiş kandidemi olgularında, çeşitli merkezlerden farklı oranlar (%37-65) verilmekle beraber *C.albicans* birinci sırada yer almaktadır. *C.parapsilosis* ise farklı oranlar (%12-32) verilmekle beraber ikinci sırada yer almaktadır (146). Bizim çalışmamızda, kan kültürleri takip edilen hastaların 124 atağında (%63.9) üreme olmadı, 62'sinde (%32) bakteriyel etkenler, yedisinde (%3.6) çeşitli *Candida* türleri, birinde (%0.5) ise bakteriyel etken ve *Candida* türü birlikte üredi. İzole edilen *Candida* türleri, dördünde *C.glabrata*, ikisinde *C.parapsilosis*, birinde *C.albicans*, birinde *C.tropicalis*'di. Bizim çalışmamız sonucunda kandidemisi olan hastalarda non-albicans *Candida* türlerinin sıklıkla etken olabildiği görülmektedir. Çalışmamızda hastalarımızın kateter kültürlerinde ise 12 ataktan altısında (%50) üreme olmazken, üçünde (%25) bakteri, ikisinde (%16.6) *Candida*, birinde (%8.3) *Candida* ve bakteriyel etken birlikte üredi. *Candida* türleri iki kültürde *C.albicans* ve bir kültürde *C.tropicalis* olarak tanımlandı. Hilmioglu ve ark. (147), kandidemi etkeni olarak birinci sırada *C.tropicalis*'i (%36.7) bulurken *C.albicans*'ı ikinci sırada (%31.8) bulmuşlardır. Atalay ve ark. (146) yaptıkları çalışmada kandidemi etkeni olarak 99 *Candida* suşu

üretmişlerdir. Bu suşların 66'sını (%68) *C.albicans*, 14'ünü (%14.5) *C.parapsilosis*, dokuzunu (%9.3) *C.glabrata*, dördünü (%4.1) *C.krusei*, üçünü (%3.1) *C.tropicalis* ve birini (%1) *C.pelliculosa* olarak tanımlamışlardır.

Şahin ve ark. (148) yaptıkları çalışmada 40 yüksek riskli febril nötropenik olguda 88 *Candida* cinsi maya izole etmişlerdir. *Candida* üreyen örneklerin 29'unun kan, 19'unun idrar, 25'inin balgam, dördünün vasküler kateter, altısının yara, dördünün boğaz ve birinin dışkı olduğunu bildirmişlerdir. Kökenlerin ise 39'unu (%44.3) *C.albicans*, 49'unu (%55.7) non-albicans *Candida* türleri olarak bulmuşlar. Özellikle *C.parapsilosis* kan kültürlerinden sıklıkla izole edilen tür (%41.3) olmuştur.

Wisplinghoff ve ark. (149)'nın 1995-2002 yılları arasında yaptığı bir çalışmada, nozokomiyal septisemilerde *Candida* türlerinin oranının arttığı, izole edilen *Candida*'ların %54'ünün *C.albicans*, %46'sının non-albicans *Candida* türleri olduğu gözlenmiş, kandidemi gelişmesi için geçen sürenin ortalama 22 gün olduğu bulunmuştur. Kandidemilerin nötropenik hastalarda diğer hasta gruplarına oranla yüksek olduğu ve izole edilen *Candida* türlerinin non-albicans olmasının mortaliteyi artırdığı bildirilmiştir (149).

Ülkemizde yapılan çalışmalardan, Otağ ve ark. (150) 2003-2005 yılları arasında klinik örneklerden 873 maya suşu izole ettiklerini ve kan örneklerinde *C.parapsilosis*'in %51.8 oranında izole edildiğini bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada (151); hematolojik maligniteli nötropenik hasta örneklerinin %23.2'sinden *C.albicans*, %76.8'inden non-albicans *Candida* türleri izole edilmiş; non-albicans *Candida*'ların dağılımı %38.4 *C.krusei*, %29.7 *C.glabrata*, %3.6 *C.kefyr*, %3.6 *C.tropicalis* ve %1.5 *C.parapsilosis* olarak bulunmuştur. Susever ve ark.'nın (152) çalışmasında, immünsüpresif 50 hastaya ait 24 BAL, 14 kan, beş periton, dört plevra ve bir perikard sıvısı, bir BOS, bir idrar örneğini incelemişlerdir. Çalışılan 50 örneğin 17 (%34)'sinde üreme saptanmış olup 12 BAL, üç kan ve bir idrar örneğinde *C.albicans*, bir kan örneğinde *C.parapsilosis* tespit etmişlerdir.

Bizim hastalarımızın idrar kültürlerinde takip edilen 61 ataktan, 54'ünde (%88.5) üreme görülmedi, 4'ünde bakteri (%6.6), 3'ünde de (%4.9) *Candida* türleri üredi. İzole edilen *Candida* türleri, ikisinde *C.glabrata* ve birinde *C.albicans* olarak tanımlandı. Üriner sistemden *Candida* izolasyonu genellikle perirektal veya genital bölgeden kontaminasyon, uzun süreli kateterizasyon sonucu mesanenin kolonizasyonu

veya diyabet gibi mesanenin tam boşalmasını engelleyen hastalıklarda görülür. *Candida*'nın idrarda hızla çoğalabildiği düşünülürse, idrar kültüründe yüksek sayıda *Candida* üremesi kontaminasyon veya kolonizasyonu enfeksiyondan ayırt ettirmez. Buna karşılık, doku invazyonu olan hastalarda 10^3 CFU/ml *Candida* spp. üreyebilir (104). Piyüri genellikle enfeksiyonun bir göstergesi olarak kabul edilir, ancak kateterli bir hastada enfeksiyon olmadan da kateterin mekanik etkisiyle piyüri gelişebilir. Asemptomatik kandidürde temel yaklaşım, risk faktorlerinin ortadan kaldırılmasıdır. Genel olarak, immüno-compromize hastalarda kandidüri çok nadiren kandidemiye neden olmaktadır. Mesanede kateteri bulunan asemptomatik kandidüri hastaların tedavisi önerilmemektedir, kateterin çıkarılması veya değiştirilmesi yeterlidir. Antifungal tedavi ile kandidüri ortadan kaldırılabilir, ancak tedavi bitiminden iki hafta sonra tedavi alan ve almayanlar arasında kandidüri sıklığı açısından bir fark saptanamamıştır. Ancak renal transplantasyon yapılmış hastalarda, düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, nötropenik hastalarda ve ürolojik bir girişim yapılacak olanlarda sistemik bir enfeksiyonu önlemek için antifungal tedavi uygulanmalıdır (104).

Bizim çalışmamızda idrar kültüründe *C.albicans* üremesi olan hastanın kan ve kateter kültürlerinde de *C.albicans* üremesi tespit edildi. Bu hastaların plazmalarında PCR ile *C.albicans* DNA'sı arandı. Sonuçta bu hastalardan ikisinde *C.albicans* negatif bulunurken, idrar kültüründe *C.albicans* saptanan hastanın *C.albicans* PCR sonucu da pozitif bulundu. Biz hastalarımızı EORTC/MSG kriterlerine göre sınıflandırdığımız için idrar kültürü pozitifliğini İFİ tanısında kullanmadık. Ancak hastalarımızdan birinde idrar kültüründe *C.albicans* üremesi ve bu hastanın *C.albicans*'a spesifik PCR sonucunun da pozitif olması, bize idrar kültüründe *Candida* üremesinin nötropenik hastalarda anlamlı olabileceğini ve dikkatli değerlendirmek gerektiğini düşündürdü.

İA erken tanı konulup tedavi edilmediği takdirde çoğu zaman ölümlerle sonuçlanabilen ciddi bir hastalıktır. Mortalite oranı altta yatan hastalığa, enfeksiyon bölgesine antifungal tedaviye göre değişmektedir. Son yıllarda Avrupa ve Amerika'daki hematoloji ve KİT servislerinde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. İmmün yetmezliği olan hastalarda mortalitenin %60-90 arasında olması tedaviye erken başlanmasının önemini ortaya koymaktadır (2,153). Erken tanı ve tedavi özellikle nötropenik hastalarda progresyonda önemlidir. Nötropenik ve immün yetmezlikli hastalarda direkt akciğer grafilerinde herhangi bir değişiklik olmasada bilgisayarlı

tomografi önemli bir tanı aracıdır. Toraks bilgisayarlı tomografisinde bir nodül veya halo işareti, anjiyoinvaziv mikroorganizmalar açısından anlamlıdır ve uzamış nötropeni durumunda İA'ı kuvvetle destekler. Ancak akciğerdeki bu görüntüler ventilatörle ilişkili pnömoniler, atelektaziler, ventilatöre bağlı oluşan plevral sıvı oluşumu, *Candida*, herpes simpleks ve CMV enfeksiyonları, tüberküloz, mukormüköz, Wegener, kaposi sarkomu, hemarajik metastaz gibi durumlarda da görülmektedir. Klinik takipte, antifungal tedavinin yeterli olup olmadığını değerlendirmede de çok önemlidir. Ancak patognomonik değildir (154).

Kültür ile değerlendirmenin üreyen *Aspergillus* türlerinin sensitiviteleri ve amfoterisin B'ye doğal dirençli *A.terreus* ve *A.nidulans* gibi suşların tanımlanmasında önemli katkıları olurken, daha yavaş ve daha az duyarlı olması ise kültürün dezavantajlarıdır. Ayrıca kültürde patojen türlerin 37°C'de saprofit türlere göre daha hızlı (24-48 saat içinde) ürettiği de unutulmamalıdır (14). Bizim çalışmamızda, daha öncede bahsettiğimiz gibi bu hastalarda invaziv solunum yolu örneklerinin alınma zorluğundan dolayı BAL yada TRA gibi örneklerin sayısı oldukça sınırlı kaldı. Nispeten daha kolay alınabilen balgam örnekleri hastaların 34 atağında takip edilebildi. Gönderilen balgam kültürlerinin 25'inde (%73.5) üreme olmazken, yedisinde (%20.6) bakteri, ikisinde (%5.9) *Aspergillus* spp. üredi. Ancak bu üremeler tek balgam kültüründe tespit edilip, hastaların takip edilen diğer balgam kültürlerinde herhangi bir üreme görülmedi. Bu nedenle anlamlı kabul edilmeyip, tür düzeyinde tanımlama yapılmadı. Diğer klinik örneklerimizin hiçbirinde *Aspergillus* spp. üremesi görülmedi. Bu durum İA tanısında kültür ve kültür dışı tanı yöntemlerinin birlikte kullanılmasının önemini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada (141), İA olan 57 hastanın 31'inin (%52) çeşitli klinik örneklerinden kültür yapılmış ve bu hastaların 16'sının kültür sonucu pozitif bulunmuştur. Kültürlerinde üremesi olan 16 hastanın 21 örneğinin sekizinin balgam, yedisinin BAL, ikisinin endotrakeal aspirat, birinin plevral mayi, birinin paranazal sinüs, ikisinin de akciğer biyopsi örneği olduğu bildirilmiştir. Örneklerde üreyen *Aspergillus* türlerinin 18'i *A.fumigatus*, biri *A.niger*, ikisi *A.flavus* olarak tanımlanmıştır.

Hedayati ve ark. (155) yaptığı çalışmada, YBÜ'ne başvuran 818 hastadan kriterlerine uygun 36'sını (%4,4) çalışmalarına dahil edip, bunları EORTC/MSG kriterlerine göre sınıflandırmışlar. Bunlardan da dokuzu yüksek olasılıklı, dördü düşük

olasılıklı olmak üzere toplam 13 (%36.1) hasta İA açısından değerlendirmeye alınmıştır. Değerlendirmeye alınan hastalar, nötropenik, hematolojik maligniteli veya Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)'li hastalarından oluşmuştur. Bu hastalardan alınan toplam 21 BAL örneği, mikroskopik ve mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan BAL kültür sonucunda, dokuz yüksek olasılıklı İA riski taşıyan hastanın üçü negatif bulunurken, üçünde *A.fumigatus*, diğer üçünde ise *A.flavus* üremiştir. Diğer dört düşük olasılıklı İA riski taşıyan hastanın ise üçünde üreme olmazken, birinde *A.fumigatus* üremesi görülmüştür. Tortorano ve ark. (156) yaptıkları prospektif bir çalışmada, 27 İtalyan hastanesinin toplam 38 YBÜ'sinde *Aspergillus* türleri ile enfeksiyon oranını %0.631 olarak bulmuşlardır.

Kan örneklerinin kültür sonuçları nadiren pozitif çıktığı için hastaların kanlarından mantar saptamada yüksek duyarlılıklı yöntemler gerekli hale gelmiştir. Konvansiyonel yöntemlerin temelini oluşturan kültür, kesin tanı için altın standart olmakla beraber zor ve zaman alıcı olmaktadır (32). Günümüzde İFİ'lerin erken tanısı açısından gerek serodiagnostik yöntemler gerekse görüntüleme yöntemleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Galaktomannan antijen testi, β -glukan testi ve PCR testleri üzerinde en çok çalışılan yöntemlerdir (124). Anti-*Aspergillus* antikorlarını belirlemenin nötropenik hastalarda ve hematopoetik kök hücre transplant hastalarında aspergilloz tanısı bakımından yeri yoktur. Çünkü bu hastalar uygun antikor yanıtı üretmezler. Serumda ve daha nadiren BAL ve diğer vücut sıvılarında GM antijeninin saptanması İA'nın ön tanısında önem kazanmaktadır. *Aspergillus* Platelia enzim immünassay (EIA) bir galaktofuranoz epitopa karşı monoklonal antikorla sandviç EIA'de GM belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu testin laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği altı üniversite hastanesi laboratuvarının katılımıyla ve altısı İA'lı 12 nötropenik hastadan alınan 20 serum örneği ile sekiz kör EIA negatif serum örneği kullanılarak araştırılmış ve üretici firmanın önerdiği sınır (Index) değerinin negatif örnekler için 1.0'dan 0.8'e ve pozitif olanlar için 1.5'den 1.0'a düşürülebileceği bildirilmiştir. Halen, Avrupa'da kullanılan EIA kiti için 1.0 değeri belirsiz ve 1.5 değeri pozitif kabul edilmektedir. Buna karşın, Mayıs 2003'den bu yana Amerika'da Food and Drug Administration (FDA) onayı olan kitin sınır değeri 0.5'tir (157). Bu testin bildirilen duyarlılık ve özgüllük oranları hasta popülasyonu, tanıda kullanılan yöntemler ve İA tanımlaması için kullanılan kriterlere göre %30-100

oranında değişebilmektedir. Nötropenik ateşi olan ve akciğer tomografisinde şüpheli infiltratı bulunan hastalarda, bu duruma neden olabilecek *Aspergillus* enfeksiyonu veya diğer patojenlerin ayırımında GM testinin nasıl bir yarar sağladığını değerlendiren birçok çalışma bulunmaktadır (158). Platelia galaktomannan EIA testiyle yapılan çalışmalar olumlu sonuçlar ortaya koymuş, birçok prospektif çalışmada sensitivite ve spesifite %29'lardan %99'lara kadar değişkenlik göstermiştir (159). Bizim çalışmamızda, 199 febril nötropeni atağı boyunca haftada iki kez olmak üzere her hastanın ortalama beş serum örneğinde GM antijeni araştırıldı. İndex değeri ≥ 0.5 ng/ml olarak kabul edildiğinde; GM antijeni 172 (%86.43) atak boyunca negatif, 14 (%7.03) atakda bir pozitif, 11 (%5.52) atakda ardışık iki ve daha fazla pozitif, iki (%1) atakda herhangi iki serumda pozitif bulundu. İndex değeri ≥ 1.0 ng/ml olarak kabul edildiğinde ise; 190 (%95.47) atakda tümü negatif, altı (%3) atakda bir pozitif, üç (%1.5) atakta ardışık iki serumda pozitif olarak bulundu. Çalışmamızda, GM testi çalışılan her hastadan anlamlı kültür değerlendirmesi olamadığı için sensitivite ve spesifite hesaplaması yapılamadı. Çalışmamızda, GM index değeri ≥ 0.5 ng/ml ve 1 ng/ml kabul edilerek sonuçlar karşılaştırıldı, index değerleri arasındaki fark orta düzey uyumlu bulundu (Kappa = 0.414, p=0.000). Yao ve arkadaşları (160) 141 invaziv aspergillozlu hastanın serum galaktomannan seviyelerini incelemişler ve antifungal tedavi öncesi ve tedavi sırasında serum galaktomannan seviyelerinin iyi bir gösterge olduğunu ortaya koymuşlardır. Pfeiffer ve arkadaşlarının (120) 27 çalışmayı değerlendirdiği meta-analizlerinde GM testinin sensitivitesi %71, spesifitesi %89 olarak bulunmuştur. NPD %95-98 arasında iyi bir sonuç verirken, PPD %26-53 arasında değişen oranıyla düşük kalmıştır. Demirhan Delibalta ve ark. (159) yaptıkları, 109 olguya ait 126 febril nötropeni atağını inceleyen bir çalışmada birinde kanıtlanmış, ikisinde yüksek olasılıklı, dördünde olası olmak üzere toplam yedi (%6) hastada EORTC/MSG kriterlerine göre invaziv aspergilloz tanımlamışlardır. Galaktomannan sınır OD indeksi 0.5 olarak alındığında sensitivite %43'te, spesifite %55'te kalmış fakat NPD %94 olarak bulunmuştur. Sınır değerler yükseltildikçe spesifite artmış, OD indeksi 1 ve üzerine çıktığında spesifite %75'e, 2 ve üzerine çıktığında %92'ye yükselmiş, doğruluk %88 olarak hesaplanmıştır. Burada en önemli bulgu galaktomannan sınır değeri 0.5 olarak alındığında bile NPD'nin yüksekliğidir.

Maertens ve ark. (161) tarafından yapılan bir çalışmada, uzamış febril nötropenik hastalarda postmortem bulgulara göre galaktomannan testi sınır değer 1ng/ml olarak değerlendirildiğinde sensitivite %89.7, spesifite %98.1, PPD %87.5, NPD %98.4 olarak bulunmuştur.

Pinel ve arkadaşları (162) yaptıkları çalışmada, Hematoloji ve YBÜ'nde İA riski taşıyan 807 hastanın 3327 serum örneğinde Platelia *Aspergillus* testi ile GM antijen düzeylerini araştırmışlardır. Pozitif indeks, üretici firma tarafından önerilen 1.5 olarak kabul edilmiş. GM antijenemisini, 34 hastanın 106 serumunda pozitif, 773 hastanın 3221 serumunda negatif bulmuşlardır. Testin sensitivitesi %99.6, PPD %85.0, NPD %96.8 olarak bulunmuştur. Kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'da spesifite ise %50 olarak bulunmuştur.

Fransa'da iki yıllık bir sürede 135 hematoloji hastasından 195 nötropenik epizod sırasında 507 örnek toplanarak yapılan bir sürveyans çalışmasında GM EIA testinin sensitivitesinin %69, spesifitesinin %96 olarak belirlendiği ancak bu testin İA'un erken tanımında rol oynamadığı, sadece yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı aspergilloz ön tanısına katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır. (163)

Herbrecht ve ark. (164) hematolojik hastalarla yaptıkları çalışmada, klinik olarak 31'i kesin, 67'si yüksek olasılıklı ve 55'i de düşük olasılıklı olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmada hastaların klinik sınıflamasına göre GM sensitivitesi sırasıyla %64.5, %16.4, %25 olarak bildirilmiştir.

Maertens ve ark. (165) tarafından yapılan bir çalışmada nötropenisi olan İA şüpheli 104 hematolojik hasta 16'sı kesin, 13'ü yüksek olasılıklı ve 20'si düşük olasılıklı olarak sınıflandırılmıştır. GM testinin farklı index değerlerindeki sensitivite ve spesifitesinin değerlendirildiği bu çalışmada, kesin ve yüksek olasılıklı hasta grubunda GM testi index değeri 1.5 iken sensitivite ve spesifite %82.7 ve 100, index değeri 0.5 iken %96.5 ve %85.1 ve index değeri 0.5 iken ardışık örnekte sensitivite ve spesifite %96.5 ve %98.6 olarak bildirilmiştir.

Ülkemizde, Hörmet Öz ve ark. (141) yaptıkları çalışmada İA'lı hastalardan 114 serum, bir BAL, bir plevra örneğinde GM antijeni araştırmışlardır. Toplam 57 hastanın index değeri 1ng/ml iken pozitifliği %28; ardışık iki örneğinde index değeri 0.5ng/ml iken pozitifliği %38; tek örnekte index değeri 0.5ng/ml iken pozitifliği %49 olarak bildirmişlerdir. Sadece kesin ve yüksek olasılıklı 36 hastada index 1ng/ml iken

pozitifliği %38; ardışık iki örneğinde index 0.5ng/ml iken pozitifliği %44; tek örnekte index 0.5 ng/ml iken pozitifliği %55 olarak bildirmişlerdir. Kültürü pozitif 16 hastada index değerlerine göre GM sensitivitenin %50 ile %68 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada GM antijen sensitivite ve spesifitenin hem index değerinin 0.5ng/ml alınmasıyla, hem de kesin, yüksek olasılıklı ve kültür pozitif hasta grubunda çalışılmasıyla değiştiği bildirilmiştir.

Bağıışıklığı baskılanmış hastalarda mantar kolonizasyonunun enfeksiyondan ayırt edilmesi güç olmakla birlikte kolonizasyonun hızla enfeksiyona dönüşebileceği ve vücuda yayılma eğilimi gösterebileceği dikkate alınarak risk altındaki hastaların serum örneklerinde haftada iki kez antijen aranması önerilmektedir (51). GM antijen varlığı serum, BAL, plevral mayi, BOS ve akciğer dokusunda da araştırılabilir (166,167). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada balgam örneklerinin de GM antijen belirlemede duyarlı olabileceği bildirilmektedir (168). Yoğun bakım hastalarında yapılan bir çalışmada kesin İA olan hastaların BAL ve serum örneklerinin karşılaştırmasında BAL GM değerlerinin serum örneklerine göre duyarlılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (169).

Keçeli Özcan ve ark. (158) tarafından yapılan bir çalışmada da 48 febril nötropeni hastasının 181 serum örneğinde GM antijeni aranmış, ardışık alınan 169 serum örneğinin 31'inde (%18.3) GM pozitif saptanmış, tek serum örneği çalışılan 12 hastada ise GM negatif bulunmuştur. Ardışık alınan örneklerde indeks 0.5 ve üzeri olduğunda, tek serum örneklerinde indeks 0.7 ve üzeri olduğunda pozitif kabul edildiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada GM testi ile daha sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için olguların İA açısından histopatolojik ve kültür ile kanıtlanmasının sağlanması ve yalancı pozitifliklere neden olacak etkenlerin gözönünde tutulması gerektiği kanısına varılmıştır.

İmmün yetmezlikli hastalarda mantar enfeksiyonlarının aniden başlaması ve hızlı seyir göstermesi, mikroskopik incelemenin duyarlılığının düşük olması, antijen ve metabolit tarayan testlerin ümit verici olmakla beraber altın standart olmaması nükleik asit tespitine dayalı tanı testlerini gündeme getirmiştir (170).

İK için yapılan bir metaanaliz çalışmasında (171), 16 vaka kontrol, 36 prospektif kohort ve iki retrospektif kohort olmak üzere toplam 54 çalışma ve 4694 hasta incelenmiştir. Bu hastalardan 963'ünün kanıtlanmış, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı

İK olduğu bildirilmiştir. Kandidemili hastalar için, PCR sensitivite ve spesifitesi %100, şüpheli İK olgularında ise, PCR için sensitivite %95 ve spesifitesi %92 olarak bildirilmiştir. Kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İK olgularında ise kan kültürleri %38, PCR pozitiflik oranı %85 olarak bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda, *C.albicans* DNA'sı atakların %98.5'inde negatif, %1'inde bir pozitif, %0.5'inde ardışık pozitif olarak bulundu. Yine çalışmamızda hastaların 192 nötropenik atağında eş zamanlı kan kültürü ve *C.albicans* PCR testleri çalışıldı. Bu atakların 183'ünde her iki test negatif, birinde ise her iki test de pozitif bulundu. Atakların altısında kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülürken PCR'ları negatif, atakların ikisinde ise kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülmezken PCR'ları pozitif bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda testin spesifitesi %98.92, NPD ise %96.83 olarak saptandı. Amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti sadece *C.albicans* DNA'sını tespit edebilmektedir. Bizim araştırmamızda kan kültürlerinde üreyen *Candida*'ların dördü *C.glabrata*, ikisi *C.parapsilosis*, biri *C.albicans*, biri de *C.tropicalis* olarak identifiye edildi. Kan kültüründe üreyen *C.albicans* suşunun, *C.albicans* PCR ile de tespit edildiği görüldü. Ayrıca hastalarımızdan 12 atak boyunca 20 kateter kültürü gönderildi. Atakların üçünde (%25) *Candida* türleri üredi. Bunlar ikisinde *C.albicans* ve birinde *C.tropicalis* olarak tespit edildi. *C.albicans* PCR sonuçlarını, kateter kültürü sonuçları ile karşılaştırdığımızda testin spesifitesi %100, NPD %81.82 olarak tespit edildi. Amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti sadece *C.albicans* DNA'sına spesifik bir kit olmakla beraber kateter kültüründe saptanan iki *C.albicans*'dan birini tespit edebildi. Çalışmada kullandığımız PCR kitinin sadece *C.albicans* DNA 'sını saptama özelliğinin olması testin sensitivitesinin düşük olması ile sonuçlandı. Son yıllarda kandidemi olgularında non-albicans *Candida* suşlarının yüksek oranlarda saptandığı görülmektedir, bu nedenle kit seçiminde bu hususun göz önünde bulundurulması gerektiği düşünüldü.

İK olgularında real time PCR, 1,3 β -D Glukan ve kan kültürünün tanı değerini araştıran bir çalışmada (172) ise, PCR'ın diğer tanı yöntemlerinden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hastaların %82'sinde PCR ve kan kültüründe aynı *Candida* türlerinin tespit edildiği, kan kültürü ile PCR ortak kullanıldığında duyarlılığın %98 olduğu belirtilmiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemleri kısa sürede sonuç vermesi ve fungal yükün saptanması ile tedavinin izlenmesi açısından önemlidir (173). Ayrıca

gerçek zamanlı PCR ile yapılan bir çalışmada (174) *Candida* spp. için amplifikasyonun %100 spesifik olduğu belirtilmiştir.

Budak ve ark. (175) yaptıkları bir çalışmada febril nütropenili olgulardan İFİ olan 34 hastada PCR ile *Candida* DNA'sı araştırıldığı ve sadece bir hastada *Candida* DNA'sı saptayabildiklerini ve bu hastaların hiçbirinde kan kültüründe *Candida* üremesi görülmediğini bildirmişlerdir.

Moleküler yöntemlerin, konvansiyonel yöntemlere alternatif yöntem olarak duyarlı, güvenli ve kısa sürede sonuç verebilmesi açısından oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (176). Nükleik asit belirlenmesinin gelecekte primer tanı yolu olacağı tahmin edilmekle birlikte (170) bazı çalışmalarda *Aspergillus* enfeksiyonlarının PCR'a dayalı tanımının güç olduğu belirtilmektedir. Kan ve serumda *Aspergillus* DNA'sının belirlenmesinin ancak konvansiyonel yöntemleri tamamlayıcı olarak kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (51). Birçok bölgeyi hedef alan çok farklı yöntemlerle PCR yapılabilmektedir. PCR'ın kullanılan bu yöntemlere göre sensitivitesi değişmektedir. In house çalışılan PCR'da sensitivite real time PCR'a göre daha düşüktür. Real-time PCR yöntemi kantitatif özelliklere de sahip olduğundan hem tanı hem de tedaviye yanıt izlemede önemlidir (177). Çalışmamızda, *A.fumigatus* DNA'sı atakların %81.9'unda negatif, %16'sında bir pozitif, %1'inde herhangi iki pozitif, %1'inde ardışık pozitif bulundu.

Khot ve ark. (178)'nin yaptığı bir çalışmada akciğer invaziv aspergillozu olan kesin ve yüksek olasılıklı olarak sınıflandırılmış 13 hastanın BAL örneklerinde %76.9'unun PCR testinin pozitif olduğu kaydedilmiştir.

Musher ve ark. (179) yaptığı başka bir çalışmada kesin ve yüksek olasılıklı İA olarak sınıflandırılan 49 hastanın BAL örneğinde PCR testinin sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %67 ve %100 olarak bildirilmektedir.

Silva ve ark. (180) yaptıkları çalışmalarında, 2000-2003 yılları arasında, nütropenik 172 hastanın ardışık 1311 serumunda PCR, 2005-2008 yılları arasında yine nütropenik 169 hastanın ardışık 806 serum örneğinde GM antijeni bakılarak İA araştırılmıştır. Bu çalışmada PCR için sensitivite ve spesifite oranları %75.0 ve %91.9, GM için sensitivite ve spesifite %87.5 ve %93.1 olarak bildirilmiştir ve İA tanısı için iki ve daha fazla ardışık serum örneğinde her iki testinde belirleyici olduğu kanısına varılmıştır.

Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda GM, PCR testlerinin birlikte kullanıldığında farklı duyarlılık oranları bildirilmektedir. Becker ve ark. (181) yaptıkları bir hayvan deneyinde hem kan hem de BAL örneklerinde in house PCR ve GM testlerinin duyarlılığı sırasıyla %62, %18 olarak belirlemişlerdir. Challier ve ark (182) *A.fumigatus*'a spesifik PCR ve GM testlerini birlikte yaptıkları bir çalışmada, 26'sı kesin ve yüksek olasılıklı İA olan immünsupresif hastaların %84.6'sında PCR pozitif iken GM testinin %76.9'unda pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Costa ve ark. (183) tarafından 20 İA tanısı almış hastanın 109 serum örneğinde gerçek zamanlı PCR ve GM yöntemleriyle *Aspergillus* araştırılmış; 109 örneğin %52'sinde GM pozitifken %45'inde PCR antijeni pozitif bulunmuştur. GM'in daha duyarlı olduğu ve testin birlikte kullanımının duyarlılığı artıracağı bildirilmiştir. Buna benzer yapılan çalışmalarda (184,185) GM ve PCR testinin birlikte kullanımı önerilmekte ve bunun duyarlılığı yükselttiği vurgulanmaktadır.

Türkiye'den Hörmət Öz ve ark. (141) yaptıkları çalışmada da GM ve PCR testinin birlikte kullanımı ile duyarlılığın %50.8 yükseldiğini bildirmişlerdir. Kawazu ve ark. (186) GM, BDG ve PCR testlerini birlikte kullandıkları bir çalışmada İA için risk altındaki 96 hematolojik maligniteli hasta grubunda GM testinin duyarlılığının PCR ve BDG'a göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda, PCR ile GM her iki testte de bir pozitif değer anlamlı kabul edilerek karşılaştırıldığında *A. fumigatus* PCR'ın sensitivitesi %32, spesifitesi %84.3, GM'nin ardışık pozitif değerleri anlamlı kabul edilerek karşılaştırıldığında *A.fumigatus* PCR'ın sensitivitesi %40, spesifitesi ise %83.51 olarak bulundu. Böylece çalışmamızda GM ardışık pozitif bulunan hastalarda PCR duyarlılığının daha yüksek olduğu tespit edildi. EORTC ve NIH Mycosis Study Group hematopoietik kök hücre transplantlı ve onkoloji hastalarında GM antijeninin ısrarla bulunuyor olmasını bu hasta grubu için yüksek olasılıklı invaziv mikozun mikrobiyolojik kriterleri arasında saymıştır (71). Galaktomannan oldukça immünolojik bir antijendir. *A.fumigatus* ve diğer *Aspergillus* türlerinde (*A.flavus*, *A.niger*, *A.versicolor*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.oryzae*) varlığı gösterilmiştir (121). Ancak bizim çalışmamızda kullandığımız real-time PCR kiti sadece *A.fumigatus*'a spesifik bir kit olması nedeni ile testin sensitivitesini etkilediğini düşünüyoruz.

Khan Zu ve ark. (187) yaptıkları vaka sunumunda, 60 yaşında, 30 yıldır DM ve buna bağlı çeşitli komplikasyonlar gelişmiş olan erkek hastada, hallusinyasyon gibi

nörolojik semptomlar nedeniyle yapılan beyin biyopsisi ve serum örneklerinde *A.flavus* spesifik DNA tespiti ile serebral aspergillozis tanısı koyduklarını bildirmişlerdir. Bunlar beyin biyopsisinde septalı hifal yapılar görmüşler ancak kültürde üretilmemiştir. Bu çalışmada kültürün *Aspergillus*'u izole etmekte yetersiz kaldığı görüşüne varılmıştır. Bizim üç hastamızda beyin biyopsisinin histopatolojik incelemesi sonucunda mantar elemanları tespit edildi. Bu hastaların sadece birisinden beyin biyopsi materyali kültür incelemesi için gönderildi ve fungal üreme saptanmadı. Gönderilen diğer kültürlerinde de fungal üreme saptanmadı. Bu hastaların GM sonuçları, her üçünde de (%100) ardışık iki ve daha fazla pozitif olarak bulundu. *A.fumigatus*'a spesifik PCR sonuçları ise iki hastada (%66.7) negatif, bir hastada (%33.3) pozitif bulundu. Patolojik olarak İFİ olduğu kanıtlanmış olan bu hastalarda, PCR pozitifliğinin düşük olmasını, kullanılan PCR kitinin *A.fumigatus* DNA'sına spesifik olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamıza Dahiliye Hematoloji Kliniği'nde Febril Nötropeni tanısıyla takip edilen 101 hasta dahil edildi. Bu hastalardan 101 hastanın bir atağı, 61 hastanın iki, 29 hastanın üç, yedi hastanın dört, bir hastanın ise beş atağı olmak üzere toplam 199 nötropenik atağı İFİ açısından araştırıldı. Takip edilen ataklardan 11'i (%5.5) EORTC sınıflandırmasına göre kesin İFİ olarak tanımlandı. Kesin İFİ tanısı alan ataklardan üçünde (%1.5) hastaların beyin biyopsi materyallerinde histopatolojik olarak hifal elemanlar tesbit edilerek kesin İA olarak, sekiz atakta (%4) ise kandidemi tespit edildi. Takip edilen 199 atağın sekizi (%4) yüksek olasılıklı İA, sekizi (%4) ise düşük olasılıklı İA olarak tanımlanırken bu sınıflamanın dışında kalan 172 (86.5) atak ise İFİ açısından riskli bulunmadı.

Çalışmamızda takip edilen 101 hastanın 194 febril nötropeni atağında toplam 443 kan kültürü laboratuvarımıza gönderildi. Toplam 194 ataktan 124'ünde (%63.9) kan kültüründe üreme olmazken, 62'sinde (%32) bakteriyel etkenler, yedisinde (%3.6) çeşitli *Candida* türleri, birinde (%0.5) bakteriyel etken ve *Candida* türü birlikte üredi. Üreyen *Candida* türlerinin dördü *C.glabrata*, ikisi *C.parapsilosis*, biri *C.albicans*, biri de *C.tropicalis* olarak tanımlandı.

Hastalardan 61 atak boyunca 229 idrar kültürü gönderildi. Toplam 61 ataktan 54'ünde (%88.5) üreme görülmedi, dördünde bakteri (%6.55), üçünde de (%4.9) *Candida* üremesi saptandı. Üreyen *Candida* türlerinin ikisi *C.glabrata* ve biri *C.albicans* olarak tanımlandı.

Hastalardan 34 atak boyunca 40 balgam kültürü gönderildi. Toplam 34 ataktan 25'inde (%73.5) üreme tesbit edilmedi, yedisinde (%20.6) bakteri, ikisinde (%5.9) *Aspergillus* spp. üremesi saptandı. Balgam kültürlerinde görülen *Aspergillus* spp. üremesi, tek kültürde olup hastaların takip edilen diğer balgam kültürlerinde üreme görülmedi ve kontaminasyon olarak değerlendirilerek tür düzeyinde tanımlama yapılmadı.

Hastalardan 12 atak boyunca 20 kateter kültürü gönderildi. Toplam 12 ataktan altısında (%50) üreme olmazken, üçünde (%25) bakteri, ikisinde (%16.6) *Candida* türleri, birinde (%8.3) bakteriyel etken ve *Candida* türü birlikte üredi. Bu *Candida* türleri ikisinde *C.albicans* ve birinde *C.tropicalis* olarak saptandı.

Gönderilen iki TRA, bir BAL, bir yara, bir boğaz, bir plevra, bir beyin biyopsi materyali kültürlerinde herhangi bir üreme saptanmadı.

Hastalarımızın 199 atağı boyunca, haftada iki kere gönderilen serumlarında, her atakta ortalama beş serum örneği olmak üzere toplam 813 serumda GM antijeni arandı. Testin index değeri 0.5ng/ml olarak kabul edildiğinde; GM antijeni 172 (%86.43) atak boyunca negatif, 14 (%7.03) atakta bir pozitif, 11 (%5.52) atakta ardışık iki ve daha fazla pozitif, iki (%1) atakta herhangi iki serumda pozitif bulundu. Testin index değeri ≥ 1.0 ng/ml olarak kabul edildiğinde ise; 190 (%95.47) atakta tümü negatif, altı (%3) atakta bir pozitif, üç (%1.5) atakta ardışık iki serumda pozitif olarak bulundu.

Çalışmamızda her atakta yine haftada iki kere olmak üzere, *C.albicans* DNA'sı araştırmak için 749, *A.fumigatus* DNA'sı araştırmak için 818 plazma örneği gönderildi. Hastaların takip edildiği 199 atak boyunca 196'sında (%98.5) *C.albicans* DNA'sı saptanmadı. İkisinde (%1) bir pozitiflik saptanırken, birinde (%0.5) ardışık iki ve daha fazla pozitiflik saptandı. Atakların 163'ünde (%81.9) tüm *A.fumigatus* PCR sonuçları negatif, 32'sinde (%16.08) sadece biri pozitif, ikisinde (%1) herhangi iki pozitif, iki (%1) atakta ise ardışık pozitiflik saptandı.

Hastalarımızın nütropenik ataklarından 192'sinin eş zamanlı kan kültürü ve *C.albicans*'ları çalışıldı. Atakların 183'ünde her iki test negatif, birinde ise her iki test de pozitif bulundu. Atakların altısında kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülürken PCR'ları negatif, atakların ikisinde ise kan kültüründe *Candida* spp. üremesi görülmezken PCR'ları pozitif bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda Testin spesifitesi %98.92 (%96.15-%99.87), NPD ise 96.83 (%93.22-%98.83) olarak saptandı. Ancak amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti sadece *C.albicans* DNA'sını tespit edebilmektedir. Bizim araştırmamızda kan kültürlerinde üreyen *Candida*'ların dördü *C.glabrata*, ikisi *C.parapsilosis*, biri *C.albicans*, biri de *C.tropicalis* olarak tanımlandı. Kan kültüründe üreyen *C.albicans* suşunun *C.albicans* PCR ile de tespit edildiği görüldü.

Hastalardan 12 atak boyunca 20 kateter kültürü gönderildi. Atakların 3'ünde (%25) *Candida* türleri üredi. Bunlar ikisinde *C.albicans* ve birinde *C.tropicalis* olarak tespit edildi. *C.albicans* PCR sonuçlarını, kateter kültürü sonuçları ile karşılaştırdığımızda testin spesifitesi %100, NPD %81.82 olarak tespit edildi. Amplifikasyon için kullandığımız real-time PCR kiti sadece *C.albicans* DNA'sına spesifik bir kit olmakla beraber kateter kültüründe saptanan 2 *C.albicans*'dan birini tespit edebilmiştir.

İdrar kültürü gönderilen 61 ataktan üçünde *Candida* üremesi görüldü. Bunlar; ikisinde *C.glabrata* birinde *C.albicans* olarak tespit edildi. İdrar kültüründe *C.albicans* üremesi olan hastanın, kan ve kateter kültürlerinde de *C.albicans* ürediği saptandı. *C.albicans* spesifik PCR sonuçları idrar kültürü ile karşılaştırıldığında spesifite %98.28, NPD %96.61 olarak saptandı. İdrar kültüründe üreyen *C.albicans* suşunun *C.albicans* PCR ile de tespit edildiği görüldü.

A.fumigatus PCR ile GM (İndex $\geq 0,5$ ng/ml) sonuçlarını karşılaştırdığımızda, hastalarımızın takip edilen 199 atağında 145'inde her iki testde negatif, iki atakta her iki testde bir pozitif, sadece bir atakta her iki testde ardışık pozitif sonuç verdi. GM ile negatif çıkan 27 atağın, 26'sında PCR'da bir pozitiflik, birinde herhangi iki serumda pozitiflik saptandı. GM ile ardışık pozitiflik tespit edilen 11 ataktan, ikisi PCR ile negatif, üçü bir pozitif, biri ise PCR'da da ardışık pozitif bulundu. *A.fumigatus* PCR ve Galaktomannan (İndex ≥ 0.5 ng/ml) sonuçlarını tek pozitif değer anlamlı kabul ederek karşılaştırdığımızda, ataklardan 145'inde iki testin sonucu da negatif, sekizinde ise pozitif bulundu. Ataklardan 27'sinde GM negatif PCR pozitif, 19'unda GM pozitif PCR negatif bulundu. *A.fumigatus* PCR, GM ile karşılaştırıldığında spesifite %84.30, NPD ise %88.41 olarak saptandı. İki yöntem uyumluluk açısından değerlendirildiğinde, testler arasında zayıf uyum saptandı (Kappa = 0.124, p=0.077).

Histopatolojik olarak beyin biyopsisinde hifal elemanlar tespit edilen 3 hastanın bu dönemdeki diğer kültürlerinde fungal üreme görülmedi. GM sonuçları ise index değeri ≥ 0.5 ng/ml kabul edildiğinde üçünde de (%100) ardışık pozitiflik bulunmuştur. İndex değeri 1 ng/ml kabul edildiğinde ise iki (%66.7) hastada bir pozitiflik, bir hastada (%33.3) ardışık pozitiflik bulundu. Bu hastaların ikisinde (%66.7) *A.fumigatus* PCR sonuçları negatif, birinde (%33.3) PCR sonucu ardışık pozitif bulunmuştur.

Histopatolojik inceleme sonuçları altın standart olmasına rağmen, tüm hastalarımıza uygulanamadığı için karşılaştırılan testlerde sensitivite ve spesifite hesaplanamadı.

Febril nütropeni gibi immün yetmezliği olan hastalarda, mantar enfeksiyonlarının mortalitesi oldukça yüksektir. Bu hastalarda tedaviye ne kadar erken başlanırsa, prognozunda o kadar iyi olacağı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak bu mantar enfeksiyonlarının tanısı oldukça zor ve sıkıntılıdır. Tanıda klinik, radyolojik ve laboratuvar bulguları birlikte değerlendirilmelidir. Nütropenik hastalarda klinik, radyolojik bulgular net değildir ve başka hastalıklarla karışabilir. Histopatolojik tanı, direkt mikroskopi ve kültür altın standart olmakla beraber, bu hastalarda var olan trombositopeni nedeniyle uygulanmaları güç ve zaman alıcıdır. Bu nedenle bu hastalarda erken tanıda kolaylık sağlayacak, BDG, GM gibi serolojik testlerin ve moleküler yöntemlerin klasik yöntemlerle birlikte kullanılması gerekir. Bizde çalışmamızda, histopatolojik, direkt mikroskopi, kültür gibi klasik yöntemlerle, serolojik ve moleküler yöntemleri karşılaştırdık. Bu yöntemlerin hiç birinin immün yetmezlikli hastalarda mantar enfeksiyonları tanısında yeterli olmadığı, tanıda yeni yöntemler geliştirmek ve var olan yöntemlerin iyileştirilmesi için daha çok çalışmaya gereksinim olduğu, PCR için *C.albicans* ve *A.fumigatus* spesifik amplifikasyon kitinin kullanılmasının tanıda başarıyı düşürdüğü, panfungal kit kullanılmasıyla daha doğru sonuçlar elde edilebileceği kanısına vardık. Ayrıca hastalarımızın riskli hasta grubunda bulunması, febril nütropeniye girdikleri zaman profilaktik veya ampirik olarak antifungal tedavi başlanması kültür duyarlılıklarını düşürmektedir. Bu nedenle serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinde duyarlılığı yüksek kitlerin geliştirilmesi ve bu hastaların tanısında kullanılmasının hastalarda mortalite oranlarını düşüreceğine inanmaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. Bow EJ, Loewen R, Cheang MS, Schacter B. Invasive fungal disease in adults undergoing remission induction therapy for acute myeloid leukemia: the pathogenetic role of the antileukemic regimen. *CID*. 1995;21:361-369.
2. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of Infection*. 1996;33:23-32.
3. O'Brien S, Blijlevens M, Mahfouz T, Anaissie E. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology*. 2003;438-72.
4. De La Rosa G, Champlin R, Kontoyiannis D. Risk factors for the development of invasive fungal infections in allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2001;4(1):3-9.
5. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: Predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1692-1696.
6. Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16:915-33.
7. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant Infectious Disease*. 1999;1:247-61.
8. Pagano L, Antinori A, Ammassari A, Mele L, Nosari A, Melillo L et al. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. *Eur J Haematol*. 1999;63:77-85.
9. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B et al. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis*. 1999;28:1071-1079.
10. Abbasi S, Shenep JL, Hughes WT, Flynn PM. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1210-1219.
11. Wallace JM, Lim R, Browdy BL, Hopewell PC, Glassroth J, Rosen M et al. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. *Chest*. 1998;114:131-137.

12. Odabaşı Z. İnvaziv fungal enfeksiyonlarda erken tanı. 3. Febril Nötropeni Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Ankara, 2004;48-53.
13. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2006;44:163-172.
14. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:609-22.
15. Arda B. İnvaziv mantar enfeksiyonu tanısında kullanılan radyolojik ve serolojik testlerle ilgili tanımlar. *ANKEM Derg.* 2009;23:122-125.
16. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, et al. Guidelines for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer. *CID.* 2002;734:230-751.
17. Bolaman Z. Febril nötropeni 2011. XXXVI. Ulusal hematoloji kongresi, Antalya 2010;40-45.
18. Febril nötropeni çalışma gurubu. Febril nötropenik hastalarda tanı ve tedavi kılavuzu. *FLORA.* 2004;9:5-28.
19. Rabin S. Febril Nötropenik Hastalarda Değerlendirme. Febril Nötropeni, Editörler Akova M, Akan H. Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, 2010: 97.
20. Gabay M, Tanzi M. Guidelines for the management of febrile neutropenia. *J Clin Oncol.* 2010;1:115-122.
21. Gürler N. Febril nötropenili çocuklarda mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *ANKEM.* 2001;15(3):500-507.
22. De Pauw BE, Verweij PE. Infections in patients with acute hematologic malignancies. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005, 3432-41.
23. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. *The Am J Med.* 1989;86:668-72.
24. Berlinger NT. Sinüsitis in immunodeficient and immunosuppressed patients. *Laryngoscope.* 1995;95:29.
25. Akova M, Akalın HE, Uzun Ö, Hayran M, Tekuzman G, Kansu E et al. Efficacy of flucanazole in the treatment of candidiasis of upper gastrointestinal tract in neutropenic cancer patients, Factors influencing the outcome. *Clin Infect Dis.* 1994;18:298.

26. Heussel CP, Kauczor HU, Heussel GE, Fischer B, Begrich M, Mildenerger P et al. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem cell transplant recipients: use of high resolution computed tomography. *J Clin Oncol.* 1999;17:796-805.
27. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1-3)-beta-D-glukan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005;43:299-305.
28. Metan G. Febril nötropenide yol haritası: tanısal yaklaşımlar. EKMUD bilimsel platformu. *Antalya,* 2013:87-88.
29. Wheat JL, Goldman M, Sarosi GA. Fungal Infections in immunocompromised host. In: Rubin RH, Young Lowell S, editors. *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host.* 4th ed. NY. USA: Kluwer Academic Pres, 2002:215-47.
30. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection Diagnosis and Management* 3rd ed. Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2003:1-13.
31. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis.* 2006;43:3-14.
32. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kaufman CA, de Repentigny L, Chapman SW et al. And the Mycoses Study Group. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *J Clin Infect Dis.* 2001;33:1824-1833.
33. Warris A, Gaustad P, Meis JFGM, Voss A, Verweij PE, Abrahamsen TG. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *J Hosp Infect.* 2001;47:143-148.
34. Kalkanci A, Kustimur S, Sucak GT, Senol E, Sugita T, Adams G, et al. Fulminating fungal sinusitis caused by *Valsa sordida*, a plant pathogen, in a patient immunocompromised by acute myeloid leukemia. *Med Mycol.* 2006;44:531-539.
35. Koch S, Hohne FM, Tietz HJ. Incidence of systemic mycoses in autopsy material. *Mycoses.* 2004;47:40-6.
36. Sanz Alonso MA, Jarque RI, Salavert LM, Peman J. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and *Zygomycetes*. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:2-6.
37. Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. *Clinical Mycology.* Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (ed) Churchill Livingstone, Philadelphia 2003:3-19.

38. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(4):220-227.
39. Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, Mardani M, Girgawy E, Abi-Said D, et al. *Candida krusei* fungemia. an escalating serious infection in immunocompromised patients. *Arch Intern Med*. 2000;160:2659-2664.
40. İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması. Ustaçelebi S, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitabevi, Ankara, 1999:1015-21.
41. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioassays*. 2006;28(8):799-808.
42. Beth Din A, Specht CA, Robbins PW, Yarden O. Chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet*. 1996;250:214-222.
43. Murray PR, Baron EJ, Jongersen JH, Landry ML, Pfaller MA. Mikoloji, in *Manual of clinical microbiology*. (9th ed.) Çeviri editörü Ahmet Başustaoglu, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009: 2256.
44. Yegenoglu Y. Mantarlar. İçinde Bozkaya E, editör. *Tıbbi Mikrobiyoloji-I-Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 2002:181-192.
45. Richardson MD, Kokki M. *Aspergillus*. In: Anaissie E, McGinnis M, Pfaller M editors. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003: 273-296.
46. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998;26:781-803.
47. Verweij PE and Brandt ME. *Aspergillus*, *Fusarium*, and other opportunistic moniliaceous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., vol. 2). Washington: ASM Press; 2007:1802-38.
48. Gams W, Samson RA. Typification of *Aspergillus* and related teleomorph genera. In: Samson RA and Pitt JI (eds). *Advances in Penicillium nad Aspergillus systematics*. New York: Plenum Pres, 1985:23-31.
49. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1965:686.
50. Cole GT, Samson RA. Patterns of Development in Conidial Fungi. London San Francisco Melbourne: Pitman, 1979:190.
51. Kantarcioğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: Mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. *Cerrahpaşa J Med*. 2003;34:140-57.

52. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol.* 2005;43:125-128.
53. Denning DW. Aspergillosis: diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 1996;6:161-8.
54. Sigler L, Verweij PE. *Aspergillus*, *Fusarium* and other opportunistic Moniliaceous fungi. *Manuel of Clinical Microbiology* (8. ed. vol. 2) (Ed. Murray P, Baron EJ, Faller MA, Tenover FC, Tenover JC), American Society of Microbiology Press, Washington DC, 2003:1726-1760.
55. Pasqualotto AC, Denning DW. Diagnosis of invasive fungal infections-current limitations of classical and new diagnostic methods. *Business Briefing:Eur Oncol Rev.* 2005:1-11.
56. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.*1999;12:310-350.
57. Cooke FJ, Terpos E, Boyle J, Rahemtulla A, Rogers TR. Disseminated *Aspergillus terreus* infection arising from cutaneous inoculation treated with caspofungin. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:1238-1241.
58. Alp Ş. *Aspergillus* cinsi mantarların olası virülans faktörleri. *Mikrobiyol Bült.* 2006;40:109-119.
59. Antonio DD, Pagano L, Girmenia C, Parruti G, Mele L, Candoni A, et al. Cutaneous aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:362-365.
60. Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:34-46.
61. Yücesoy M. *Aspergillus* türleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı; 19-23 Eylül, 2004; Kuşadası, Türkiye. ss: 15-17.
62. Yıldırım ŞT. *Aspergillus*'a karşı kazanılmış bağışıklık; TH1/TH2 dengesi *Aspergillus*. Ener B (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:56, 2006:103-113.
63. Tomee JF Ch, Werf van der TS. Pulmonary aspergillosis. *Neth J Med.* 2001;59:244-258.
64. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev.*1996;9:469-488.

65. Birch M, Robson G, Law D, Denning DW. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect and Immun.* 1996;64:751-755.
66. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: An update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:161-172.
67. Ribaud P, Chastang C, Latge JP, Baffroy-Lafitte L, Parquet N, Devergie A et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogenic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.* 1999;28:322-330.
68. Rhome FS, Streifel AJ, Kersey JH, McGlave PB. Extrinsic risk factors for pneumonia in the patient at high risk of infection. *Am J Med.* 1984 15;76(5A):42-52.
69. Wald A, Leisenring W, Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of aspergillosis in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997;175(6):1459-66.
70. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et. al. Invasive fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Disease. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis.* 2002;34:7-14.
71. Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly P, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;15(46):1813-21.
72. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.(eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, (5th ed). Philadelphia, Churchill Livingstone 2000:2656-74.
73. Bilgehan H. *Candida'nın Tarihçesi, Ekolojisi ve Dağılımı. Candida ve İnfeksiyonları.* Tümbay E. İzmir, Bilgehan Basımevi 1986:1-9.
74. Koneman EW, Auren SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Wilm WC. *Mycology.* In: *Diagnostic Microbiology*, (5th ed). Philadelphia, Lippincott, 1997:983-1069.
75. Willke Topçu A, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* (Cilt 2). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002:1797-1809.
76. Yücel A. Tıp bakımından önemli *Candida* türlerinin mikolojisi. Ed: Tümbay E. *Candida ve infeksiyonları.* Türk Mikrobiyol Cem Yay. No 6. Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir, 1986:9-22.

77. Marcilla A, Valentin E, Sentandreu R. The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Int Microbiol.* 1998;1:107-116.
78. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62 (1):130-180.
79. Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. *Candida manan*: chemistry, supression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:1-19.
80. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:281-310.
81. Warnock DW. Superficial, subcutaneous and systemic mycoses. In: Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M(eds). *Medical Microbiology* (7th ed). Philadelphia, Churchill-Livingstone, 2007:596-620.
82. Fox CR, Sande MA. *Candida* Türleri (Çev. S. Arıkan). In: Wilson WR, Sande MA (eds). *Current Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi.* Dündar İH (Çev. Ed). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004:734-744.
83. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds). *Candidiasis.* Zinsser Microbiology (20th ed). Connecticut, Appleton & Lange, 1992:1136-1144.
84. Poyraz Ö. Fırsatçı enfeksiyon oluşturan mantarlar. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, No. 101, Sivas, 2006:129-152.
85. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. *Cerrahpaşa J Med.* 2000;31:172-186.
86. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Mantarlarda dimorfizm. *İnfeksiyon Dergisi.* 2000;14(4):569-578.
87. Arıkan S. Mantarlarda pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 46, 2003:77-86.
88. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün Klinikteki yeri ve önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2006;13(3):193-197.
89. Özcan SK. Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2007;27:589-600.
90. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006;55:999-1008.

91. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):633-638.
92. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1773-1780.
93. Röchel R. Proteinases secreted by *Candida* species. In: Tümbay E, Seeliger HPR, Anđ Ö (eds). *Candida* and *Candidamycolis*. Proceedings of the V. FEMSSymposium on *Candida* and *Candidamycolis*. April 24-28, 1989, Antalya, Turkey. New York: Plenum Pres, 1991:39-42.
94. Yücesoy M, Karaman M, Yuluđ N. Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2001;35:443-450.
95. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400-428.
96. Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4726-4734.
97. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):122-143.
98. Yücesoy M, Yuluđ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 1999;13(4):569-574.
99. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun*. 1996;64(8):2936-2940.
100. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2000;38(12):4626-4628.
101. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiologi of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:685-702.
102. Uzun Ö. Kandidemi. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 19-21 Haziran, 2001; Ankara, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 39, 2001:159-162.
103. Willke A. Kandidemi: Nasıl değerlendirilmeli ne yapılmalı. *İnfeksiyon Dergisi*. 2007; 21(Ek):117-122.

104. Uzun Ö. Yoğun bakım ünitesinde fungal infeksiyonlara yaklaşım. Yoğun Bakım Dergisi. 2003;3(2):135-144.
105. Kauffman CA, Fisher CF, Sobel JD, Newman CA. *Candida* urinary tract infections diagnosis. Clin Infect Dis. 2011;52(6): 452-456.
106. Ganz NM, Brown RB, Berk SL, Esposito AL, Gieckman RA. *Manual of Clinical Problems in Infectious Diseases*. (4th ed). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999:119.
107. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration. 1995; 62:341-347.
108. Munoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: Clinical and diagnostic aspects. Clin Microbiol Infect. 2006;12: 24-39.
109. Mean M, Marchetti O, Calandra T. Bench to bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. Crit Care. 2008;12:204.
110. İnal AS. Mantar enfeksiyonlarının tanısı ve antifungal duyarlılık testleri. In:Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö. Önemli ve sorunlu fungal enfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2006:27-54.
111. Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. Drug Resist Update. 2002;5:3-10.
112. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis. 1997; 24:1122-1128.
113. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med. 1996;100:171-178.
114. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a 3 year prospective study. Am J Med. 1986;81:249-254.
115. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. J Antimicrob Chemother. 2002;49(suppl 1):11-19.
116. Fenelon LE, Hamilton AJ, Figueroa JI, Bartholomew MA, Allen MH, McCarthy P et al. Production of specific monoclonal antibodies to *Aspergillus* species and their use in immunohistochemical identification of aspergillosis. J Clin Microbiol. 1999;37(4):1221-23.
117. Kurup VP, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4:439-456.

118. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF et al. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compare with pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1912-14.
119. Bernard M, Latge JP. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol.* 2001;39(suppl 1):9-17.
120. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1417-27.
121. Wheat LJ. Non culture diagnostic methods for invasive fungal infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2007;9(6):465-71.
122. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge P. A new sensitive sandwich enzymelinked immnosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 497-500.
123. Wheat LJ, Walsh TJ, Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:245-51.
124. Odabaşı Z. İnvaziv fungal infeksiyonlarda görüntüleme yöntemleri ve serodiyagnoz. Arman D, Odabaşı Z, editörler. *Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi, İnfeksiyon hastalıklarında tedavi dizisi-12* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2009; 19-27.
125. Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk J, Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)-beta-D-glucan antigens. *Review Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(11):755-66.
126. Tomee JF, Mannes GP, van der Bij W, van der Werf TS, de Boer WJ, Koëter GH, Kauffman HF. Serodiagnosis and monitoring of *Aspergillus* infections after lung transplantation. *Ann Intern Med* 1996;125 (3) :197-201.
127. Odabaşı Z, Mattiuzi G, Estey E. β -D glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections, validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogeneous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004;39:199-205.
128. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1-3)-beta-D glucan assay fort the diagnosis of invasive fungal infections-a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:1864-70.
129. Prella M, Bile J, Pugnale M. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 51:95-101.

130. Durmaz R. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri. In: Durmaz R (ed).Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001:35-43.
131. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 2001;33(9):1504-12.
132. Shea YR. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA, editörs. Manual of Clinical Microbiology. (9th ed). Washington DC: ASM Press, 2007:1745-61.
133. Chen SC, Halliday CL, Meyer W. Review of nucleic acid-based Diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reactionbased assays. Med Mycol. 2002;40:333-357.
134. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidiosis. FEMS Immunol Med Microbiol: 2005;45:361-368.
135. Bozdayı AM. Real-Time PCR (RT PCR). Turk J Biochem. 2004; 29:11.
136. Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150:245-248.
137. White PL, Barnes RA. *A.fumigatus* PCR-Platforms, strengths and weaknesses. Med Mycol. 2006;44:191-198.
138. Metin DY. Antifungal tedavide yenilikler, 5. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi kitabı. (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Metin DY.,ed), Çanakkale:Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2007:185-187
139. Kayaalp O. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. İn Tıbbi Farmakoloji (10.baskı) Ankara, Hacettepe Taş, 2002:301-309.
140. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infentions. J Antimicrob Chemoter. 2005;56:5-11.
141. Hörmet Öz. Sistemik *Aspergillus* enfeksiyonlarının farklı yöntemlerle mikrobiyolojik tanısı. Uzmanlık tezi. Erciyes Üniv. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı. Kayseri 2010.
142. Akın H, Korten V, Akan H, Aydoğdu İ, Şenol E, Dinçer S, et al ve Febril Nötropeni Çalışma Grubu. Yüksek Riskli Febril Nötropenik Hematolojik Kanser Hastalarında, Kısa Süreli (Dört Gün) veya Uzun Süreli İseпамisin ile Kombine Edilen Sefepim Tedavisi. 6. febril nötropeni sempozyumu. Ankara, 2005:187.

143. Köroğlu M, Kuku İ, Kaya E, Erkurt MA, Nizam İ, Berber İ ve ark. Febril nötropeni ataklarında antifungal tedavi başlama nedenleri. XXXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı; 23-26 Ekim 2013, Antalya, Türkiye.
144. Tanrıkuş FP, Vergili A, Özel AS, Eser A, Kara O, Atagündüz IK ve ark. Hepa-filtresi olmayan bir merkezde akut lösemili hastalarda posakonazol ile antifungal profilaksi deneyimi. XXXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı; 23-26 Ekim 2013, Antalya, Türkiye.
145. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91:1068-75.
146. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç NA. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole invitro duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Dergisi*. 2012;28 (3):149-151.
147. Hilmioğlu S, İnci R, Hoşgör M, Burhanoğlu D, Tümbay E, Tünger A: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde beş yıllık dönemde fungemi epizotları: Non-albicans *Candida* türlerinde artış. In: II. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar Kitabı; 19-21 Haziran 2001; Ankara. Türk Mikrobiyoloji Derneği; 2001:184.
148. Şahin E, Ersöz G, Otağ F, Kandemir Ö, Tiftik N, Kaya A ve ark. Hematolojik maligniteli nötropenik ateşli hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*. 2006;20 (2):121-124.
149. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39: 309-17.
150. Otağ F, Aslan G, Şen S, Özturhan H, Emekdaş G. 2003-2005 süresinde klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon*. 2005;19(4):435-443.
151. Kaya D, Kaptanoğlu S, Üstüner Z, Ertör E. Nötropenik hasta örneklerinden izole edilen mayaların tiplendirilmesi ve flukonazole karşı direncin araştırılması. *KLİMİK Derg*. 2001;14:14-6.
152. Susever S, Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin öneminin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(2):325-335
153. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis*. 2002;186:1297-1306.

154. Chong S, Lee KS, YCA, Chung MJ, Kim TS, Han J. Pulmonary fungal infection: imaging findings in immunocompetent and immunocompromised patients. *Eur J Radiol.* 2006;59: 371-83.
155. Hedayati MT, Khodavaisy S, Masoud A, Orman SM, Habibi MR. Invasive Aspergillosis in intensive care unit patients in Iran. *Acta Medica.* 2013;56 (2):52-56.
156. Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V et al. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). *Mycoses.* 2012;55(1):73–79.
157. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. İnvaziv asperillozun ön tanımında Galaktomannan antijenini belirlemenin yeri ve önemi. *Cerrahpaşa Tıp Der.* 2005;36(3):155-156.
158. Keçeli Özcan S, Mutlu B, Aksoy S, Hacıhanefioğlu A. İnvaziv aspergilloz kuşkulu hastalarda galaktomannan antijen testi sonuçlarının değerlendirilmesi. *ANKEM Der.* 2010;24(4):183-187.
159. Demirhan Delibalta G, Gençer S, Çağ Y, Özer S. Uzamış ateşli nötropenik olgularda galaktomannan ölçümünün invaziv aspergilloz yönünden değerlendirilmesi. *Flora.* 2012; 17(1):11-17.
160. Yao JF, Su D, Huang Y, Zhang P, Lin QS, Wang ZY, et al. Circulation galactomannan screening for early diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009;30:592-5.
161. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a non-invasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood.* 2001;97:1604-10.
162. Pinel C, Fricker Hidalgo H, Lebeau B, Gabron F, Hemidfor R, Ambrosie Thomas P et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(5):2184-86.
163. Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM, Youssef A, Tancrede C, Pico J, Borhis JH, Fenaux P, Munck JN. Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J.* 2000;1:111-116.
164. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F et al. *Aspergillus* Galactomannan Detection in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology.* 2002;20(7):1898-1906.
165. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in

- adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*. 2004;126 (6):852–60.
166. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1467-74.
167. Lass-Florl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, et al. The value of computed tomography guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):101–4.
168. Kimura SI, Odawara J, Aoki T, Yamakura M, Takeuchi M, Matsue K. Detection of sputum *Aspergillus* galactomannan for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Int J Hematol*. 2009;90 (4):463–70.
169. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177 (1):27–34.
170. Merz WG, Roberts GD: Algorithms for detection and identification of fungi, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*. (8. ed). Washington: ASM Press, 2003:1668-85.
171. Tomer A, Leonard L, Mical P. PCR diagnosis of invasive Candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin. Mic*. 2011:665–670.
172. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Pres EG et al. Performance of *Candida* real-time Polymerase Chain Reaction, B-D-Glucan assay, and Blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1240-48.
173. Loeffler J, Hebart H, Henke N, Schmidt K, Einsele H: Quantification and Specification of Fungal DNA in Clinical Specimens Using the Light Cycler Instrument, “Reischl U, Witter C, Cockerill F (eds): *Rapid Cycle Real-Time PZR. Methods and Applications*” kitabında, Springer Verlag, New York, 2002: 179-86.
174. Klingspor L, Jalal S: Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from Clinical Samples Using Real Time PCR, *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):745-53.
175. Budak F, Keçeliözcan S, Mutlu B, Vahaboğlu H. Febril Nötropenili Hastalarda Kandidaya Özgül Taq-Man PZR'ın İnvaziv Fungal İnfeksiyon Tanısındaki Değeri. *ANKEM Derg*. 2007;21(1):14-18.
176. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med*. 2009;30:391-408.

177. Palladino S, Kay I, Fonte R, Flexman J. Use of real-time PCR and the LightCycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;39(4):233–6.
178. Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis*. 2008;8:73.
179. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517–22.
180. Lopes da Silva R, Ribeiro P, Abreu N, Ferreira T, Fernandes T, Monteiro A et al. Early diagnosis of invasive Aspergillosis in neutropenic patients. Comparison between serum Galactomannan and Polymerase Chain Reaction. *Clinical Medicine Insights. Oncology*. 2010;4 81–88.
181. Becker MJ, Marie S, Willemse D, Verbrugh HA and Bakker-Woudenberg IA. Quantitative Galactomannan Detection is Superior to PCR in Diagnosing and Monitoring Invasive Pulmonary *Aspergillosis* in an Experimental Rat Model. *J Clin Microbiol*. 2000;38 (4):1434–38.
182. Challier S, Boyer S, Abachin E, and Berche P. Development of a Serum-Based Taqman Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:844–46.
183. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C and Bretagne S. Realtime PCR Coupled with Automated DNA Extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2224–27.
184. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L et al. Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and Galactomannan Antigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary *Aspergillosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3922–5.
185. Koo S, Bryar J, Page JH, Baden LR, Marty FM. Clinical utility of(1→3)-β-D Glucan Assay (BG) in the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. 46th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy; 2006; San Francisco, CA.
186. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S et al. Prospective Comparison of the Diagnostic Potential of Real-Time PCR, Double-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Galactomannan, and a (1→3)-

- Beta-D-Glucan Test in Weekly Screening for Invasive *Aspergillosis* in Patients with Hematological Disorders. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2733-41.
187. Khan ZU, Ahmad S, Eiman Mokaddas E, Said T, Nair MP, Halim MA et al. Cerebral *Aspergillosis* Diagnosed by Detection of *Aspergillus flavus*-Specific DNA, Galactomannan and (1-3)- β -D-Glucan in Clinical Specimens. *Journal of Medical Microbiology.* 2007;56:129–132.