

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDAKİ İNVAZİV
ASPERGİLLUS ENFEKSİYONLARININ TANISINDA
GALAKTOMANNAN ANTİJEN TESTİ VE PCR'IN
TANIDAKİ YERİ**

Dr. Müge ASLAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ESKİŞEHİR

2012

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDAKİ İNVAZİV
ASPERGİLLUS ENFEKSİYONLARININ TANISINDA
GALAKTOMANNAN ANTİJEN TESTİ VE PCR'IN
TANIDAKİ YERİ**

Dr. Müge ASLAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Filiz AKŞİT**

**ESKİŞEHİR
2012**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Müge ASLAN'a ait "Febril nütropenik hastalardaki invaziv *Aspergillus* enfeksiyonlarının tanısında galaktomannan antijen testi ve PCR'in tanıdaki yeri" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 16 / 11 / 2012

Jüri Başkanı Prof. Dr.Filiz AKŞİT
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Nihal DOĞAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÖZ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
...../...../2012 Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR
Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Filiz AKŞİT'e, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Gül DURMAZ, Prof. Dr.Yurdanur AKGÜN, Prof. Dr Tercan US, Doç. Dr. Nihal DOĞAN, Doç.Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ, Yrd.Doç.Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, çalışma bulgularının istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Selma METİNTAŞ'a, tez konumun belirlenmesinde, çalışma aşamasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yardımcı olan; Yrd. Doç. Dr. Yasemin Öz'e, hasta örneklerinin temini ile ilgili yardımlarından dolayı Doç.Dr. Meltem Olga AKAY'a, uzmanlık eğitimim ve tezimi hazırlama sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, Dr. Ferhat Gürkan ASLAN ve Dr. Nazmiye Ülkü TÜZEMEN'e teşekkür ederim.

ÖZET

Aslan, M. Febril nötropenik hastalardaki invaziv Aspergillus enfeksiyonlarının tanısında galaktomannan antijen testi ve PCR'ın tanıdaki yeri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012. İnvaziv aspergilloz (İA) özellikle bağışıklığı baskılanmış hasta grubunda son yıllarda insidansında artış görülen ve yüksek mortalite nedeni olan bir mantar enfeksiyonudur. Bu hasta grubunda nötropeni IA gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Mevcut yöntemlerin erken tanıda yetersiz kalması ve hastalığın hızla ilerlemesi nedeniyle serolojik yöntemler (Galaktomannan antijen testi) ve moleküler yöntemler (polimeraz zincir reaksiyonu) gündeme gelmiştir. Bu çalışmada, Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Servisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde takip edilen hematolojik maligniteli 99 hastadan febril nötropenik oldukları dönemde toplam 358 ve kontrol grubuna ait 29 serum örneği elde edilmiştir. Prospektif olarak hastaların klinik bulguları ve laboratuvar verileri izlenmiştir. Sınıflandırma Avrupa Kanseri ve Mikoz Araştırma ve Tedavi Çalışma Grubu (EORTC-MSG) kriterlerine göre yapılmıştır. Galaktomannan antijen testi ve biri standardize diğeri in house olmak üzere iki farklı real time PCR testi ve geleneksel PCR işlemleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerin herbiri farklı duyarlılık oranları sergilemiş olmakla birlikte, en iyi performans standardize real time PCR testi ile elde edilmiştir. Ayrıca yöntemlerin kombine kullanımı ile duyarlılık oranlarında anlamlı yükselmeler gözlenmiştir. Hastalara uygulanan kemoterapi rejimleri, kullandıkları antifungal ve antibakteriyel tedavi, nötropeni düzeyi, altta yatan hastalığı gibi faktörlerin kullanılan yöntemler üzerine etkisi değerlendirilmiş olup nötropeni düzeyi ve antifungal kullanımının test performansını etkileyebileceği saptanmıştır. Sonuç olarak; IA'un erken tanı ve tedavisinde, klinik bulgularla birlikte GM ve standardize real time PCR testlerinin birlikte kullanımının yararlı olacağını, PCR'ın rutin kullanıma girmesi için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: PCR, invaziv aspergilloz, febril nötropeni, galaktomannan

Destekleyen Kurum: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Proje no: 2011/11028

ABSTRACT

Aslan, M. Diagnostic Potential of PCR and Galactomannan For Invasive Aspergillosis in Patients with Febrile Neutropenia. Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Microbiology, Eskisehir, 2012. The incidence of invasive aspergillosis (IA) which is associated with extremely high mortality rates, has increased over the last years especially in immunocompromised patients. Neutropenia is an important risk factor for IA. Because of difficulties about diagnosing the infection early in the course of the disease and rapidly progressive clinical outcome; serological (Galactomannan antigen test, GM) and molecular diagnostic assays (Polymerase chain reaction) developed in recent years. This study was conducted with 358 sera samples from 99 patients febrile neutropenic episodes who were followed in haematology and bone marrow transplantation units of ESOGU faculty of medicine hospital with suspicious IA and 29 samples from 29 control patients between January 2011-January 2012. Patients clinical and laboratory findings prospectively observed. They were classified by European Organisation for the Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group criteria. GM antigen test and two different commercial real-time PCR test; one of them is standardised and the other one is in house real time PCR and conventional PCR performed. All these assays showed different sensitivity rates but highest rate of sensitivity obtained from standardised real-time PCR test. Also sensitivity is increased by using combination of diagnostic methods. We evaluated impact of chemotherapy regimens, antifungal and antibacterial treatment, underlying disease, degree of neutropenia on diagnostic tests performance. We detected that antifungal treatment and the degree of neutropenia may influence of diagnostic assays performances. In conclusion; we thought that together with assessment of clinical signs and symptoms, GM antigen test and standardised real-time PCR tests could be beneficial for early diagnosis and treatment of IA. For routine usage of PCR as diagnostic assay more larger studies needed in future.

Key Words: PCR, invasive aspergillosis, febrile neutropenia, galactomannan

Supported by: Eskisehir Osmangazi University, project no: 2011/ 11028

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Sınıflandırma	7
2.4. Genel Özellikler	8
2.4.1. Makroskopik Morfoloji	9
2.4.2. Mikroskopik Morfoloji	10
2.4.3. Hücre Yapısı	11
2.4.4. Antijenik Özellikler	12
2.5. Patogenez	13
2.6. Klinik	17
2.6.1. Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz	19
2.6.2. Aspergilloma	20
2.6.3 Rinosinüzit	20
2.6.4. Hava Yolları Aspergillozu	20
2.6.5. Akut İnvaziv Aspergilloz	21
2.6.6. Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz	23
2.6.7. Santral Sinir Sistemi Aspergillozu	23
2.6.8. Kutanöz Aspergilloz	23
2.6.9. Göz Aspergillozu	24
2.7. Tanı Yöntemleri	24

	Sayfa
2.7.1. Mikroskopik İnceleme	27
2.7.2. Histopatolojik İnceleme	29
2.7.3. Kültür	29
2.7.4. Serolojik Yöntemler	31
2.7.5. Moleküler Tanı Yöntemleri	37
2.7.6. Radyolojik Tanı Yöntemleri	41
2.7.7. Hayvan Modelleri	43
2.8. Tedavi	43
2.9. Mortalite	44
2.10. Ekonomik Yük	45
2.11. Korunma	45
3.GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Hastalar ve Örnekler	46
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	47
3.2.1.Kullanılan Cihazlar	47
3.2.2.Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri	47
3.2.3.Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	48
3.3 Galaktomannan Antijen Testi	49
3.4. <i>Aspergillus</i> DNA'sının PCR ile Araştırılması	50
3.4.1. Ticari Kit ile DNA İzolasyonu	51
3.4.2. Real Time PCR	52
3.4.3. Geleneksel PCR	56
3.5. İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR	60
4.1. Olguların Kültür Üremeleri	62
4.2. Antibakteriyel ve Steroid Kullanımı	63
4.3. Antifungal Kullanımı	63
4.4. Görüntüleme Yöntemleri Bulguları	64
4.5. Galaktomannan Antijen Testi Bulguları	64
4.6. Real-time PCR Bulguları	66
4.6.1. Real-time PCR Sonuçları	66

	Sayfa
4.6.2. İn house Real-time PCR Testi Sonuçları	67
4.6.3. Geleneksel PCR Sonuçları	68
4.7. GM Antijen Testi, real-time PCR, İn House PCR ve Geleneksel PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması	70
4.8. Hasta Özelliklerinin Yöntemler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	72
4.9. Kanıtlanmış ve Yüksek Olasılıklı İA Grubunda GM, real-time PCR ve YRBT’de Pozitifleşme Zamanlarının Karşılaştırılması	79
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	94
EKLER	
Ek 1:	
Ek 2:	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Aplastik anemi
ABPA	Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myelositer lösemi
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BDG	1-3 β -D gluklan
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BT	Bilgisayarlı tomografi
CFU	Coloni forming unit
CMV	Sitomegalovirüs
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
EAPCR	European <i>Aspergillus</i> PCR İnitiatif
ELİSA	Enzim linked immunosorbent assay
EORTC-MSG	European Organisation for Research on Treatment of Cancer- Mycoses Study Group
FDA	Food and Drug Administration
GM	Galaktomannan
GMS	Gomorinin metamin gümüşleme boyası
GVHD	Graft versus host hastalığı
HEPA	High efficiency particulate air
HIV	Human immun deficiency virüs
HKHT	Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
HL	Hodgkin lenfoma
İA	İnvaziv aspergilloz
IDSA	İnfectious disease society of America
İFAT	İmmün floresan antikor testi
Ig	İmmunglobulin
İME	İnvaziv mantar enfeksiyonu
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KLL	Kronik lenfositer lösemi

KML	Kronik myelositer lösemi
LA	Lateks aglütinasyon
MDS	Myelodisplastik sendrom
MR	Manyetik rezonans görüntüleme
NHL	Non hodgkin lenfoma
NPD	Negatif prediktif değer
NNIS	National nosocomial infection surveillance
PAS	Periodik asit schiff
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Patates dekstoz agar
PPD	Pozitif prediktif değer
RIA	Radio immunassay
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
TZP	Piperasilin tazobactam
YRBT	Yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. <i>Aspergillus</i> türlerinin sınıflandırılması	8
2.2. <i>Aspergillus</i> türlerinde mikroskopik görünüm	11
2.3. Fungal hücre duvarı	12
2.4. ELİSA yöntemiyle GM antijen saptanması	33
2.5. Fungal PCR’da kullanılan rRNA bölgeleri	38
4.1 Kanıtlanmış İA olgumuzda izole edilen <i>A.flavus</i>	61
4.2. Real-time PCR görüntüsü	67
4.3. Panfungal pimerler ile jel elektroforez görüntüsü	69

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Sık görülen <i>Aspergillus</i> türlerinin makroskopik ve mikroskopik özellikleri	9
2.2. <i>Aspergillus</i> türlerinin neden olduğu hastalıklar	18
2.3. İnvaziv Aspergiloz için risk grupları	21
2.4. EORTC-MSG invaziv fungal enfeksiyon kriterleri	26
3.1 Real-time PCR Sonuçlarının değerlendirilmesi	54
3.2. İn house real time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	56
3.3. Geleneksel PCR reaksiyon karışımı	56
3.4. Geleneksel PCR amplifikasyon şartları	57
4.1. Çalışma grubunun demografik özellikleri	60
4.2. Hasta grubuna ait özellikler	62
4.3. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı	63
4.4. Görüntüleme yöntemlerindeki bulgular	64
4.5. Olguların galaktomannan düzeyleri	65
4.6. Real-time PCR testinin gruplar arasında karşılaştırılması	66
4.7. İn house real-time PCR testinin gruplar arasında karşılaştırılması	68
4.8. GM antijen testi, real-time testleri, geleneksel PCR, YRBT'nin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif ve negatif prediktif değerleri	69
4.9. EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta GM antijen testi, 2 farklı real-time PCR testi, geleneksel PCR, YRBT'nin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif ve negatif prediktif değerleri	70
4.10. Epizod düzeyinde hasta özelliklerinin ve kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisinin değerlendirilmesi	78
4.11. Epizod düzeyinde EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta hasta özelliklerinin ve kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisinin değerlendirilmesi	80

1.GİRİŞ

İnvaziv mantar enfeksiyonları son yirmi yıldır önemli sağlık problemleri içinde ön plana çıkmaktadır. Bu hastalıkların insidansında görülen belirgin artış risk altındaki popülasyonla bağlantılıdır. Bu popülasyon grubunda, hematolojik maligniteli hastalar, kök hücre ya da solid organ transplantasyonu alıcıları ve diğer bağışıklığı baskılanmış bireyler bulunmaktadır [1, 2].

İnvaziv mantar enfeksiyonlarına sıklıkla *Aspergillus* türleri neden olmaktadır. *Aspergillus* türleri insanda immün sistemin durumuna göre değişmekle birlikte zararsız bir kolonizasyondan, akut invaziv hastalığa kadar değişebilen farklı klinik görünümde enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. İmmüdüşkün bireylerde invaziv aspergilloz yüksek mortalite ve morbiditeye yol açmaktadır. Özellikle uzamış nötropeni epizodları olan hematolojik maligniteli veya allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastalar, yoğun kemoterapi yaklaşımları, steroid kullanımı, akciğer hastalığı ve Graft Versus Host Hastalığı (GVHD) iyi tanımlanmış risk faktörleridir. Bu faktörlerin varlığında fırsatçı patojen olan *Aspergillus* türlerine ait enfeksiyon sıklığı artmaktadır [3, 4].

İnvaziv mantar enfeksiyonlarında tanı genellikle klinik bulgular, görüntüleme yöntemleri ve laboratuvar tanının birleştirilmesine dayanır. Ancak, özgül olmayan semptom ve bulgular nedeniyle invaziv fungal enfeksiyonlara erken tanı genellikle konulamamakta bu durum antifungal tedavide gecikme ile beraber mortalite oranlarında artışa neden olmaktadır [2].

İnvaziv aspergillozun kesin tanısında altın standart yöntem; steril vücut sıvıları ya da doku örneklerinde mikroskopik olarak mantar elemanlarının gösterilmesi veya aynı örneklerde patojenin üretilmesidir. Ancak bu hasta grubunda trombositopeni gibi nedenlerle invaziv tanı yöntemlerinin genellikle uygulanamaması ve kültür sonuçları alınana kadar geçen süre tedavide önemli gecikmelere yol açmaktadır. Kan kültürleri ve bronkoalveolar lavaj kültürleri hastalığın ilerlemiş aşamalarında pozitifleşmektedir. Doku örneklerinin zor elde edilmesi, diğer klinik örneklerin (balgam, lavaj, kan) duyarlılık ve özgüllüklerinin yetersizliği, yeni tanı yöntemleri arayışına yol açmıştır. Görüntüleme yöntemlerinden yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi ile tanıyı destekleyen bulgular (halo, nodül, kavitasyon gibi) sağlansa da bu belirtiler sadece invaziv aspergilloza spesifik olmayabilir. Bu nedenle özellikle bu

grup hastalarda invaziv aspergillozun erken tanısına yönelik invaziv prosedürler içermeyen hızlı, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek tanı yöntemleri tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [5].

Aspergillus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında direkt mikroskopi ve kültür gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra son yıllarda uygulanmaya başlanan serolojik testler (galaktomannan antijen testi, β glukan testi) ve moleküler yöntemlerle mantar antijenleri ve DNA'nın saptanmasına yönelik çalışmalar tanıda önemli gelişmelere neden olmuştur.

Çalışmamızda; invaziv *Aspergillus* enfeksiyonu riski taşıyan hematolojik maligniteli hastaların serum örneklerinde enfeksiyonun erken tanısına yönelik galaktomannan antijen testi ve moleküler testler (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu) kullanılarak bu yöntemlerin mikrobiyolojik tanıdaki değerinin araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Aspergillus' lar tüm dünyada doğal ortamlarda bulunan tanımlanmış yaklaşık 300 türden oluşan bir genustur. İlk kez 1729 yılında İtalyan rahip ve biyolog Pietro Antonio Micheli tarafından tanımlanmıştır. Mikroskopta bu mantarların konidioforlarının görünümü, kutsal su serpmeye yarayan aspergillumun şekline benzediğinden bu genusa *Aspergillus* adı verilmiştir [6].

Aspergillus'ların primer olarak etken oldukları enfeksiyonlar genel olarak 19. yüzyılın ortalarından itibaren izlenmeye başlanmıştır. 1945 yılında Thom ve Raper adlı araştırmacılar bu tarihe kadar identifiye edilen *Aspergillus* tür ve alt türlerini "Aspergillus'ların el kitabı" adlı bir kitapta toplamışlardır. Daha sonraki yıllarda da toprak ve doğal ortamlardan birçok *Aspergillus* türü izole edilmiştir [6-8].

İlk kültür izolasyonları 1944 yılında Culture Collection Unit, Northern Utilization Research Branch laboratuvarlarında yapılmıştır. Thom ve Raper, ilk kez kendilerinin tariflediği, hay (saman)-infüzyon agar üzerine, toprak ekimi ile kültür izolasyonlarını yapmışlardır [6, 8].

Thom ve Church, ilk defa 1926 yılında bu genusu 69 tür ve 11 grup olarak sınıflandırmışlardır. Raper ve Fennell 1945'te bu sınıflamayı 80 tür olarak bildirmişlerdir. Raper ve Fennell, 1965 yılında ise ilk defa *Aspergillus*'ları 18 gruba ayırarak 132 tür ve 18 alt türü tanımladıkları ilk taksonomi yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda sekonder metabolitlerin kromatografisi ve deoksiribonükleik asit (DNA) hibridizasyon gibi yeni tanı yöntemlerinin kullanılması ile yeni türler tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar 1977 yılında ise *Aspergillus*'ların tanımlanmasına yönelik ilk tanı protokolünü oluşturmuşlardır. Samson, 1979 yılında bu taksonomik tabloya 42 tür ilavesi yapmıştır. Bugün bu cinsin kabul edilmiş yaklaşık 300 türü ve 70 telemorfu bulunmaktadır. Genustaki 40 tür insanda enfeksiyon etkeni iken kalan büyük bölümü doğada, toprakta ve çürümüş bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunan saprofit etkenlerdir [6, 9].

İnsanda ilk aspergilloz olgusu, 1842 yılında tüberküloz kavitesinde aspergillom olan bir hastanın, balgamında etkeni gören Bennett tarafından bildirilmiştir. Virchow 1856'da bronşial ve pulmoner aspergillozlu olgular bildirmişlerdir. 1863 yılında Fresenius *A. fumigatus*'u tür olarak tanımlamıştır [6].

Aspergillus'lara bağlı ilk mantar endokarditi 1945'de Kirschstein ve arkadaşları tarafından kronik lenfositik lösemili bir hastanın postmortem otopsisinde saptanmıştır. 1952'de Hinson, Moon ve Plummer tarafından allerjik bronkopulmoner aspergillozis tanımlanmıştır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda görülen invaziv aspergilloz ise ilk defa 1953 yılında Rankin tarafından fırsatçı bir enfeksiyon olarak tanımlanmıştır. 1955'de Zimmerman yenidoğanda invaziv aspergilloz olgusu bildirmiş, 1959 yılında Finegold, Will ve Murray tarafından invaziv aspergilloz sınıflandırılmıştır [6].

1970'de Young ve arkadaşları invaziv aspergillozun (İA) histopatolojik ve klinik özellikleri arasındaki korelasyonu 98 hastalık bir grupta tanımlamışlardır. Katzenstein ve ark' da 1983 yılında allerjik sinüzit olgularını bildirmişlerdir. Akciğer aspergillozuna ait ilk serolojik çalışma ise 1972 yılında yapılmıştır [6].

Türkiye'de ilk aspergilloz olgusu 1923 yılında, akciğer aspergillozuna ilişkin ilk olgu ise 1952 yılında Turhan ve ark. tarafından bildirilmiştir. 1991 yılında yapılan bir çalışmada otomikozdan *Aspergillus* spp. izole edilmiştir. 2002 yılında ise ilk kez otomikoz etkeni *Aspergillus* türlerine antifungal duyarlılık testleri çalışılmıştır. Türkiye'de hemen hemen tüm sistemlerle ilgili aspergilloz olguları bildirilmiştir. Yapılan kültür çalışmalarında başta *A. fumigatus* olmak üzere çoğunlukla *A. niger*, *A. flavus* ve *A. ochraceus* türleri izole edilmiştir [10-12].

2.2 Epidemiyoloji

Aspergilloz, *Aspergillus* cinsine ait türlerin neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılan genel bir terimdir [13].

Aspergillus'lar, dünyanın özellikle kuzey yarım küresinde (Antarktika dahil) olmak üzere yeryüzünde her yerde toprakta, havada ve suda özellikle çürüyen organik maddelerde yaygın olarak bulunan küf türü filamantöz mantarlardır. Zengin enzim sistemleriyle organik maddeleri ayrıştırarak kullanabildikleri ve düşük orandaki nem düzeylerinde bile gelişebildikleri için, depolanmış tahıllarda, çeşitli gıda ve eşyalarda ayrıca dış ortamda ve hastane ve evlerin iç ortamlarındaki havada asılı olarak bulunurlar. Dünya genelinde havadaki tüm sporların %0.1-22'sini oluştururlar [14, 15].

Aspergillus'lar hastane ortamında da bulunabilmektedir. Yapılan çalışmalarda havalandırma sistemleri, yer döşemeleri ve süs bitkilerinden ayrıca hastane içi ortam havasından alınan örneklerde de saptanmışlardır. Hastane içi ve çevresindeki yıkım, onarım, bakım gibi inşaat işlerinin varlığı, yüzeylerde biriken kontamine tozların etrafa yayılmasını kolaylaştırmakta ve ortam havasındaki konidiya yoğunluğunu arttırmaktadır. Bu durumun, yüksek riskli hastalarda gelişen hastane kaynaklı İA ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca hastalık gelişmesi için gerekli inokulum miktarı bilinmemekle birlikte immün yetmezliği olan hastalarda çok azı yeterli olmaktadır [4, 16].

Aspergillus türleri zincirler halinde çok miktarda konidiyum üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidiyumlar genelde 2-5 µm çapındadırlar ve hava ile taşınırlar [17].

Aspergilloz genellikle havadaki konidiyumların solunum yoluyla alınması ile bulaşırsa da mukokutanöz yüzeylerin cerrahi vb. nedenlerle bütünlüğünün bozulmasıyla dokuyu enfekte edebilmekte ve kontamine aletlerle de vücuda girebilmektedir. Sağlıklı bireylerde nadiren deri ve korneadan travmalarla vücuda girebilmektedir [13].

Hematolojik malignitesi olan hastalarda, otopsi sonuçlarına göre, 1017 otopsinin 314 (%31)'ünde invaziv fungal enfeksiyon saptanmıştır ve bu hastaların sadece dörtte birine ölüm öncesi tanısı konulabilmiştir. İnvaziv fungal enfeksiyon prevalansı 1989-93, 1994-98, 1999-2003 yıllarında sırasıyla %32, %30, %31 iken, invaziv küf enfeksiyon prevalansının %19, %24, %25 olduğu gösterilmiştir. İnvaziv küf enfeksiyonlarının en sık etkeni *Aspergillus* türleridir. Bunların çoğunluğunu *A. fumigatus* oluşturmakla birlikte, son yıllarda *A. terreus*, *A. flavus* ve *A. ustus* gibi diğer *Aspergillus* türleri ile oluşan enfeksiyonlarda artış söz konusudur. 1980-1990 yılları arasında National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) verilerine göre, hastane kökenli *Aspergillus* enfeksiyon oranının %1.3 olduğu bildirilmiş olsa da, kemik iliği transplantasyonu yapılan ünitelerde enfeksiyon oranının %36 olduğu bildirilmektedir. Amerikada 2001- 2006 yılları arasında 23 transplantasyon merkezinde yapılan bir çalışmada 875 hematopoyetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) yapılan hastada 983 invaziv mantar enfeksiyonu tanımlanmış, bunların %43'ünü İA oluşturmuştur [3, 18-20].

İA gelişiminde en önemli risk faktörleri arasında derin (<100 nötrofil/ μ l) ve uzamış nötropeni ile yüksek doz kortikosteroid veya diğer immün baskılayıcı tedavilerin uygulanması yer almaktadır. Sitotoksik kemoterapiye bağlı mukozal bariyerlerde hasar oluşması, profilaktik ya da geniş spektrumlu antibakteriyel kullanımına bağlı mikrobiyal florada bozulma da risk faktörleri olarak tanımlanmıştır [21].

Nötropeni süresi uzadıkça İA riski artmaktadır. Nötropeni süresi 10–12 günden az olduğunda İA nadir görülmektedir. Nötropenin ilk üç haftasında İA gelişme sıklığında her gün %1 oranında artış beklenirken, beşinci haftadan sonra artış her gün %4–5 oranında olmaktadır. Özellikle hematolojik malignitesi olan, hematopoietik kök hücre ya da kemik iliği transplantasyonu (HKHT) yapılan hastalarda enfeksiyonların epidemiyolojisinde değişiklik ve İA insidansında artış tespit edilmiştir [8, 22].

HKHT sonrası İA gelişimi erken dönem olarak kabul edilen transplantasyon sonrası ilk 20 günde ve geç dönem olarak tanımlanan 100'üncü günden sonra daha fazla görülmektedir. En önemli risk faktörü nötropeni ve graft versus host hastalığı (GVHD) dir. Diğer risk faktörleri arasında ise epitel bariyerlerin bozulması, monosit fonksiyonların zayıflaması, hücrel immünitede yetersizliğe yol açan transplantasyon işlemi, hasta ve hastalıkla ilgili özelliklerin yanı sıra çevresel koşullar da yer almaktadır. Otolog kök hücre alıcılarında, allojenik kök hücre alıcılarına göre İA daha az görülmekte ve çoğunluğu (%86) nötropenik dönemde ortaya çıkmaktadır [22, 23].

Diğer riskli grubu solid organ transplantasyonu (SOT) yapılan hastalar oluşturmakta olup, bu grupta insidans nakledilen organa göre değişmektedir. Örneğin; allojenik HKHT uygulanan alıcılarda insidans %2-26, otolog HKHT alıcılarında %2-6, renal transplant alıcılarında %0-4, karaciğer transplantasyonunda %5-15 ve kalp, akciğer transplantasyonu yapılanlarda %1-15 iken, kemoterapiye bağlı nötropenik hastalarda %70'e kadar çıkabilmektedir. Hematolojik hastalığı olmayan yoğun bakım hastalarında %5.8'e varan oranlar bildirilmektedir. Bağışıklığı baskılanmış hasta grubu dışında, son zamanlarda klasik risk faktörleri bulunmayan siroz, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) ve kısa süreli kortikosteroid

kullanımı olan yoğun bakım hastalarında da İA giderek artan oranlarda bildirilmektedir [24, 25].

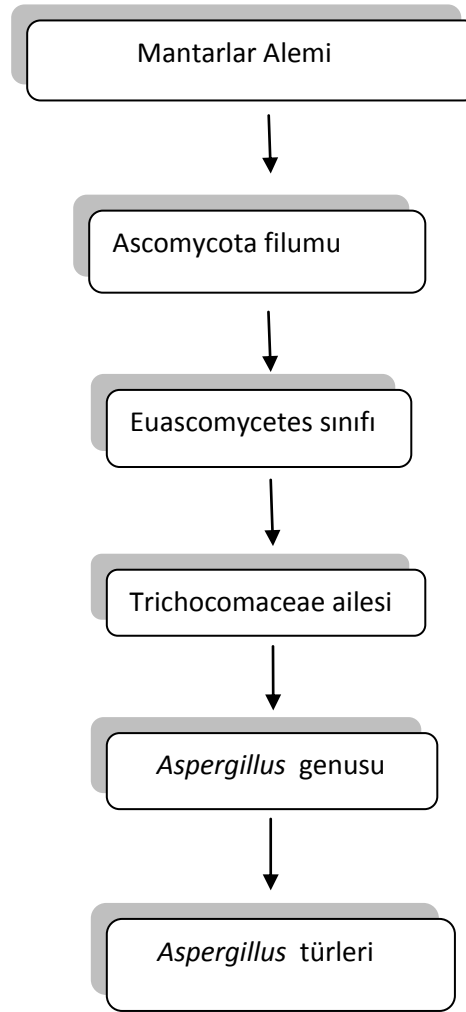
İA' da mortalite, tanı yöntemlerinin ve tedavi rejimlerin sınırlı olması nedeniyle %60-90 oranında seyretmektedir. Bu nedenle sürveyans çalışmalarında hastane havasındaki *Aspergillus* konidiya yoğunluğunu saptayabilmek için belirli aralıklarla hastane içi hava örneklerinin toplanması gerekmektedir. İA oluşumunda spor konsantrasyonunun eşik değeri üzerinde henüz tam bir fikir birliği yoktur. Ancak korunmuş odalardaki havada *Aspergillus* konidiya konsantrasyonunun 5 cfu/m³ altı (ideal; 0.1'in altı), havası filtre edilen alanlardaki total mantar spor sayısı içinde azami 15 cfu/m³ olması sınır değer olarak kabul edilmektedir [25].

Hastane havasında *Aspergillus* konidiyumları için çeşitli potansiyel kaynaklar tanımlanmıştır. Bunlardan en belirgin olanı dış ortamdaki havanın uygunsuz filtrasyonu ile hava kullanma sistemidir. Hastane yer döşemeleri, hasta odalarındaki saksılar ve sular da enfeksiyon gelişiminde kaynak olabilmektedir. Özellikle sonbahar ve yaz mevsiminde görülen kuru hava ve yüksek sıcaklığın havadaki spor sayısını etkileyerek, İA insidansında artışa yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [26, 27].

2.3 Sınıflandırma

*Aspergillus*lar bakterilerde olduğu gibi binominal sisteme göre iki sözcük halinde adlandırılmaktadır. İlk sözcük cins (genus) adı olup büyük harfle başlar, ikinci sözcük ise tür (species) adı olup küçük harflerle yazılır. Cins ve tür adları italik harflerle yazılmaktadır. Bakterilerin aksine mantarlar için büyük oranda morfolojiye dayalı bir sınıflama yapılmaktadır.

Aspergillus türleri taksonomik düzenlemede; mantarlar (fungi, kingdom) aleminde *Ascomycota* filumunda, *Euscomycetes* sınıfında, *Eurotiales* takımında, *Trichocomaceae* ailesinde *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartoria* gibi telemorfik (eşeyli üreme) formları ve *Deuteromycota* bölümünün *Hyphomycetes* sınıfı, *Moniliacea* ailesinde yer alan anamorfik (eşeysiz üreme) formları bulunmaktadır [8, 28].



Şekil 2.1 *Aspergillus* türlerinin sınıflandırılması

2.4. *Aspergillus* Türlerinin Genel Özellikleri

Aspergillus genusu çok sayıda tür içermekle birlikte az sayıda türün insanda enfeksiyona yol açtığı gösterilmiştir. İnsandaki enfeksiyonların %95'inden fazlasında 3 tür etkindir. Bunlar *A.fumigatus* (yaklaşık %90'ı), *A.flavus* ve *A.niger*. Bu türlerin dışında daha nadir görülen ve invaziv enfeksiyon nedeni olan türler:

A. nidulans, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. ustus* ve *A. versicolor*, *A. amstelodami*, *A.avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. restrictus*, *A. wentii*, *A. sydowi*' de etken olarak rapor edilmiştir [6].

Tablo 2.1. Sık görülen *Aspergillus* türlerinin makroskopik ve mikroskopik özellikleri [6]

Türler	Makroskopik Görünüm		Mikroskopik Görünüm		
	Yüzey	Taban	Konidiofor	Fialid	Vezikül
<i>A. fumigatus</i>	Gri,mavi, yeşil	Bronzdan beyaza	Kısa düz, renksiz, yeşil	Tek sıralı	Yuvarlak Kolumnar baş
<i>A. flavus</i>	Sarı, yeşil	Sarıdan kahverengiye	Renksiz, pürüzlü	Tek veya iki sıralı	Yuvarlak Radial baş
<i>A. niger</i>	Siyah	Beyazdan sarıya	Uzun,düz, renksiz, kahverengimsi	İki sıralı	Yuvarlak, radial baş
<i>A. terreus</i>	Tarçın, kahverengi	Beyazdan kahverengiye	Kısa, düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, Sıkı, kolumnar baş
<i>A. versicolor</i>	Önce siyah, sonra Sarı, bronz veya pembe	Bronzdan sarıya veya Kırmızı mor	Uzun, düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, dağmık, radial baş

2.4.1 Makroskopik Morfoloji

Aspergillus cinsine ait türlerin tanımlanmasında makroskopik ve mikroskopik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Patojenik türler, rutinde bakteriler için kullanılan besiyerlerinde kolay ve hızlı şekilde ürerler. Mantarlar için kullanılan besiyerlerinde ise üremenin %35 daha iyi olduğu belirtilmiştir [8].

Besiyerinde oluşturdukları kolonilerin rengi, büyüklüğü, termotoleransı türlerin tanımlanmasında yol gösterici olmaktadır. Koloni yüzeyleri başlangıçta beyaz renkte 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 olarak oluşur (Tablo 2.1).

Ayrıca koloninin rengi besiyerinin yüzeyinde ve tabanında farklı olabilir. Genellikle kolonilerinin yüzeyi pudralı görünümündedir.

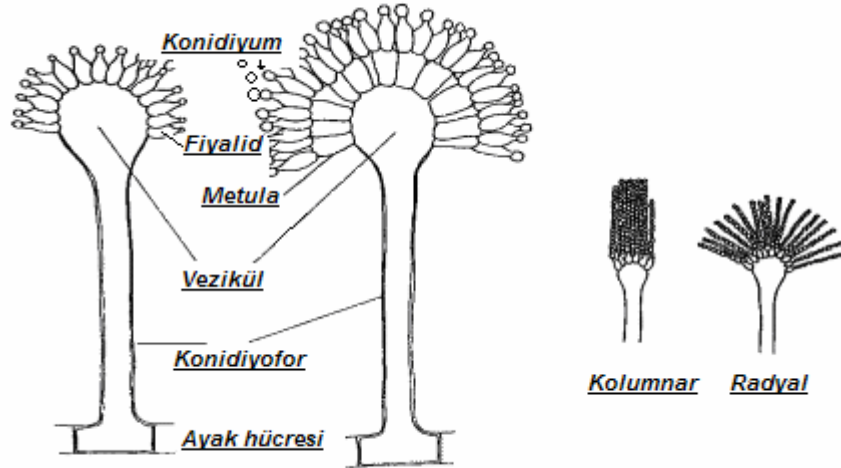
Türleri karakteristik koloni özellikleri taşırlar. Standart şartlarda belirli sürede oluşan koloni boyutu önemli bir özelliktir. Koloni sınırları kalın ve keskin sınırlı, ince ve diffüz, düz veya düzensiz lobüler, yüzeyel ya da batık koloniler olabilir. Bununla birlikte örneğin *A. nidulans*'ın bazı soylarında koloninin arka yüzü zeytin yeşili- mor renkte veya *A. versicolor*'da olduğu gibi portakal rengi ile mor renk arası olabilmektedir. Patojen türlerin sporlanması genellikle 30-37°C'de 36-48 saat inkübasyonda oluşurken, bazı türler sporlanma için daha uzun süreye ihtiyaç duymaktadır. *A. fumigatus* besiyerlerinde çok hızlı üreyebilmektedir. Termotoleran özelliği ile 40°C'nin üzerinde bile üreyebilir ve %0.1'den daha az O₂ basıncı gibi zor şartlara dayanabilmektedir [8, 13].

2.4.2 Mikroskopik Morfoloji

Mikroskopik morfoloji, genelde tüm türlerde aynı olmakla birlikte bazılarında türe özgü olup, identifikasyon için önemli rol oynamaktadır. *Aspergillus*'lar hif ve konidiyaları 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 [29].

Aseksüel tanımlamada, ilk değerlendirme konidiyanın oluşumuna göre yapılmaktadır. Konidiya (spor); tek hücreli bölmesiz, düzgün ya da üzeri desenli, şekilli (pürtüklü, tüylü, dikensi, vb), şeffaf ya da renkli aseksüel üreme evresinde üremeyi sağlayan yapıdır. Konidiyofor (=fertil hif), *Aspergillus* başını taşıyan özelleşmiş hiftir. *Aspergillus*'ların konidiyoforu düzenli bir yapılanma içerisindedir. Bu konidiyoforlar apikalde genişleyerek düzgün veya düzensiz, hiyalin veya pigmentli vezikül oluşturur. Vezikül üzerinde konidiya doğuran yapılara fiyalid denir ve fiyalidler direk vezikül üzerinde bulunabildikleri gibi (tek sıralı/uniseriat) metula (fiyalid taşıyan hücre) denen yapılar üzerinde de bulunabilirler (çift sıralı/biseriat). Fiyalidlerin ucunda yuvarlak, oval, pigmentli konidiya zincirleri oluşur. Mikroskopik özelliklerin tanımlanmasında, veziküllerin şekil ve boyutu yanında fiyalid ve

metulaların düzeni de önemlidir. Bu yapılar kolumnar veya radyal dizilim gösterebilirler. Şekil 2.2’de bu yapılar görülmektedir [29, 30].



Şekil 2.2 *Aspergillus* türlerinde mikroskopik görünüm

2.4.3 Hücre Yapısı

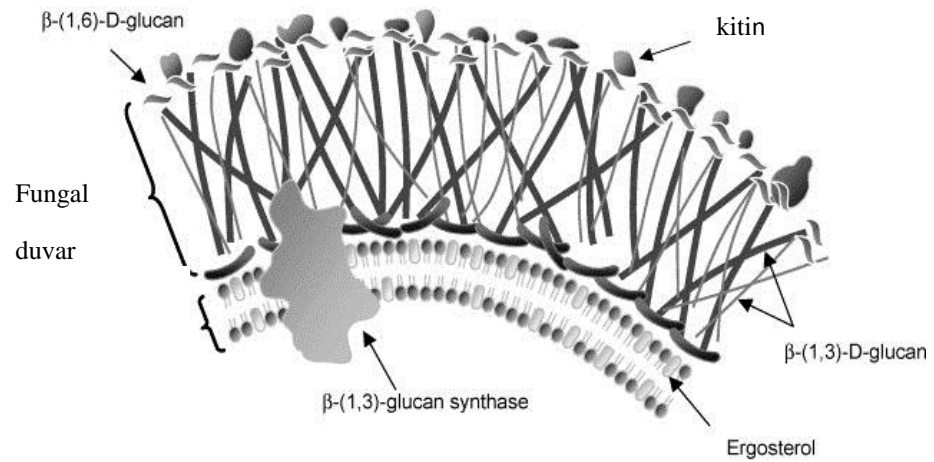
Hücre duvarı: Yapısında, polisakkaridler (yaklaşık %80) daha fazla olmak üzere protein (%5-15) ve lipidler (%3-10) bulunmaktadır. Bununla beraber melanin, inorganik elementler, fosfatlar, aminopolisakkaridler de vardır. Hücre duvarının fibriler özelliğini kitin oluşturur. Bunlar, N-asetilglikozamin ve glikoz polimerlerinin β -(1,4) tarzında birleşmesinden meydana gelmiş düz zincirlerdir [31].

Sitoplazma membranı: 3 tabakadan yapılmıştır ve ünit membran özelliği göstermektedir. Yapısında, fosfolipid, protein ve steroller (ergosterol) bulunur [29].

Sitoplazma

Mantar hücresi, ökaryotik hücrelere benzer sitoplazma kompozisyonuna sahiptir. Sitoplazmada bulunan endoplazmik retikulumun etrafı, çift kat ünit membranla çevrilidir ve üzerinde ribozomlar bulunur. Vakuol yapıları içinde pigment ve amorf maddeler bulunur. Sitoplazmada enzimler, inorganik elementler, polisakkaridler ve lipidleri içeren veziküller de bulunmaktadır. Sitoplazma içinde serbest veya endoplazmik retikulumlar üzerinde çok sayıda mitokondri ve ribozom bulunmaktadır. Ökaryotik özellik gösteren mantar ribozomları 80S sedimentasyona sahiptir [29].

Nükleus içindeki kromozom, DNA yapısında olup, birden fazla sayıdadır. Kromozomun yapısı ökaryotik ve prokaryotik hücre kromozomlarına benzerlik gösterir. DNA da G + C oranı % 35-65 arası olup türler arasında bu oran değişiklik göstermektedir. Çekirdekçik yapısında %80 ribonükleik asit (RNA) ve protein bulunmaktadır [29].



Şekil 2.3 Fungal hücre duvarı [32]

2.4.4 Antijenik Özellikler

Aspergillus türlerinin iki önemli antijeni bulunmaktadır.

Galaktomannan Antijeni

Mantar hücresinin duvarında bulunan galaktomannan (GM); *Aspergillus* 'lar için spesifik ve ekzoantijen olarak da hücre dışına salgılanabilen bir polisakkarittir. GM, mantarın gelişmesi esnasında salgılanan hücre duvar polisakariti olup çözünebilir olduğundan idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral sıvı, bronko alveoler lavaj gibi örneklerden de saptanabilmektedir [33].

İmmünojenik olmayan mannan iç yapısı ve çeşitli uzunluklardaki immünojenik yan galaktofuranozil ünitelerden meydana gelir. Yan zincirde, dallanmış ve düz olmak üzere iki yapı vardır. Düz yapı β -(1,5) galaktofuranoz ve β -(1,4) galaktopiranozdan oluşur. Yan zincirdeki dallanmış yapı ise β -(1,5) ve β -(1,6)

galaktofuranozdan oluşmaktadır. GM antijeni arama testlerinde kullanılan monoklonal antikolar, β -(1,5) galaktofuranoz epitopuna bağlanır [33].

(1,3)- β -D-Glukan (BDG)

Bu antijenik yapı *Aspergillus* türleri basta olmak üzere maya ve küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür. BDG antijeni, denizde yaşayan ve Horseshoe crab olarak bilinen ve özellikle de *Tachypleus tridentatus* ve *Limulus polyphemus* canlılarının doğal immün sistemi tarafından tanınabilir. Bu canlılardan izole edilen faktör G ile BDG temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon oluşturur. BDG antijenini saptamaya yönelik testler bu temele dayanabilir. Serumdaki beta glukan seviyesi, invaziv aspergilloz ve diğer birçok fungal enfeksiyonların erken dönemlerinde pozitifleşebilir [34, 35].

2.5. Patogenez

Aspergillus fumigatus insanlarda *Aspergillus* enfeksiyonlarının %90'ından izole edildiği için patogenez araştırmalarında en çok çalışılan tür olmuştur.

Aspergillus fumigatus çevresel karbon ve nitrojen dönüşümünde önemli rol oynayan saprofit bir mantardır. Doğal olarak organik yikıntılar üzerinde, toprakta ürerler. Bu tür, dünyada yaygın olmamasına karşın hava kaynaklı konidiyumlu funguslar arasında en yaygın olanıdır. Her konidyal başlıkta binlerce konidiya oluşturarak yoğun bir biçimde sporlanmaktadır. *Aspergillus* türlerinin enfeksiyöz partikülü, konidiyumdur. Havaya yayılan konidiyumlar akciğer alveollerine ulaşabilecek kadar küçüktür (2-3 μ m). Konidiyaların havaya yayılması çevresel şartlar ve hava akımına bağlıdır. Konidiyaların küçük olmaları, havaya yayıldıktan sonra, ev içinde veya dışında havada asılı kalmalarını sağlamaktadır. Çevresel araştırmalar, insanların günde yüzlerce *A. fumigatus* konidiyasını inhale ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla diğer organlara da yayılım görülmesine rağmen, hastalık predominant olarak akciğerlerde oluşmaktadır. Daha az sıklıkla cerrahi yaralar, kontamine intravenöz kateterler veya kontamine bandaj uygulamaları gibi yollarla ciltten giriş sonrasında kutanöz enfeksiyonlar gelişebilmektedir [36, 37].

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. Enfeksiyon damar invazyonu ve akciğerde infarkt ile sonuçlanır [6].

İnvaziv aspergilloz immün kompetan konakta nadiren görülür. Normal pulmoner savunma mekanizmaları sonucunda enfeksiyon önlenir. *Aspergillus*'a karşı ilk savunma siliyer hareketle organizmanın hava yollarından temizlenmesidir. *A.fumigatus*'un diğer türlere göre daha patojen olmasının nedenlerinden birisi de konidyum boyutunun küçük olmasıdır (2-3.5 µm çapında). *A.flavus*'un konidyumları 3-6 µm, *A.niger*'in konidyumları ise 4-5 µm çapındadır. Konidyum, alveollere ulaştıktan sonra pulmoner makrofajlar *Aspergillus* konidyumlarını fagosite eder ve öldürür. Hifal germinasyondan sonra ise polimorfonükleer lökositler hem konidyumların hem de hiflerin yok edilmesinde rol oynar. Trombositlerin *A.fumigatus* hiflerinin hücre duvarına tutunarak aktive olduğu ve duvarı harap ettiği gösterilmiştir [38].

2.5.1. Konak Savunması faktörleri

Doğal immünite: *Aspergillus* için özgül olmayan savunma faktörleri;

Anatomik bariyerler; Mukus tabakası, silyaların hareketi ve akciğer sürfaktanı,

Fagositik hücreler; Konidyalara karşı ilk hücresel savunma makrofajlar tarafından olur. Makrofajlar konidyaları öldürürken aynı zamanda salgıladığı sitokin ve kemokinlerle hücresel direncin koordinasyonunu da sağlar.

Makrofajlardan kaçan şişmiş konidiya ve hifler, nötrofiller ve monositler tarafından öldürülmekte ancak nötrofiller primer olarak hiflerin yok edilmesinden sorumlu tutulmaktadır.

Salgısal faktörler; Hif yapıları komplemanı hem alternatif hem de klasik yoldan, konidyumlar ise çok zayıf olarak alternatif yoldan aktive etmektedir [36].

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 hücresel cevap ile ilişkilidir, IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini artırır, antifungal efektör hücre aktivitesinin baskılanmasına ve IFN γ üretiminin azalmasına yol açar [36].

2.5.2. İnokulum ve İnkübasyon Süreci

İA gelişimi için yeterli 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 [17].

2.5.3. Olası Virülans Faktörleri

Aspergillus türlerinin hastalık oluşturabilmesi için, konak dokusuna tutunmayı, penetrasyonu ve özellikle fagositik hücreler gibi savunma elemanlarını etkisiz hale getirmesini sağlayan bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir.

Adezinler: *Aspergillus* konidiyumları fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albumin, immünglobülinler, kollajen ve sürfaktan gibi konakta dolaşımında veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanırlar. Bu bağlanma özgül olmayan fizikokimyasal etkileşimlerle ve/veya özgül reseptör-ligand ilişkisi aracılığıyla olabilir. Yapılan son araştırmalara göre, mantar hücre duvarında yeni saptanan antijenik bir yapı olan galaktozaminogalaktan, immunosupresif olarak davranmaktadır. Bu yapısal komponent özellikle nötrofillerde apoptozu indüklemektedir. Konidiyumların komplemanla veya mannoz bağlayan protein ve sürfaktan gibi diğer proteinlerle opsonizasyonu, konak savunmasının mikroorganizmaya karşı etkinliğini arttırabilir. *A. fumigatus* patojenitesinin artmasını sağlayan bir kompleman inhibitörü salgılar [38-40].

Pigmentler: Melaninler, hidrofobik yapıda ve negatif yüklü makromoleküllerdir. Funguslarda bulunan en önemli melanin tipleri dihidroksinaftalen (DHN) melanin ve DOPA-melanindir. *A.fumigatus* sporlarının hücre duvarında bulunan DHN melanin, yeşil-koyu gri renk oluşturur. Melanin;

ultraviyole ışınlarına, enzimatik lizise, aşırı ısı derecelerine ve infeksiyon sırasında reaktif oksijen türevlerine karşı koruyuculuk sağlar. *A. fumigatus*'un pigmentten yoksun olan yabancı türleri, yeşil sporlara sahip suşlardan daha az patojenik olduğu gösterilmiştir [36, 39, 40].

Toksik Moleküller: *Aspergillus* türleri hifal üreme sırasında değişik metabolitler oluştururlar. En fazla oluşan metabolitlerden biri gliotoksindir. Akut olarak toksik olan bu bileşiğin bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliği vardır. 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 astrosit ve nöronal apoptozu indükler [40].

Aspergillus cinsi mantarlar özel bir toksin sınıfı olan ribotoksinleri üretir. Ribotoksinler yaklaşık 17kDa büyüklüğünde bir protein sınıfıdır ve restriktosin, α sarkin ve mitogillin gibi ürünleri içerir. Restriktosin *A. fumigatus* ve *A. restriktus* 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 fungal büyümeyi kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Başka bir toksik madde olan hemolizin ise eritrositlerin parçalanmasından sorumludur [36, 41].

Enzimler: *Aspergillus* türleri kendi besin maddelerini karşılayabilmek için fosfataz, peptidaz ve proteazlar gibi çok çeşitli hücre dışı enzimleri üretme yeteneğine sahiplerdir. *A.fumigatus*'un iki elastazı, bir serin proteazı ve metalloproteazı klonlanmış ve sekanslanmıştır. Elastin ve kollajen akciğer dokusunun %30'unu içeren ana yapısal bileşenlerinden biridir. 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.

Bir diğer enzim grubu olan fosfolipazlar, doku invazyonu sırasında hücre membranının ana bileşeni olan fosfolipidleri parçalar ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda *Aspergillus fumigatus* izolatlarının fosfolipaz A, B, C ve D salgıladıkları gösterilmiştir. Fosfolipazların hepsi 37°C'de eksprese

edilmektedir. Klinik izolatların, çevresel izolatlara göre fosfolipaz C aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [40].

İmmün sistem hücreleri tarafından salgılanan hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen radikalleri, konidiyalar için toksik etkilidir. Bu maddelerin zararlı etkilerinden kurtulabilmek için *A. fumigatus*'un 3 farklı katalaz ve 2 süperoksit dismutaz sentezleyebildiği gösterilmiştir [38].

2.6. *Aspergillus* Enfeksiyonlarında Klinik

Aspergillus türleri insanlarda, genel olarak allerjik hastalıklar, asemptomatik kolonizasyon ve yüzeysel enfeksiyonlar ile invaziv enfeksiyonlar olmak üzere üç farklı klinik durumun oluşmasında rol oynamaktadırlar. *Aspergillus* türlerinin neden oldukları hastalıklar Tablo 2.2'de görülmektedir.

Tablo 2.2. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar [6]

<p>1. Allerjik aspergilloz</p> <p>a. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz</p> <p>b. Allerjik <i>Aspergillus</i> sinüziti</p> <p>2. Saprotik aspergilloz</p> <p>a. Pulmoner aspergilloma</p> <p>b. Sinüs aspergillomu</p> <p>3. Yüzeysel aspergilloz</p> <p>a. Otomikoz</p> <p>b. Onikomikoz</p> <p>c. Kutanöz aspergilloz (immünsüprese olmayan konakta)</p> <p>4. Doku hasarı, cerrahi veya yabancı cisimle ilişkili enfeksiyon</p> <p>a. Keratit ve/veya endoftalmit</p> <p>b. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu (ör. yanıklarda)</p> <p>c. Cerrahi alan enfeksiyonu (ör. prostetik kapak endokarditi, karaciğer transplantasyonu sonrası yara enfeksiyonu, subdural ampiyem)</p> <p>d. Yabancı cisimle ilişkili (intravenöz kateterler, vasküler greft enfeksiyonu, sürekli ambulatuvar diyaliz kateteri)</p> <p>5. İmmünsüprese konakta enfeksiyon</p> <p>a. Primer kutanöz veya muköz membran aspergillozu</p> <p>b. Pulmoner aspergilloz</p> <p>i. Akut invaziv aspergilloz</p> <p>ii. Kronik nekrotizan aspergilloz</p> <p>c. Hava yolları aspergillozu</p> <p>i. Tıkayıcı bronşiyal aspergilloz</p> <p>ii. İnvaziv <i>Aspergillus</i> trakeobronşiti</p> <p>d. Nazal veya paranazal sinüzit (rinosinüzit)</p> <p>e. Dissemine aspergilloz, özellikle serebral aspergilloz</p>

Aspergillus enfeksiyonları için temel giriş noktası ve primer enfeksiyon odağı alt solunum yolu sistemidir ancak deri, periton, böbrek, kemik, göz ve gastrointestinal sistem gibi diğer giriş yolları da belirtilmiştir. Bundan başka

operasyon sonrası cerrahi yara yeri enfeksiyonlarından da *Aspergillus* türleri etken olarak izole edilmişlerdir [21].

Kolonizasyon olduğunda:

Sağlıklı birey: Hastalık gelişmez

Kaviter akciğer: Aspergilloma

Kronik akciğer hastalığı: Kr. nekrotizan Aspergilloz

Astım: Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz

İmmünesüpresif: İnvaziv Pulmoner aspergilloz

2.6.1. Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)

İmmün sistemi baskılanmamış kişilerde ortaya çıkan *Aspergillus* türlerine karşı gelişen bir hipersensitivite durumudur. Atopik, astım veya kistik fibrozlu kişilerde sıklıkla görülür. Akciğer bulgularının patofizyolojisi tam anlaşılammış olmakla birlikte *Aspergillus*'un hava yollarında kronik kolonizasyonuna karşı gelişmiş immünolojik bir reaksiyondur. Sporların inhalasyonunu takiben hifler bronş lümeninde mukus içinde çoğalır ve Th2 CD4(+) T hücreleri cevabı ve IgE ve IgG antikorlarının oluşumu ile bağışık yanıt gelişir [42].

ABPA, Tip I, III ve IV aşırı duyarlılık reaksiyonları ile karakterizedir. Tip I reaksiyon sonucu bronkospazm, kan ve balgamda eozinofili ve ani ortaya çıkan cilt reaksiyonları görülür. Pulmoner infiltratlar ve bronşektazinin Tip III reaksiyon sonucu (Arthus ya da immün kompleks bağımlı) gelişen, dolaşan ya da presipitan antikor komplekslerine bağlı olarak geliştiği düşünülürken Tip IV reaksiyon sonucu ise mononükleer infiltrasyon ve granülomlar oluşmaktadır. TLR 2, TLR 4 ve TLR 9 polimorfizminin ve spesifik HLA-DR moleküllerinin (DR-2 ve DR-5) ABPA gelişimi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir [43, 44].

ABPA'nın uzun dönem prognozu iyidir. İlaça dirençli astım veya bronşial destrüksiyon varlığında kalıcı hava yolu obstrüksiyonu gelişebilir. Oral kortikosteroidler, antifungal ajanlardan itrakonazol veya anti IgE antikor tedavide kullanılabilir [42].

2.6.2. Aspergilloma (miçetoma, fungus topu)

Doku invazyonu olmadan gelişen aspergilloz enfeksiyonudur. Akciğer parankimindeki bir kavite veya bronş içinde fungal hif, mukus ve hücresel artık, fibrin ve inflamatuvar hücrelerin birleşmesi ile gelişir. Sıklıkla altta yatan bir enfeksiyon vardır. Tüberküloz gibi altta yatan akciğer hastalığına bağlı olarak öksürük, dispne, sekonder bakteriyel enfeksiyonların gelişimi ile ateş de görülebilir [8].

2.6.3. Rinosinüzit (Paranasal sinüs aspergillozu)

Benign, noninvaziv formdan invazyon gösteren forma kadar değişen spektrumda akut ve kronik olabilir [45].

Nazal polipler, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve kronik rinit fungal enfeksiyon gelişimine yatkınlık yaratabilir. Nötropenik hastada odağı bulunamayan uzamış ateş, epistaksis, burun tıkanıklığı gibi lokal bulgular, burun ve maksiller sinüse ait patolojik bulgular görülebilir. Kronik formu ise diyabet hastalarında, aşırı alkol alanlarda ve AIDS'lilerde sıktır. En sık izole edilen etken *Aspergillus flavus*' tur [45].

Tedavinin yönlendirilmesi ve prognozun belirlenmesi için görüntüleme yöntemleri, mukor ve tümör gibi kitlelerden ayırırda patolojik inceleme gereklidir. Sinüs endoskopisi sırasında alınan biyopsi materyalinde etkenin izole edilmesi tanıda altın standarttır. Tür düzeyinde tanımlanıp, antifungal duyarlılık belirlenmelidir [45].

2.6.4. Hava Yolları Aspergillozu

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda (özellikle AIDS ve akciğer transplantasyonu alıcıları) *Aspergillus*'un esas olarak hava yollarını invaze etmesiyle gelişir. Hafif trakeobronşitten ülseratif veya psödomembranöz trakeobronşite kadar değişen klinik tablolar görülebilir. Larinks aspergillozu ve epiglottit nadirdir. Sıklıkla öksürük, ateş ve dispne, daha nadir göğüs ağrısı ve hemoptizi görülebilir. Direk grafi başlangıçta normaldir, ilerleyen dönemde konsolidasyon, BT'de peribronşial konsolidasyon, sentrilobüler nodüller, lobar konsolidasyon, buzlu cam dansitesi izlenebilir. Kesin tanı histopatolojik olarak konulur. Hava yolu obstrüksiyonu veya disseminasyon sonucu mortal seyredabilmektedir [6, 8]

2.6.5. Akut İnvaziv Aspergilloz

Akciğer, patojenin giriş yolu olduğundan en sık tutulan bölge olmakla beraber hemen hemen tüm vücut bölgelerine yayılabilir ve gerçek yayılım bölgeleri çoğunlukla sadece otopside tespit edilebilir. Akut invaziv pulmoner aspergilloz İA olgularının en sık görülen klinik tipidir. Son yıllarda invaziv enfeksiyonların çeşitli formlarının olduğu olgu sayıları belirgin olarak artmıştır. İA hemen daima immün yetmezliği olan bireylerde görülür, tanı konulup tedaviye başlanılsa bile sıklıkla ölümcül olarak seyretmektedir [7].

Hastaların %25-30'unda başlangıçta klinik belirti yoktur. En erken belirti çoğu zaman ateş ve öksürüktür. Plöretik veya özgül olmayan göğüs ağrısı sıktır, genellikle minimal balgam üretimi olur, nadiren hemoptizi görülür.

İnvaziv aspergillozun risk derecesi hasta gruplarında farklılık göstermektedir. Nötropeni düzeyi ve süresi en önemli predispozan konak faktörüdür. Aspergilloz gelişimi nötropenin ilk iki haftası sırasında düşük orandayken, ikinci ve üçüncü haftadan sonra artmaktadır. Hücre bağımlı bağışık yetmezlik (kemik iliği transplantasyonu yapılmış ya da kortikosteroid tedavili hastalar gibi) da diğer bir risk faktörüdür. Tanımlanan belli başlı risk faktörleri Tablo 2.3'de görülmektedir [22].

Hematolojik maligniteli hastalardaki aspergillozda solunum yetmezliği ve akciğerlerde radyolojik olarak bilateral tutulum olması kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Nötropenik hastalarda en yaygın klinik tablo 5-7 gün geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye rağmen düşmeyen ateştir [7].

Tablo 2.3 İnvaziv aspergilloz için risk grupları [22]

Yüksek risk	Orta düzeyde risk	Düşük risk
Hematolojik malignite (özellikle AML)	Solid organ transplantasyonu	Diabetes mellitus
Uzamış nötropeni	ALL, KLL	Otolog HKHT
Allojenik HKHT	Alta yatan akciğer hastalığı, KOAH	Kistik fibrozis
GVHD	Siroz, malnütrisyon	İV ilaç bağımlılığı
	Yoğun bakımda yatış	Bağ doku hastalıkları
	HIV enfeksiyonu	
GVHD:graft versus host hastalığı ALL: Akut lenfoblastik lösemi AML: Akut myeloblastik lösemi HKHT: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu KLL: Kronik lenfositik lösemi		

Risk faktörleri

İA için önemli risk faktörleri hastanın immun sisteminin durumu, organ hasarının varlığı ve derecesi, mikrobiyal maruziyet (kolonizasyon, çevresel faktörler, önceden enfekte olma) olarak özetlenebilir.

1. Nötropeni: Özellikle remisyon-indüksiyon tedavisi alan veya HKHN hastalarında erken pre-engrafman döneminde en önemli risk faktörü nötropenidir. Nötropenin süresi ve şiddeti IA için önemli bir belirleyicidir. Üç haftadan daha kısa süren nötrofil sayısının 100–500/mm³ olduğu durumlarda orta derecede bir riskten bahsedilebilir. Absolü nötrofil sayısının 500'ün altında geçtiği süre 5 hafta ve üzerindeyse bu durum yüksek risk olarak kabul edilebilir. Nötropeniye ilave olarak, kullanılan kemoterapi rejimi (yüksek doz sitozin arabinosid gibi) ve altta yatan hastalığın tipi de (AML) risk faktörleri olarak sayılabilir.

2. Hematopoietik kök hücre nakli: Allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda, otolog kök hücre nakline oranla IA riski daha yüksektir. Bunun nedeni de, allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda immunsupresyonun daha ağır ve uzun süreli olmasıdır. Allo-HKHN hastalarının çoğunda, *Aspergillus* enfeksiyonları özellikle nötrofil sayısının düzeldiği ve GVHD'nin önlenmesi amacıyla immünsüpresan tedavinin uygulanmaya başladığı döneme rastlar. Engrafman sonrası dönemde IA için risk belirgin olarak artmıştır. Burada da; özellikle T hücre ayıklanmış ürün kullanımı, CD34 seleksiyonu yapılması, steroid kullanımı, nötropeni, lenfopeni, GVHD, CMV enfeksiyonu varlığı gibi faktörler önemli rol oynar. Steroidler nötrofil fonksiyonunu doğrudan etkilediği gibi, in vitro olarak *A.fumigatus* üremesini de uyarmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda, steroid kullanımının IA riskini iki kat arttırdığı gösterilmiştir. IA için diğer önemli bir risk faktörü de kullanılan steroid dozudur. Bu doz 2 mg/kg'dan 3 mg/kg'a çıktığında risk de 2 kat artmaktadır [22, 46].

Aspergillus hiflerinin kan damarlarını invaze etme özelliğinden dolayı pulmoner aspergillozun değişik formları görülebilmektedir. Bunlar, nekrotizan bronkopnömoni, pulmoner hemorajik infarkt, kavite içi apseler ve granuloma şeklinde olabilir. Histolojik olarak iki formu vardır. Birincisi nodüler formudur, diğeri ise pulmoner embolidekine benzer şekilde pulmoner infaktlara neden olan vasküler hasar yaptığı hastalık formudur. Klinik olarak başlangıç sinsi olup genellikle ilk semptom ateştir [8].

Progresif kuru öksürük, nefes darlığı, plöretik tipte göğüs ağrısı, geniş spektrumlu antibakteriyel ajan kullanımına rağmen yüksek ateşin devam etmesi durumunda İA'dan şüphelenilir. Ateş en sık görülen bulgu olmasına rağmen yüksek doz steroid kullanan hastalarda ateş baskılanabilir. Hemoptizi ve göğüs ağrısı ise major bir damar hasarı ve ölümcül kanamanın habercisi olabilir. Erken tanı bu hastalarda uygun ve güçlü tedavi ile başarılı bir netice almak için önemlidir. Fakat hem klinik semptomlar hem de radyolojik bulgular erken dönemde nonspesifiktir. Bilgisayarlı tomografi direkt radyografiye tercih edilir [7].

2.6.6 Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz

Kronik düşkünlük yaratan hastalık, diyabet, malnütrasyon, alkolizm, ileri yaş, uzamış kortikosteroid tedavisi gibi durumlar yatkınlık yaratmaktadır. Kronik öksürük, ateş, balgam, hemoptizi görülebilir. Radyolojik bulguları tek ya da iki taraflı konsolidasyon bölgeleri, plevral kalınlaşma ve opasitesi artmış nodüler bölgelerdir [8].

2.6.7. Santral Sinir Sistemi Aspergillozu

Akciğerlerden kan yoluyla yayılım sonucu gelişen ve İA olgularının %10-20'sinde görülen en ağır klinik tablodur. Genellikle allojenik kemik iliği naklinden sonra ve bazen de beyin ameliyatlarından sonra görülebilir. Konfüzyon, kişilik değişiklikleri, arteriyel tromboz sonrası gelişen infarktüse bağlı fokal nörolojik bulgular, felç ve BOS basıncında artış olabilir. Çoğunlukla mantar BOS'dan üretilemez. Tanıda bilgisayarlı tomografiden yararlanılabilir. Ancak bulgular özgül olmayıp tanı genellikle postmortem konulur [8].

2.6.8. Kutanöz Aspergilloz

Primer İA'nın hematojen yayılımı sonucu ortaya çıkar. Cerrahi yara ve yanık enfeksiyonu sonrasında da gelişebilir. Lezyonlar genellikle ekstremitelerde yerleşir. Eritematöz papül, püstül üstü siyah skarla kaplı tipik lezyonlar oluşur [6]

2.6.9. Göz Aspergillozu

Travmayla sekonder keratit gelişebilir. Endoftalmit nadiren görülen bir tablodur. İlaç bağımlıları, endokarditliler ve organ nakli yapılanlarda ya da direkt travmaya bağlı olarak veya hematogen gelişebilir. Gözde ağrı, fotofobi ve görme kaybı şeklinde belirtiler görülebilir.

Bunların dışında prostetik kapağı olanlarda ya da kalıcı intravenöz kateteri olanlarda ve ilaç bağımlılarında endokardit, kronik granülomatöz hastalığı olan çocuklarda osteomyelit, karaciğer, böbrek, dalak, gastrointestinal sistem enfeksiyonları gelişebilir [6].

2.7. Tanı Yöntemleri

İnvaziv aspergillozun genellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda geliştiği görülmektedir. Bu nedenle erken tanı ve ardından başlanacak tedavi önem taşımaktadır.

Akut enfeksiyonda hastaların %25-33'ünde hiçbir semptom görülmeyebilir. Klinik belirtiler çoğunlukla özgül değildir ve başka hastalıklarla karışabilir. Erken laboratuvar tanı genellikle konulamamaktadır [47].

Kesin laboratuvar tanısı, etkenin klinik örnekte direkt mikroskopi ve histopatolojik olarak görüntülenmesi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde tanımlanması ile konulmaktadır. Tam ve doğru bir laboratuvar tanı için, klinik tanı ile uyumlu örneklerin uygun zamanda ve uygun yerden alınarak uygun koşullarda laboratuvara hemen ulaştırılması gerekir [47].

Ancak mikroskobik inceleme ve kültür için bu örnekler, invaziv işlemlerle temin edilebilir. Tanısal işlemler çoğu zaman hastaların sitopenilerinden veya kritik durumlarından dolayı yapılamaz. Bu nedenle mantar yükü artmadan ve hasta ölmeden önce nadiren tanı konulabilir [18, 48].

Tanı için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerden yararlanılmaya çalışılmaktadır. Ancak standardizasyon eksikliği merkezler arasındaki karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. 2000 yılında yapılan ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents) kongresinde, Belçika'daki Avrupa Kanseri Araştırma Organizasyonu İnvaziv Fungal İnfeksiyon Çalışma Grubu (EORTC-IFICG) ile Bethesda Mantar Çalışma Grubu (NIAID-MSG) bir konsensus oluşturmuş ve bunun

sonucu 2002 Yılında invaziv fungal enfeksiyon tanımları yayınlanmıştır. Bu tanımlar ya da klavuz 2008 yılında güncellenerek standardize edilmiştir [49].

Tanımlamada üç grup (P-P-P) oluşturulmuştur:

- 1) Kanıtlanmış (proven)
- 2) Yüksek olasılıklı (probable)
- 3) Düşük olasılıklı (possible) invaziv fungal enfeksiyon.

Bu klavuza göre invaziv fungal enfeksiyon olasılığını arttıran durumlar 3 genel başlıkta incelenir [50];

- 1) Konak faktörleri
- 2) Klinik faktörler
- 3) Mikrobiyolojik faktörler

Kanıtlanmış (proven) İA; Steril klinik örneğin histopatolojik, sitopatolojik veya direkt mikroskopik incelemesinde *Aspergillus* hiflerinin görülmesi veya steril vücut bölgelerinden alınan örneğin kültüründe üreme olması

Yüksek olasılıklı (probable) İA; Konak faktörlerinden en az biri, klinik kriterlerden en az biri ve mikolojik kriterlerden en az birinin bulunması

Düşük olasılıklı (possible) İA ise; Konak faktörlerine ek olarak klinik kriterleri olan ancak mikrobiyolojik kriterlere sahip olmayan olguları ifade etmektedir.

Bu tanımlar sadece klinik ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.

EORTC-MSG (Avrupa Kanseri Araştırma Organizasyonu-Mantar Çalışma Grubu)'nin 2008'de güncelledikleri invaziv fungal enfeksiyon kriterleri Tablo 2.4'de görülmektedir.

Tablo 2.4. EORTC-MSG invaziv fungal enfeksiyon kriterleri [49]

1) Konak faktörleri

Nötropeni: 10 günden uzun süreyle ($0,5 \times 10^9$ nötrofil/L)

Allojenik kök hücre alıcısı olma

Kalıtımsal ağır immün yetmezlik sendromları (Kronik granülamatoz hastalık veya ağır kombine immün yetmezlik)

Son 90 gün içinde T hücre immünsüpresör tedavi almış olmak (Siklosporin, TNF α blokörü, spesifik monoklonal antikorlar, nükleozid analogları)

Uzun süreli (>3 hafta 0,3mg/kg/gün prednizolon eşdeğeri kortikosteroid kullanma, ABPA hastaları hariç)

2) Klinik kriterler**A) Alt hava yolları fungal hastalıkları**

Aşağıdaki BT bulgularından en az birinin olması

Nodül ve/veya halo belirtisi

Hava hilal belirtisi (air crescent), kavite

B) Trakeobronşit

Bronkoskopik analiz sırasında izlenen ülser, nodül, psödomembran, plak/kрут

C) Sinonazal enfeksiyon

Görüntülemde sinüzit izlenmesi, aşağıdaki bulgulardan en az birinin varlığı

Akut lokalize ağrı (göze doğru yayılan)

Üzeri siyah krutlu nazal ülser

Paranasal sinüslerden orbitayı da içine alan, kemiksi bariyerleri aşan orbitaya genişleme

D) Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu

Görüntülemde fokal lezyon ve/veya MR/BT'de meningeal kalınlıklaşma

E) Dissemine kandidiyazis

2 hafta içinde kandidemi epizodu ve ardından en azından 2 bulgudan biri

Oftalmolojik değerlendirmede progresif retinal eksuda

Karaciğer veya dalakta küçük hedef benzeri abseler (boğa gözü lezyonu)

3) Mikolojik kriterler**1)Direkt testler (sitoloji, direk mikroskopi, kültür)**

Balgam, BAL, bronş fırça ve sinüs aspirat örneklerinde mantar görülmesi

→Küf mantarını destekleyecek fungal elemanların bulunması

→Kültürde pozitiflik (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes* veya *Scedosporium* türleri)

2)İndirekt testler

Aspergillozis (Plazma, serum, BAL veya BOS'da galaktomannan antijeni saptanması)

Kriptokokkoz / Zygomikoz hariç serumda β glukan saptanması

İnvaziv aspergilloz genellikle immün yetmezliği olan hastalarda gelişerek mortalite ve morbititeyi artırmaktadır. Bu nedenle erken tanı, uygun tedavinin en kısa sürede başlanması için önemlidir. İnvaziv aspergillozda tanı; klinik bulgular, radyolojik ve laboratuvar verilerinin birleştirilmesine dayanmaktadır [18, 47].

Kesin tanısı, etkenin klinik örnekte direkt mikroskopi ve histopatolojik olarak görüntülenmesi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde tanımlanması ile konulmaktadır. Ancak hematolojik maligniteli hastalarda, trombositopeni, hipoksi ve genel durum bozukluğu nedeniyle biyopsi veya derin doku örnekleme genelde mümkün olmamaktadır [49].

Örneklerin toplanması ve saklanması

İA laboratuvar tanısında balgam, BAL, trakeal aspirat, akciğer biyopsisi gibi solunum sistemi ile ilgili örnekler, bunların dışında enfeksiyon odağına yönelik BOS, plevra, periton, sinüs ponksiyon aspiratı, yara, idrar ve nadiren kan gibi klinik örnekler de kullanılır. Kan kültürü *Aspergillus*'ların neden olduğu endokarditlerde anlamlıdır [13].

İA tanısında akciğer dokusu en değerli örnektir. Alınmasının zorluğu hasta profili nedeniyle çok sık kullanılmaz. Sinüs biyopsisi yapılmasının daha kolay olması nedeniyle tanıda daha sık kullanılır. Alınan örnekler laboratuvara hızla ulaştırılmalıdır. İdeal olanı örneklerin 2 saat içinde oda sıcaklığında saklanması ve gönderilmesidir. Klinik örnekten hemen kültür yapılamayacaksa 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, uzun süre saklanacaksa -20°C'de saklanmalıdır [13].

Aspergillus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında mikroskobik inceleme, kültür, histopatolojik inceleme, GM, BDG antijen aranması gibi serolojik testler ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır.

2.7.1. Mikroskobik İnceleme

Direkt mikroskobik yöntemlerin duyarlılığı yüksek ve kültüre göre daha hızlı ve düşük maliyetli olmalarına karşın özgülükleri de düşüktür. Diğer filamentöz

mantarlardan (*Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* ve *Scedosporium* gibi) *Aspergillus*'un kesin olarak ayırdedilememesi dezavantajdır [47].

Nativ preparat hazırlanması

Aspergilloz şüpheli klinik örnekler, öncelikle lam lamel arasında %10-25 potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinde bekletilerek hazırlanır. Bu yöntemle, klinik materyal içerisindeki doku ve hücre artıklarının saydamlaştırılarak mantar elemanlarının net görülmesi sağlanmaktadır. Taze preparatın mikroskopik incelenmesinde mantar sporları ve 45 derecelik açılma yapan hiyalen, septalı hiflerin görülmesi *Aspergillus*'lar için tipik özelliklerdir [13, 37].

Laktofenol pamuk mavisi ile boyama

Laktofenol pamuk mavisi (LFPM) hem bir kaplama solüsyonu hem de bir boyadır. Özellikle küf mantarlarındaki hif ve sporların incelenmesi amacıyla kullanılır. Laktik asit temizleyici ajan olarak görev yapar ve küf yapılarını koruyarak tespit eder. Fenol öldürücü etki göstermektedir. Gliserol kurumayı önler ve pamuk mavisi küf yapılarını boyayarak daha iyi görülmesini sağlar. Mantar yapıları mavinin farklı tonlarında boyanarak görülür. Örnekler doğrudan lam-lamel arası incelenebildiği gibi selofan bant yöntemi ile de incelenebilmektedir [13, 37].

Kalkoflor beyazı ile boyama

Floresan boyalardan 'Calcoflour White', 'Uvitex 2B' ve 'Blankophor' renksiz ve suda çözünebilen boyalardır. Bu boyama yöntemleri frozen kesitlerde parafinle kaplanmış dokularda, bronkoalveolar lavaj, korneal kazıntı gibi taze klinik örneklerde kullanılabilir. Kalkoflor beyazı, mantar hücre duvarındaki glukan ve kitini boyayarak görünmelerini sağlayan maddelerdir. %10-20 KOH ile kalkoflor beyazı karıştırılarak birlikte hazırlanırsa, floresan mikroskopta hifal yapılar daha net görünür hale gelir [47, 51].

Gram boyama

Klinik örneklerin rutin bakteriyolojik gram boyası ile boyanmasında *Aspergillus*'lara ait septalı hif ve konidiyalar gram pozitif boyalı olarak görünürler [13].

2.7.2. Histopatolojik İnceleme

Sitolojik boyalar, mantar boyaları ve floresan boyama yöntemlerinin kullanılmasının mikroskopik incelemenin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. Histopatolojik boyalarla, doku içerisindeki mantara ait septalı hifal yapılar ve konidiya gibi fenotipik özellikleri tanımlamak mümkündür. Histopatolojik incelemede biyopsi örnekleri kullanılabilir. Örnekleri Gomori'nin metanamin gümüş boyası (GMS), Periyodik asit-schiff (PAS) gibi yöntemlerle boyayarak doku içerisindeki hifal yapıları göstermek mümkündür. GMS ile mantar elemanlarını daha iyi boyamakla birlikte, PAS konak doku yapısını, hücresel yapıyı daha iyi göstermektedir, birbirinin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır [52, 53].

Klinik materyallerin mikroskopik incelemesinde ve doku biyopsi örneklerinde septalı hifal yapıların görülmesi ve mantar kültüründe de *Aspergillus* üremesi tanıyı desteklemektedir [47, 54].

Doku kesitlerindeki mantar hiflerine spesifik olarak bağlanan poliklonal veya monoklonal antikorların kullanıldığı immünohistokimyasal, immuno floresan ve in situ hibridizasyon yöntemleri de diğer yardımcı tanı yöntemleridir. Ancak poliklonal antikorların diğer mantar türleri ile çapraz reaksiyonlar vermesi ve monoklonal antikorların ise tanıda yetersiz kalması yöntemin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır [51].

Mantar türleri kültürde üretildiğinde etkenin, kontaminasyon ve kolonizasyon olasılıkları değerlendirilmelidir. Etkenin biyopsilerin histopatolojik incelemesinde de gösterilmesi enfeksiyonu kanıtlar [6, 13].

2.7.3. Kültür

Mikroskopik bulguların kültürde etkenin izolasyonu ile doğrulanması gerekmektedir. Konidyumlar havada çok miktarda bulunduğu için kontaminasyon riski olması nedeniyle üremeler dikkatle değerlendirilmelidir [55, 56].

Balgam, bronkoalveoler lavaj, sinüs ponksiyon aspiratı, akciğer doku biyopsisi gibi solunum yolu örnekleri yanında kan, yara, idrar örnekleri kültür için kullanılabilir örneklerdir. Kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kemik iliği örneklerinden yapılan kültürlerde *Aspergillus* nadiren ürer. *Aspergillus* türleri anjioinvaziv olmalarına rağmen tüm İA olgularının %10'undan azında kan kültürü üremesi mevcuttur. Solunum yolu kültürleri geç dönemde pozitifleşir ve duyarlılığı düşüktür. Balgam örneklerinin ancak %8-34'ünde, BAL örneklerinin ise %45-62'sinde üreme gözlenmektedir [35, 47].

Laboratuvara gelen klinik örneklerden izolasyon ve identifikasyon kültürleri yapılır. İzolasyon kültürlerinde *Aspergillus*'ların eşeysiz şekillerini, identifikasyon besiyerlerinde ise telemorf şekillerini görmek mümkündür. İzolasyon işlemlerinde bakteriyel kontaminantların üremesine engel olmak için gentamisin veya kloramfenikol ilaveli Sabouraud kanlı agar, Sabouraud dekstroz agar (SDA), Patates-dekstroz agar (PDA), beyin kalp infüzyon agar (BHI) inhibitör mould agar, mikosel ve mikobiyotik agar kullanılırken; üreyen *Aspergillus* cinsi mantarın türünün belirlenmesinde ise malt-extract agar, corn-meal agar veya Czapek agar'dan biri kullanılmaktadır [4].

Klinik örneklerin uygun bir izolasyon besiyerine ekimleri yapıldıktan sonra kültür plakları 25-30°C'de aerobik olarak, nemli ortamda, 3-4 hafta inkübasyona bırakılmaktadır. İlk hafta her gün, sonraki haftalarda haftada 2 gün üreme kontrolü yapılmalıdır. Bu süre sonunda üreme olmazsa kültür negatif olarak sonuçlandırılır. Hızlı üreyen bazı küf mantarlarının üremesini engellemek ve besiyerinin seçiciliğini arttırmak için besiyerlerine ilave edilen sikloheksimid, *Aspergillus* türlerinin üremesini inhibe edebilmektedir. Bu nedenle *Aspergillus* şüpheli örneklerin kültür ekimleri, sikloheksimid içermeyen besiyerlerine yapılmalıdır [4, 5].

Genel olarak *Aspergillus*'lar besiyeri yüzeyinde, 36-90 saat içinde kadifemsi veya pamuğumsu özellikte beyaz, sarı, sarı-yeşil ve kahverengi veya siyah renkte koloniler oluştururlar. *Aspergillus*'daki sporulasyon fazı, corn-meal ya da PDA' da, 30-37°C' de ve 36-48 saatlik inkübasyonlardan sonra gerçekleşmektedir. Ancak bazı türlerde sporulasyonun gerçekleşebilmesi için daha uzun sürelerle ihtiyaç duyulabilmektedir [36, 47].

Aspergillus türleri termotoleran olup, insanlarda hastalık oluşturan türler, birçok besiyeri vasatında hızla üreyerek kolonilerini oluşturabilmektedirler. Örneğin insanlarda invaziv enfeksiyona neden olan *A.fumigatus* 45°C’de bile üreyebilmektedir. Oluşturdukları kolonin rengi, büyüklüğü ve termotoleransı identifikasyonda yol gösterici olmaktadır. Kültürde üreyen koloniden hazırlanan laktofenol pamuk mavisini preparatında *Aspergillus*’lara spesifik septalı hif, konidiyoforun ucunda vezikül yapısı ve vezikülün üzerini kaplayan fiyalidler ve bunların ucundan çıkan konidiaların görülmesi tanı açısından önemlidir. Mikroskopik olarak konidiyum ve konidiyofor özellikleri türlerin tanımlanmasında kolaylıklar sağlamaktadır [46].

İzole edilen *Aspergillus*’un etken kabul edilebilmesi için [57]:

- Direkt incelemede hif yapılarının görülmesi,
- İzole edilen küfle direkt incelemenin uyumu,
- Aynı plakta birden fazla aynı tip mantar kolonisinin bulunması,
- Farklı örneklerde aynı küfün izolasyonu ve
- İzole edilen küfün 37 °C’de üreyebilmesi gereklidir.

2.7.4. Serolojik Yöntemler

Aspergillus’a ait antijen yapılarının tesbit edilmesine yönelik tanı testleridir. *Aspergillus* enfeksiyonlarının direkt tanı yöntemleri ile tesbiti her zaman mümkün olamamaktadır. Bunun nedeni ampirik ya da profilaktik antifungal kullanımı sonucu *Aspergillus* kültürünün negatif olması ya da kültürde üreyen *Aspergillus* türünün gerçekten enfeksiyon etkeni olup olmadığının değerlendirilememesidir. Antijen saptamaya yönelik birçok yöntem tanımlanmıştır. Sistemik *Aspergillus* enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek serolojik testler immüno difüzyon, ELİSA, radio immün assay (RİA), immün floresan antikor testi (İFAT)’dir [58].

Ancak hastalardan ardışık örnek alma zorunluluğu bu metodların duyarlılığını sınırlandırabilmektedir. Ayrıca atmosferden devamlı inhale edilen konidiaların inhalasyonuna bağlı olarak *Aspergillus* türlerine karşı tespit edilebilir düzeyde antikorların oluştuğu düşünülmektedir [36, 58].

İnvaziv aspergillozun serolojik tanısı; serum, idrar ve BAL gibi biyolojik sıvılarda dolaşımdaki antijenlerin gösterilmesine dayanmaktadır. İA’lu hastaların

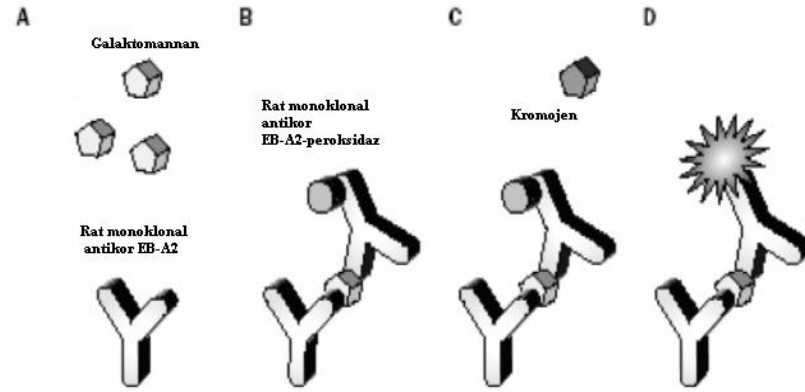
serumundaki antijenlerin varlığı ilk kez 1979 yılında gösterilmiş olmasına rağmen, bugüne kadar tanımlanan farklı antijen sayısı az sayıdadır [36].

Galaktomannan Antijen Testi

Galaktomannan; deneysel olarak enfekte edilen hayvanlardan ve İA' lu hastalardan elde edilen ilk antijen olup, dokuda *Aspergillus* türlerinin üremesi sırasında dolaşıma salınan bir hücre duvar polisakarididir. Stynen ve arkadaşlarınca geliştirilen sandviç ELISA yöntemi rat monoklonal antikoru EB-A2'yi kullanmaktadır (Platelia *Aspergillus* Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) [59].

Aspergillus enfeksiyonları nötropenik hastalarda invaziv seyrederek, özellikle damarsal yapılara karşı afinitesi vardır. *Aspergillus*'a ait hifal yapılar çevre damarları invaze eder, ürediği ortama GM antijeni salgılanır. GM antijeninin saptanması, sıçanlarda GM'ye karşı geliştirilmiş antikorlar sayesinde mümkün olmuştur. Bu antikorların hem tutucu hem de işaretleyici olarak kullanılmaları ile testlerin GM'yi yakalama eşikleri düşürülmüştür. Monoklonal anti-galaktomannan antikoru EB-A2, *Aspergillus* GM'sinin (1→5)-β-D galaktofuranozid yan zincirini tanıır. Bir GM molekülünde bir çok (1→5)-β-D galaktofuranozid epitopu olmasından yola çıkarak, monoklonal EB-A2 antikorunun hem yakalayıcı hem de peroksidaz ile işaretleyici olarak iki taraflı kullanıldığı sandviç ELISA yöntemi (Platelia® *Aspergillus*; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) geliştirilmiştir. Şekil 2.4'de GM antijeninin ELİSA yöntemiyle saptanması görülmektedir [31].

Bu yöntem için 300 µL serum gereklidir ve yaklaşık 4 saat içinde sonuç verilir. Test sonucu GM indeksi olarak ifade edilir. Pozitif sonuç için eşik ('cut-off') değer olarak 1.5, 1, 0.7 ve 0.5 değerleri kullanılmış; ABD Gıda ve Eczacılık Kurumu (FDA) tarafından tek serum örneğinde GM indeksi 0.5 pozitif değer olarak kabul edilmiştir [35, 59, 60].



Şekil 2.4. ELİSA yöntemiyle GM antijen saptanması

ELİSA dışında, RIA ve Lateks Aglütinasyon (LA) testleri de GM saptayan diğer yöntemlerdir. RIA ve LA testlerinde tespit limitleri (5-15 ng/ml) nedeni ile rutin kullanımları sınırlı kalmıştır. ELISA prensibi ile çalışan ve sensitivitesi oldukça yüksek olan yöntemle, test edilen serum örneklerindeki GM'nın 0,5-1 ng/ml'si saptanabilmektedir [61].

Serumda galaktomannan saptanması için ELISA testi standardize edilmiş olmakla birlikte BOS, idrar ve bronkoalveoler lavaj (BAL) gibi diğer vücut sıvılarında da antijen saptanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. BAL örnekleri ile yapılan araştırmalarda yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmektedir. Ancak bu örnekler için belirlenmiş standardize optik dansite indeksi bulunmamaktadır. Solunum yollarının *Aspergillus* spp ile kolonizasyonunun potansiyel yanlış pozitifliğe yol açabileceği ihtimali de gözönünde bulundurulmalıdır [62].

Kullanım sıklığının artmasıyla yanlış pozitif sonuçlar da ortaya çıkmıştır. Yalancı pozitiflik oranı yetişkinlerde %5-14 arasında değişirken, yenidoğanlarda %80 civarındır. Pediatrik hastalarda ve yeni doğanlarda yüksek yalancı pozitiflik nedeni anne sütünde ve formüla mamalarda yüksek konsantrasyonda bulunan *Bifidobacterium bifidum*'un çapraz reaksiyonu ya da onların salgıladığı lipoglikan (galaktofuranoz kalıntıları) ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir [63, 64].

Yoğun kemoterapi nedeniyle barsak endotelyumundaki hasar sonucu diyetdeki GM absorpsiyonu artabilir. Platelia *Aspergillus* GM ile *Penicillium* spp

arasında da çapraz reaksiyon gösterilmiştir. Fakat *Penicillium* türleri nadir insan patojenlerinden olduğundan klinikle çok az ilgili olarak görülmektedir. Ayrıca fungal orjinli ilaçlar örneğin; antibakteriyeller (ampisilin sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit) de yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. *Paecilomyces variotii* ve *Alternaria* spp. gibi diğer mantarlarla da çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Bakteriyemik hastalar ve reaktif otoantikorları olan hastalarda da yanlış pozitif reaksiyonlar gözlenmiştir. Plazmalit (sodyum glukonat) elektrolit solüsyonunun intravenöz uygulanması, siklofosamid kullanımı, GVHD, hemodiyaliz hastaları ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda yanlış pozitif antijenemi nedeni olarak kısa süre önce rapor edilmiştir [47, 61, 65, 66].

Galaktomannan antijen testinin pozitifliği İA tanısı için EORTC-MSG tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında bulunmaktadır. Bu testin kullanımını FDA tarafından 2003 yılında onaylanmıştır [47].

Birçok çalışmada farklı duyarlılık ve özgüllükte olduğu bildirilmiştir. FDA'ye göre özgüllük ve duyarlılık sırasıyla %80.7 ve %89.2'dir. Ancak birçok çalışmada özgüllük ve duyarlılıklar %23-100 gibi farklı aralıklarda bulunmuştur. Bu farklılıklar; alınan örneğin sayısı ve tipi (seri örnek alınması, kan, BAL) enfeksiyonun hangi zamanında alındığı, kabul edilen eşik değerlerin farklı olması, profilaktik yada ampirik antifungal tedavi ile ilişkilendirilmiştir [61].

Testin performansı hasta popülasyonuna ve altta yatan patolojiye göre değişebilir. Kronik granülomatöz hastalık ve solid organ transplantasyonu gibi durumlarda duyarlılık daha düşüktür. Nötropenik olmayan hastalarda testin duyarlılığı tipik olarak düşüktür (%15-30). Bu durumun dolaşımdaki GM düzeyinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Duyarlılığın değişken olmasının ikinci sebebi, profilaktik ya da ampirik antifungal tedavinin fungal yükü azaltarak duyarlılıkta azalmaya yol açmasıdır. Yetersiz örnekleme stratejileri klinik duyarlılığı düşürebilir. İA için risk altında olan hastalarda genelde haftada iki kez antijen düzeyinin değerlendirilmesi önerilmektedir [47, 67].

Genel olarak testin NPD'nin (%95'in üzerinde) yüksek olduğu ve İA tanısının dışlanmasında kullanılabileceği söylenebilir. GM testi klinik açıdan iki konuda yardımcıdır. Yüksek riskli hastalarda haftada iki kez serum örneklerinde GM antijeninin saptanması İA'a erken tanı konmasını sağlayabilir. Dolaşımdaki GM, İA

linik bulgularından ortalama 5-8 gün önce saptanabildiği, yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT)'de patolojik bulgular saptanmadan ortalama 7.2 gün önce GM pozitifliğinin saptanabildiği bildirilmiştir. *Aspergillus* menenjitli bir hastada kültür pozitifliğinden 45 gün önce BOS GM'nın pozitifleştiği bildirilmiştir. Testin diğer yararı ise negatif sonuç elde edildiğinde İA'ya benzer klinik bulguları olan hastalarda, aspergillozun geri planda düşünülmesini destekleyici veri sağlamasıdır. Bu durumda, kesin tanının konabilmesi için invaziv tanı yöntemleri gündeme gelmelidir [68, 69].

GM antijeni serumdan kısa sürede uzaklaştırıldığı için haftada iki veya daha fazla sıklıkta bakılması önerilmektedir. İki veya daha fazla ardışık serum örneğinin pozitif olması testin duyarlılığını artırmaktadır. Test erken tanıda olduğu kadar antifungal tedaviye klinik yanıt ve prognozun takibinde de yararlıdır. Dolaşımdaki GM konsantrasyonu fungal doku hasarıyla uyumludur ve klinik yanıtın olduğu olgularda antijen titresi azalmaktadır [70, 71].

Beta glukan antijen testi

Zygomycetes ve *Cryptococcus* türleri dışında bir çok saprofitik ve patojen mantar ve *Aspergillus*'un da dış hücre duvarında bulunan yapı (1-3)- β -D-glukan'dır. İmmünojen bir molekül olmamasına rağmen tanıda kullanılabilir. Bununla birlikte İA ve kandidozda ayrıca *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ve *Acremonium* türlerinin sebep olduğu daha az görülen fakat bağışık engelli hastalarda önemli olan türlerin tespitinde de etkili bulunmuştur [72].

Piyasada bulunan 3 ticari kitin de tanı sistemi, 'horseshoe crab'dan (Kuzey Amerika Atlantik sahilindeki bir artropod; atnalı yengeci) hemolenfinden kaynaklanan amebositlerde koagülasyon kaskadını aktive etme yeteneğidir. 1,3 β -D glukanın gösterilmesi için kolorimetrik yöntem tanımlanmıştır. Bu deneyin komponentleri, özgül olarak 1,3 β -D glukan duyarlı hemolenf pıhtılaştırıcı yolu tetikleyen faktör G ve bu proteolitik kaskadın son komponenti tarafından parçalanmış kromojen Leu-Gly-Arg-pNA tripeptidden oluşmaktadır. Bu deney β -glukanın pikogram düzeyinde miktarını ölçebilmekte ve İA sırasında bu polisakkaridin varlığını göstermek için kullanılabilir. GM'nın tersine normal olarak fungal hücreden salınmazlar [73].

Avrupada BDG saptanması için yaygın olarak kullanılan test Fungitell (Associates of Cape Cod Inc. East Falmount, MA)'dir. Bu kit dışındaki BDG testlerinin hematolojik maligniteli hastalarda kullanımı ile ilgili bilgi kısıtlıdır. Fungitell testi için eşik değerinin 60 veya 80pg/mL olarak tanımlanması önerilmiştir. Testin klinik değerlendirmelerde özgüllük ve duyarlılık değerleri çok iyi bulunmuştur (özgüllük %87-94, duyarlılık %77-89). Ardışık örnekler kullanıldığında testin özgüllüğünün arttığı görülmüştür. Pozitif test sonuçları elde edildiğinde doğrulama ve fungal patojenin tanımlanması için diğer yöntemlerin uygulanması gerekmektedir [35, 72, 73].

Testin en önemli dezavantajı *Aspergillus* türleri dışında *Candida* spp, *Fusarium* spp, *Acremonium* spp, ve *Pneumocystis jiroveci* gibi benzer hasta grubunda sık karşılaşılabilen invazif fungal enfeksiyona neden olabilen bazı türlerin duvar yapısında da bulunması, İA tanısında özgüllüğü kısıtlaması ve kit içeriğinin rutinde az sayıda hasta için kullanıma imkan vermemesidir. Ayrıca selüloz membran ile hemodiyaliz yapılarında, siroz hastalarında, albümin ya da immünglobülin ürünleri alanlarda ve abdominal cerrahi sonrası yanlış pozitiflikler bildirilmiştir [73]. Test 2004 yılında invaziv mantar enfeksiyonu teşhisi için FDA tarafından onaylanmış ve İA tanısı için EORTC tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında bulunmaktadır [73].

***Aspergillus* türlerine karşı oluşan antikorların saptanması**

Aspergillus antijenlerine karşı antikorların serolojik olarak gösterilmesi, iki aspergilloz formu olan aspergilloma veya ABPA'un tanısında faydalı olmaktadır. Her iki tabloda da mantarların dokuda üreme yetenekleri çok sınırlı olmasına karşın, organizmaya karşı güçlü bir humoral yanıt görülmektedir. Bu amaçla, klinik laboratuvarlarda en çok çift yönlü immüdiffüzyon, counter immünelektroforez, ELISA ve RAST yöntemleri kullanılmaktadır. Kronik pulmoner aspergillozun tanısında *Aspergillus*'lara karşı spesifik antikor tanımlanması kullanılabilir. Ancak akut İA tanısında değer taşımadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Kanıtlanmış invazif aspergillozlu hastaların sadece 1/3'ünde antikor saptanabilmektedir [36].

***Aspergillus* metabolitlerinin saptanması**

Aspergillus'lar neden oldukları enfeksiyonlar sırasında çeşitli metabolitler üretirler. Bunlardan en iyi bilinenler metalloproteazlar, fosfolipazlar, D-mannitol ve gliotoksindir. Üzerinde en çok araştırma yapılan ve en eski bilinen D-mannitol ölçüm yönteminin zorluğu klinik kullanımını sınırlamaktadır. Mikotoksin başta olmak üzere diğer metabolitler araştırma aşamasında olan yöntemlerdir [41, 47].

2.7.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

Direkt mikroskopi ve kültürü içeren geleneksel tanı yöntemleri ile mantarın üretilmesi altın standart iken kültür yöntemlerinin zaman alıcı olması, enfeksiyon bölgesinden örnek almasının zor invaziv işlemler gerektirmesi, alınan örneklerde kültür pozitifliğinin sınırlı sayıda olması, antijen tespiti ile ilişkili duyarlılık problemlerinden dolayı İA tanısında yeni yöntem arayışlarına yol açmıştır. Bu nedenlerle nükleik asit tespitine dayalı moleküler yöntemler gündeme gelmiş, klinik kullanımları maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı nedeni ile sınırlı olmakla beraber bu yöntemler giderek önem kazanmaktadır [7, 8].

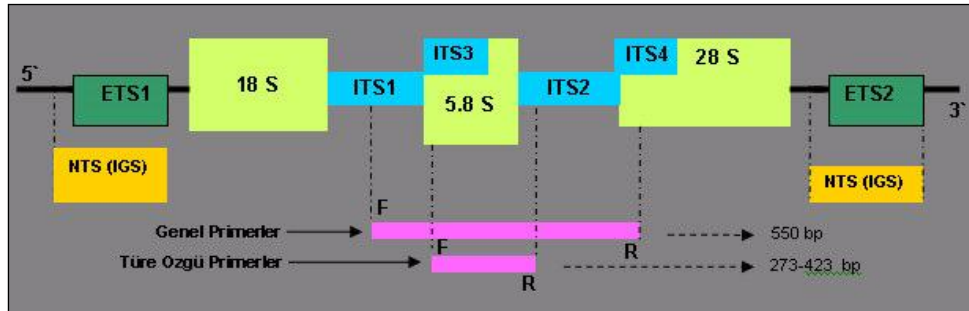
Moleküler yöntemler kan ve idrar gibi invaziv olmayan yöntemlerle alınan örneklerde nükleik asidi belirleyerek biyopsi ve bronkoalveoler lavaj gibi invaziv yöntemlere ihtiyacı azaltır.

Fungal DNA'nın saptanması, antikor saptayan testlere göre immün sistem fonksiyonundan bağımsızdır ve antikor yanıtı oluşmadan önce erken tanıyı sağlayabilir. Moleküler testlerin diğer bir avantajı, birden fazla etkenin neden olduğu enfeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanımlayabilmeleridir.

PCR, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Duyarlılığı ve özgürlüğü yüksektir. İA tanısında duyarlılığının %79–100, özgüllüğünün %81–93 olduğu bazı çalışmalarda bildirilmektedir [81,82].

Moleküler yöntemler sadece klinik örnekten mantarı tanımlamak için değil ayrıca tür tayini, ilaç direnci ve epidemiyolojik tiplendirme amacıyla da kullanılmaktadır. Ancak klinik örneklerde mantar DNA ve RNA'sını ekstrakte edici standart prosedürlerin olmaması testin duyarlılığını azalttığı bazı yayınlarda bildirilmektedir.

Moleküler tanıda, hedef bölge için mitokondriyal ve ribozomal DNA genleri gibi çok kopya sayılı genler daha fazla tercih edilmektedir. Ancak mitokondriyal DNA genleri, ribozomal DNA genlerine göre daha fazla değişkenlik göstermeleri nedeniyle tür ve cins düzeyindeki tanımlamalar için uygun görülmemektedir. Moleküler teknikler, fenotipik yöntemlere göre türleri daha iyi ayırabilmektedir [74]. İnvaziv fungal infeksiyonları içeren çalışmalarda değişik hedefler kullanılmış olmakla birlikte, son yıllarda ribozomal DNA gen bölgesi ümit veren bir hedef olarak görülmektedir. Ribozomal DNA gen bölgesi 18S geni, 5.8S geni ve 28S geninden oluşur ve bunlar sırasıyla ITS1 (internal transcribed spacer 1) ve ITS2 bölgeleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Bütün mantarlarda ortak 18S ve 28S rRNA geninin korunmuş dizisi için spesifik pan-fungal primerler klinik örneklerde patojen mantarların tespitinde kullanılmaktadır. Literatürde 18S rRNA gen bölgesini hedef alan çalışmalara daha sık rastlanılmaktadır [75, 76].



Şekil 2.5. Fungal PCR'da kullanılan rRNA bölgeleri [77]

İA'un moleküler tanısına yönelik literatürde klasik PCR, nested PCR, gerçek zamanlı PCR, PCR-EIA, RT-PCR (Reverse Transkriptaz PCR), Multiplex PCR ve insitu hibridizasyon gibi birçok yöntemle başvurulmuştur [78].

PCR'ın gerçekleşmesi için reaksiyon tüpünde aranan mikroorganizmaya özgül primer dizileri, DNA zincir sentezinde kullanılacak nükleotitler (A, G, C, T), nükleotitlerin komplementer bağlanması için bir ko-faktör olan Mg^{+2} iyonları, Taq polimeraz enzimi ve enzimin tamponu bulunmalı ve nükleik asit aranacak örnek de eklenmelidir. İn vitro DNA çoğaltması için gerekli sıcaklık kontrolü "thermal cycler" denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir. PCR üç değişik

sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir [79].

İlk basamak denatürasyondur ve 94°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70°C arasındadır. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72°C'ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır.

Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık altında görüntülenir.

Elektroforez aşamasının ortadan kaldırılarak işlem süresinin kısaltılması ve PCR'in kapalı bir sistem içinde daha az kontaminasyon riskine maruz bırakılması amacıyla yarı otomatize sistemler geliştirilmiş ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemde cihaz içinde işaretli primerler ile gerçekleştirilen PCR sonrası çoğaltılan ürünler ELISA formatıyla saptanmaktadır.

Geleneksel PCR ve PCR+ELISA formatlarında yapılan kantitasyon "end-point kantitasyon" şeklindedir. Bu yöntem ilk örnekteki mikroorganizma miktarını saptamakta çok sağlıklı bir yaklaşım değildir. Sağlıklı kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, hızla sonuca ulaşmak, özgüllüğü yükseltmek ve aynı anda çok sayıda klinik örneği çalışabilmek için real-time PCR yöntemi geliştirilmiştir [79].

Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüpte gerçekleşmektedir. Hedeflenen bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre

içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi pratik bir yöntem haline getirmiş, kontaminasyon riski de azalmıştır. Kantitatif sonuç verir, reaksiyonun optimizasyonu kolaydır.

Real-time PCR’da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir. Bunlardan birincisi özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I’dir.

Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA’nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA’ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile mi oluştuğu, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılır.

Çoğaltılan hedefin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli problemler kullanılır. Belirleme yöntemi olarak özel boylarla işaretli problemlerin kullanıldığı FRET (Fluorescens Resonance Energy Transfer), Taqman ve “Molecular Beacons”, Scorpions®, Amplifluor™ gibi yöntemler ya da SYBR Green®, etidyum bromür gibi özgül olmayan şelat edici boyalar kullanılır [79].

Moleküler yöntemlerde plazma, serum, doku örnekleri, BAL, balgam gibi çok çeşitli klinik örnekler kullanılmıştır. İlk çalışmalar DNA’nın BAL’dan elde edilmesine yöneliktir

Moleküler tanıda hem yalancı pozitifliklere hem de yalancı negatifliklere rastlanılmaktadır. Konidiyumların havada yoğun olarak bulunmasından dolayı yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilir. Sağlıklı kişilerden elde edilen BAL örneklerinin %25 kadarı PCR ile pozitif çıkabilmektedir. Kan örneklerinin steril koşullarda hava geçirmeyen tüplere alınması gerekmektedir. Ancak laboratuvar ortamında amplikonlara bağlı kontaminasyonlar da gelişebilmektedir [35, 36]. Bu nedenlerden dolayı DNA eldesi sırasında negatif kontrolle çalışılması otomatik ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması ve amplifikasyon için gerçek zamanlı PCR yönteminin tercih edilmesi önerilmektedir [80].

Prospektif çalışmalarda olumlu sonuçlar rapor edilmesine rağmen standardizasyonun hala sağlanamamış olması yaygın kullanımını sınırlamaktadır.

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, kullanılan amplifikasyon yönteminde başarısızlık gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca sonuçların yorumlanması da deneyim gerektirmektedir [80].

PCR temelli amplifikasyona dayanan teknikler klinik örneklerde genellikle 1-10 fentogram (1- 5 cfu/ml) mantar DNA'sını saptayabilmektedir. Moleküler testlerin yalancı pozitiflik ve negatiflik problemleri nedeniyle birden fazla örnekte yapılması ve sıklığının da haftada iki kez olması gerektiği vurgulanmıştır. Klinik bulgular oluşmadan ortalama 9 gün önce pozitifleştiği bildirilmektedir [81, 82].

Literatürde tanımlanmış protokollerde standardizasyonun olmaması nedeniyle PCR tekniği, EORTC/MSG'nin tanımladığı klasik invaziv mantar enfeksiyon tanı kriterleri arasında yer almamaktadır.

Moleküler yöntemlerin en önemli avantajları yaklaşık 4-6 saat içinde sonuç verebilmeleridir [35].

Standardizasyon eksikliğine, bildirilen farklı duyarlılık ve özgüllük oranlarına rağmen moleküler yöntemler erken tanının önemli olduğu İA tanısında önemli bir yere sahip olacak gibi görünmektedir.

Bununla birlikte çeşitli küf mantarlarını hedefleyen yeni moleküler yöntemlerin de önümüzdeki yıllarda rutinde laboratuvarlarda uygulanması beklenmektedir. Hibridoma teknolojisini kullanan *Aspergillus* spesifik monoklonal antikorların kullanıldığı yöntemle beta glukan ve GM antijen testine benzer duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiştir [56].

2.7.6. Radyolojik Tanı Yöntemleri

İA'da etkenin giriş yeri genellikle akciğer olmasına rağmen akciğer grafisi çoğunlukla yeterli bilgi vermez ve çoğu zaman normal olabilir. Akut *Aspergillus* bronkopnömonisinde küçük yama şeklindeki infiltratlar akciğer grafisi ile tespit edilemeyebilir.

Enfeksiyon alanının radyolojik olarak görüntülenmesinde yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT) direk grafiye oranla daha duyarlı bir yöntemdir. Akciğer, sinüs ve beyinde İA'dan şüpheleniliyorsa, tanının düşünüldüğü

andan itibaren yapılan YRBT veya magnetik rezonans görüntüleme (MR) yöntemleri ile tanı için geçen zaman azaltılabilir. MR özellikle serebral aspergillozda kullanılır [83].

İA'da erken BT bulguları tek veya çoklu nodül ve halo belirtisidir. Nodül ve çevresinde kanama alanına bağlı olarak ortaya çıkan, nodülden daha az yoğunlukta infiltrasyonla çevrili alanın olması (buzlu cam alanı olarak tanımlanan halo belirtisi) erken tanı ve tedavide önemlidir. Halo belirtisi semptomlar başlamadan yaklaşık 10 gün önce saptanabilmektedir Erken dönem bulgularından yaklaşık bir-iki hafta sonra kavitasyon ve hava-hilal belirtisi görülmektedir [84].

Hava-hilal belirtisi (air crescent sign) nodülde nekroz ve nekrotik akciğer dokusunun komşu akciğer parankiminden ayrılmasıyla nodül içinde hilal şeklinde saydam alan oluşumuyla karakterizedir. Hava-hilal belirtisi genellikle nötropeniden çıkış döneminde artmış inflamatuvar yanıtla birlikte görülür ve geç dönem bulgusudur. Uzun süreli nötropenik ateşi olan hastalarda erken dönemde rutin olarak çekilen YRBT'ler ile İA'nın erken dönemde saptanabileceği ve başlanacak etkili antifungal tedavi ile mortalitenin azaltılabileceği gösterilmiştir [60].

Yapılan çalışmalarda halo belirtisinin görülme sıklığı %25-95 arasında değişmektedir. Bu radyolojik bulgular İA'yı öncelikle düşündürmekle beraber sadece bu hastalığa özgü değildir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Nocardia* türlerinin yanı sıra, *Zygomycetes*, *Fusarium* ve *Scedoporium* türleri gibi diğer anjioinvaziv filamentli mantarlara bağlı enfeksiyonlar da halo işaretine ve aspergilloz için tanımlanan diğer radyolojik görüntülere yol açabilir. YRBT'nin radyasyon dozu riski hastaların İA şüphesi ve yöntemin faydası gözönüne alındığında daha az önemli olmaktadır [83-85].

Ayrıca İA'da tabanı plevraya oturmuş kama şeklinde konsolidasyonlar izlenebilir. Nadiren mantar damarları invaze etmeden hava yolunu tutabilir. Bazal membran derinlerine ilerleyen enfeksiyon sonucunda sentrilobüler nodüller, konsolidasyonlar (lober, segmental, subsegmental, peribronşial), buzlu cam dansiteleri görülebilir. YRBT'deki patolojik görüntülerin İA'a özgül olmayabileceği de gözönünde bulundurulmalıdır [83].

2.7.7. Hayvan Modelleri

İnvaziv aspergilloz fareler, tavşanlar, sıçanlar, domuzlar, inekler, ördekler ve maymunlarda gösterilmiştir. *Aspergillus* çalışmalarında hayvan modelleri, antifungal ilaçların etkinliğinin test edilmesi, tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi ve enfeksiyonların patogenezinin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır [86].

2.8. Tedavi

İnvaziv aspergilloz olgularında tedavinin başarısı erken tanı, erken agresif sistemik antifungal tedavi ve immün yetmezliğin düzeltilmesine bağlıdır. *Aspergillus* türleri arasında antifungal ajanlara direnç giderek artmaktadır. İlaç seçiminde en önemli kriter fungisidal veya fungistatik ajanların seçimidir [87].

Tedavi yaklaşımları ise;

1. Etkenin tanımlanmasını gerektiren “**direk terapi**”
2. Yüksek riskli hastalarda hastanın semptom, bulgu ve laboratuvar verilerine dayanan “**preemptif terapi**”
3. Yüksek riskli hasta gruplarında geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye rağmen düşmeyen ateş varlığında “**ampirik terapi**”
4. Yüksek riskli hasta grubunda İA önlenmesine yönelik “**profilaksi**”

Genellikle direk terapi, diğer tedaviler başladıktan sonra gündeme gelmektedir. Profilaksi özellikle uzamış nötropenisi olan veya HKHN yapılan hastalarda uygulanmaktadır.

Ampirik tedavide ise, gerçekte enfeksiyonu olmayan hastaların antifungal tedavi alma riski mevcuttur. Fakat klinisyen genellikle bu tedaviyi tercih etmektedir. IDSA 2011 klavuzunda da preemptif yaklaşım yüksek riskli nötropenik olgular için ampirik tedaviye alternatif olabilir denilmektedir. Preemptif tedavi gereksiz antifungal kullanımını azaltır. Daha az maliyet, yan etki ve toksisiteyi hedefler. Ateş olmadığında da erken tedavi olanağı sağlar.

İA tedavisinde kullanılacak ilaçlar; amfoterisin B, lipid kombinasyonları, azol türevleri ve ekinokandin türevleridir (kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin)

Poliyen grubu ilaçlardan amfoterisin B deoksikolat 1950’li yıllarda kullanıma girmiş, İA tedavisinde onaylanmış standart ilaçtır. İA için önerilen tedavi dozu 1-1.5

mg/kg/gündür. Başarılı tedavi için ilk iki hafta yüksek doz verilmesi, cevap alınmazsa başka bir ilaca geçilmesi önerilmektedir. Amfoterisin B'ye bağlı gelişen toksisiteyi azaltmak için amfoterisin B'nin lipid ve lipozomal formülasyonları kullanılmaktadır. Bu ajanlar daha az nefrotoksiktir fakat maliyetleri daha yüksektir [88].

Azol türevlerinden vorikonazol *Aspergillus*'a karşı fungisidal etkilidir. En önemli yan etkisi siklosporin, takrolimus ve sirolimus gibi bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar arasında görülen etkileşim ve vorikonazol kullanan hastaların yaklaşık %30'unda ortaya çıkan görme bozukluklarıdır. Mayıs 2002'de FDA tarafından İA'da başlangıç tedavisi olarak onay almıştır Bir diğer azol türevi olan itrakonazol ve yeni azol türevlerinden posakonazolün İA'da kurtarma tedavisinde yaklaşık %40 civarında etkin olduğu gösterilmiştir. 2006'da FDA onayı almıştır.

Ekinokandin grubundan kaspofungin asetat intravenöz olarak günde tek doz kullanılan fungisidal etkili ilaçtır. Şubat 2001'de FDA tarafından diğer tedavilere yanıtız veya tolere edemeyen İA olgularında kullanımı onaylanmıştır [89].

İA' un yüksek mortaliteye sahip olması ve eldeki ilaçlarla tam olarak tedavi edilememesi nedeniyle kombine ilaç kullanımı gündeme gelmiştir. Azol ve ekinokandinler hücrenin farklı bölgelerini (hücre membranı ve hücre duvarı) hedef aldıklarından vorikonazol ve kaspofungin kombinasyonu bazı olgularda kullanılmaktadır [90].

Nötropeni, İA için en önemli predispozan faktörlerden biridir ve hastalığın prognozunu olumsuz yönde etkiler, ancak İA' u olan nötropenik hastalarda bağışıklık sisteminin düzeltilmesi için koloni stimulan faktör kullanımı veya lökosit transfüzyonu uygulanması rutin kullanımı önerilen yaklaşımlar değildir. IDSA klavuzu genel olarak minimum 6-12 haftalık bir tedavi süresini önermekte, immüsupresyon devam ettiği müddetçe, lezyonlar tamamen gerileyene kadar tedavinin devamını gerekli görmektedir [89].

2.9. Mortalite

Tanı ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen aspergilloz halen mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Genel mortalite oranları %60-90 arasında olup, bu oran altta yatan hastalığa, enfeksiyon bölgesine, antifungal tedavi etkinliğine bağlı olarak

değişmektedir. Son yıllarda Avrupa ve Amerika'daki hematoloji ve KİT servislerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir [20].

2.10. Ekonomik Yük

Hastanede yatışın uzaması, ampirik olarak verilen ya da gerekmediği halde uygulanan antifungal tedavi ve yan etkileri ekonomik açıdan ek yük oluşturmaktadır. Bir çalışmada erken saptanmış aspergilloz ile ortalama hastane masrafında azalmanın 62426 \$ olduğu, farklı bir çalışmada ise primer veya sekonder aspergilloz tanısı almış hastalarda ortalama hastane masrafının 96731 \$ olduğu belirtilmiştir. Bu veriler de İA'un erken tanısının ve uygun zamanda etkili antifungal tedavinin hem klinik hem de ekonomik açıdan yararını göstermektedir [48].

2.11. Korunma

İA enfeksiyonlarında mortalite ve morbidite oranları yüksek olduğundan risk altındaki hastaların *Aspergillus* sporları ile temas etmesinin önlenmesi hastalıktan korunmada esastır.

Nötropenik hastalarda amfoterisin B nazal spreyi sinüs ve solunum yolu kolonizasyonunu önlemede yararlı bulunmuştur. 2003 ve 2007 yıllarında "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)", nozokomiyal *Aspergillus* enfeksiyonlarını önlemek için bir enfeksiyon kontrol stratejisi önermiştir. Bu strateji, sadece ciddi nötropenisi olan HKHT alıcılarının 'koruyucu ortam' (protective environment, PE) olarak adlandırılan tek kişilik pozitif basınçlı odalarda yatırılmasını önermektedir. Bu odalarda HEPA filtresine sahip ve > 12/saat hızında hava değişimi yapan havalandırma sisteminin bulundurulması ve toz birikimini azaltmak için daha sık çevresel temizlik yapılması önerilmektedir. Ayrıca HKHT alıcılarına, inşaat çalışmaları sırasında koruyucu ortamın dışına çıktıklarında, solunum önlemleri (N95 maske kullanımı) uygulanması önerilmektedir [24, 91]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 31.05.2011 tarihinde, 07 sayılı karar ile onaylandı ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Hastalar ve Örnekler

Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Servisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde takip edilen invaziv aspergilloz açısından risk taşıyan hematolojik malignitesi olan febril nötropenik hastalar çalışmaya dahil edildi. Bu hastalardan nötropenik oldukları dönemde ateş yükselmeye başladığında ve ateş devam ettiği sürece haftada iki kez olmak üzere periferik kan örnekleri toplandı.

Nötropenik olgular: Nötrofil sayısının $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olması nötropeni ($0,5 \times 10^9/\text{L}$), $100/\text{mm}^3$ 'ün altında olması derin nötropeni olarak tanımlandı

Febril nötropeni: Nötropenik bir hastada ateşin bir kere $38,3^\circ\text{C}$ 'nin üzerine çıkması ya da 1 saat süreyle 38°C ya da üzerinde ateş olması olarak tanımlandı.

Prospektif olarak çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler, İA için risk faktörü olan altta yatan hastalıkları, uygulanan kemoterapi rejimi, antibakteriyeller, antifungaller, kök hücre nakli varlığı gibi veriler sorgulandı. Hasta ziyaretleri ile hastaların vital bulguları, yeni gelişen belirtileri, klinik ve laboratuvar bulguları izlendi. Klinik örneklerindeki üremeler ve görüntüleme yöntemleriyle elde edilen sonuçlar kaydedildi. Hasta izlemi çalışmamız süresince hastaların eksitus veya taburcu olmalarına kadar sürdürüldü (Ek 1, Ek 2).

Klinik olarak hastaların sınıflandırılmasında EORTC'nin belirlediği kriterler kullanıldı. Bu sınıflamaya girmeyen ve İA açısından risk faktörü taşıyan hastalar ise İA açısından riskli grup olarak tanımlandı. İA'ü düşündüren klinik bulgusu, ateş ve nötropenisi olmayan hematolojik maligniteli veya anemili hastalar ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

Bu kriterlere göre hastalar kanıtlanmış (proven), yüksek olasılıklı (probable) ve düşük olasılıklı (possible) olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Hastalardan alınan kan örnekleri serumlarına ayrıştırılarak galaktomannan antijen testi uygulandıktan sonra PCR uygulanmak üzere -70°C 'de saklandı

3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- Sınıf II biyogüvenlik kabini
- Hassas terazi
- Distile su cihazı
- Soğutmalı mikrosantrifüj
- Vortex
- Isı bloğu
- -80°C'lik derin dondurucu
- +4°C'lik soğutucu
- Işık mikroskobu
- Dijital fotoğraf makinesi
- Yatay çalkalayıcı
- pH metre
- Mikrodalga fırın
- Mikropipet seti ve pipet uçları
- Real-time PCR cihazı (Rotorgene Q, QIAGEN, ABD)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems, Veriti™, ABD)
- Elektroforez tankı
- Elektroforez güç kaynağı
- Spektrofotometre (Elx800, BioTek, ABD)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

- Tris-hidroklorid
- Etilen diamin tetra asetik asit disodyum salt dihydrate (EDTA)
- Etanol
- 10x PCR Buffer

- dNTP set
- Taq DNA Polimeraz
- DNA, RNA içermeyen su
- Agaroz
- Steril Distile su
- 100 bp Moleküler Ağırlık Standardı (size marker)
- Orange G
- Etidyum bromid
- Panfungal primerler (ITS 1 ve ITS 4)
- Platelia® *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa)
- Fungal DNA ekstraksiyon kiti (Qiap DNA mini kit, QIAGEN)
- Real-time PCR kitleri
(*Myconostica MycAssay Aspergillus* PCR, UK
Primer design™ Genesig kit, Southampton, UK)

3.2.3.Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

10X Tris Asetik asit EDTA (TAE) Tamponu Stok Solüsyonu

Tris Base 24.2 g

Glasiel asetik asit 5.71 ml

0,5 M EDTA 10 ml

Kimyasallar tartılarak distile su ile eritilmiş ve pH 8,0'e ayarlanmıştır. Distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak, oda sıcaklığında saklanmıştır.

Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TAE)

10x TAE tamponu stok solüsyonundan alınarak distile su ile dilüe edilip 1X TAE tamponu haline getirilmiştir, elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankında kullanılmıştır.

3.3. ELİSA Yöntemi ile *Aspergillus* Antijeninin Aranması (Galaktomannan Antijen Testi)

Platelia®*Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa) serumda galaktomannanı saptayabilen immünoenzimatik sandviç mikrokaplama yöntemidir. Testte tavşan monoklonal antikorları EBA-2 kullanılır. Test 0.5-1 ng/ml galaktomannanı saptayabilecek duyarlılıktadır.

3.3.1. Testi Uygulamadan Önce Yapılacak İşlemler

a-ELİSA mikropleyti paketinden çıkarılıp oda ısısında 15-20 dakika bekletildi.

b-Yıkama solüsyonu (Tris NaCl Ph 7,4 buffer, %1 Tween 20 ve %0.01 sodyum metiolat) distile su ile 10 kat sulandırıldı.

c-Kontrol serumları (pozitif, negatif ve eşik serumu) 1 ml steril su ile sulandırılıp iyice karıştırıldı.

d-Konjugat (peroksidaz ile işaretlenmiş anti-galaktomannan monoklonal antikorları) kullanıma hazır haldeydi.

e-Serum işleme solüsyonu (EDTA asit solüsyonu) kullanılmaya hazır haldeydi.

f-Substrat buffer (sitrik asit, sodyum asetat, pH 5.2, %0.009 hidrojen peroksit ve %4 dimetilsülfoksit) kullanıma hazır haldeydi.

g-Kromojen solüsyonu tetrametilbenzidin içermektedir ve substrat buffer ile 50 kat seyreltildi.

h-Reaksiyonu durdurma solüsyonu 1.5 N sülfirik asit içermektedir ve kullanılmaya hazır haldeydi.

3.3.2. Testin Uygulanışı

a-Steril ependorf tüplerine 300 µl serum ve 100 µl serum işleme solüsyonu konulduktan sonra iyice karıştırıldı ve 100°C' de 3 dakika bekletildi.

b-10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra ve üstteki sıvı kısım işleme alındı.

c-Aynı işlemler kontrol serumları için de yapıldı.

d-Serumların üstteki sıvı bölümünden 50 µl ve konjugattan 50 µl çukurlara konuldu.

e-ELİSA plağının üzeri yapışkan film ile kaplandı.

f-37°C' lik etüvde 90 dakika bekletildi.

g-ELISA plağından yapıştırıcı film çıkarılıp yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.

h-ELISA plağında yıkama solüsyonunun kalmamasına dikkat edildi.

i-Hızlı bir şekilde ve direk ışıktan korunarak daha önce karışımı yapılan substrat-kromojen solüsyonundan 200 µl eklendi.

j-Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletildi.

k-Her çukura eşit zamanlı olarak 100 µl reaksiyon durdurma solüsyonundan eklendi.

l-Sonuçlar 30 dakika içerisinde, 450 nm (referans aralığı 620 nm) dalga boyunda optik okuyucuda okundu. (Elx800, BioTek, ABD).

3.3.3. Sonuçların Hesaplanması ve Yorumlanması

a-Cut-off değeri eşik kontrol serumunun optik dansitesi olarak belirlendi.

b-Her serum için indeks hesaplandı:

İndeks=örneklerin optik dansitesi/eşik serumun optik dansitesi

İndeks \geq 0,5 pozitif olarak değerlendirildi.

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

$0.3 \leq OD \text{ kontrol eşik serum} \leq 0.8$

Pozitif indeks= $OD \text{ pozitif kontrol} / OD \text{ kontrol eşik serum} > 2$

Negatif indeks= $OD \text{ negatif serum} / OD \text{ kontrol eşik serum} < 0.4$

3.4. *Aspergillus* DNA'sının PCR ile Araştırılması

1) İlk aşamada toplanan örneklerden DNA izolasyonu yapıldı.

2) İki farklı real-time PCR testi;

Aspergillus DNA'sını tespit etmek üzere standardize edilmiş bir ticari real-time PCR kiti (Mycassay *Aspergillus* PCR) ile Primer Design firması tarafından in-house olarak hazırlanmış bir real-time PCR mixi ile elde edilen DNA'ya real-time PCR uygulandı.

3) Ekstrakte edilen DNA termal cycler'da çoğaltılarak jel elektroforez işlemi uygulandı.

- 4) Bu yöntemlerle serum örneklerinde *Aspergillus* DNA'sı varlığı araştırıldı.

3.4.1. Ticari Kit ile DNA İzolasyonu

Qiagen firmasına ait Qiamp DNA Mini kit DNA izolasyonu için kullanılmıştır. DNA izolasyonu küçük modifikasyonlarla kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

Ön Hazırlıklar:

1. Isı bloğu 56°C'ye ayarlandı.
2. Örnek sayısı kadar adet ependorf, gruplar halinde numaralandırıldı.
3. Çalışma adedi kadar spin kolon çıkarıldı.
4. Yıkama solüsyonu 1 (AW-1)'a 160 ml etanol, yıkama solüsyonu 2 (AW-2)'ye 125 ml etanol eklenerek, hazır hale getirilir. Kapakları işaretlenir
5. Örnekler vortexlenir,

Çalışma:

1. 200'er µl örnek, ilk ependorflara alınır.
2. Örneklerin üzerlerine 200'er µl Buffer AL (Lysis Buffer) ve 20'şer µl proteinaz K eklendi.
3. Ependorfların kapakları kapatılıp, 3-5'er sn. vortexlenip, spin santrifüjlendi.
4. Santrifüjlenen örnekler, ısı bloğunda (56°C'de) 15 dk inaktivasyona bırakılıp. ısı bloğundan alınan örneklerin üzerlerine etanolden 200 µl ilave edildi.
5. Vortex ve spin santrifüj yapıldı.
6. Daha sonra, ependorflardaki karışımların tamamı spin kolonlara aktarıldı.
7. Tüm spin kolonlar, 8000 Rpm'de 1 dk santrifüjlendi.
8. Bu sırada yeni boş koleksiyon tüpler dizildi.
9. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı.
10. AW-1'den 500 µl filtre kısımlarına eklenip, 8000 Rpm'de 1 dk çevrildi.
11. Bu sırada yeni boş koleksiyon tüpler dizildi.
12. Santrifüjden çıkan tüplerin alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı.
13. Filtre kısımlarının üzerlerine 500'er µl AW-2 eklendi.
14. Tüm spin kolonlar, 14.000 Rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Bu sırada yeni boş koleksiyon tüpleri dizildi.

15. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler boş spin kolonlara alındı.
16. Tüm spin kolonlar, 14.000 Rpm'de 1 dk boş olarak santrifüj edilir. Bu sırada yeni boş ependorflar dizildi.
17. Santrifüjden çıkarılan tüplerin alt kısımları atılıp, yeni ependorflara filtre kısımları yerleştirildi.
18. Tüplerin filtre kısımlarına 50 µl Elüsyon Buffer (Buffer AE) ilave edildi.
19. Tüm ependorflar, (kapakları içe gelecek şekilde) santrifüje dizilerek, 8000 rpm'de 1 dk çevrildi.
20. Santrifüjden sonra bu kez üst (filtre) kısımları atılıp, alttaki sıvı (DNA) içeren ependorfların ağızları kapatıldı.
21. Elde edilen tüm DNA örnekleri PCR uygulanana kadar -20°C'de saklandı.

3.4.2. Real-time PCR

2 farklı test kullanıldı.

a) MycAssay *Aspergillus* real-time PCR testi

Kit İçeriği

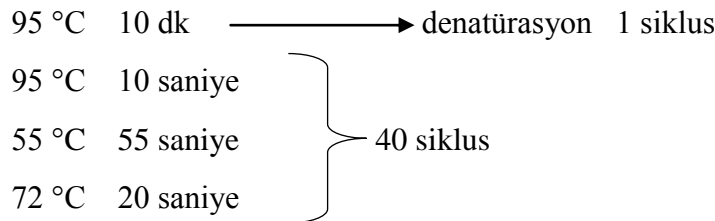
<u>Tüp 1 (66µl)</u>	dNTPler MgCl ₂ DNA polimeraz kompleksi içeren buffer solüsyonu
<u>Tüp 2 (66µl)</u>	<0.01% Primers <0.01% Molecular Beacons <0.0001% İnternal amplifikasyon kontrol (İnternal amplifikasyon kontrol; rekombinant plazmid DNA içerir)
<u>Tüp 3 (25µl)</u>	Negatif kontrol Su
<u>Tüp 4 (25µl)</u>	Pozitif kontrol <0,0001 pozitif kontrol DNA

(*Aspergillus* hedef sekansı içeren rekombinant Plazmid)

Tris HCl buffer

Testin Yapılışı:

1. Ekstrakte edilen DNA'lar oda ısısına çıkarıldı (tüm işlemler biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirildi).
2. Test edilecek örnek başına bir 0,2 ml'lik PCR tüpü ve pozitif ve negatif kontrol için iki ek PCR tüpü, soğutucu blok üzerine yerleştirildi.
3. Tüp 1 ve tüp 2'deki içerik 1,5 ml'lik ependorf tüpünde eşit miktarda birleştirilerek elde edilen karışım önce vortekslendi, sonra da spin santrifüj uygulandı.
4. Bu karışımdan 15'er µl, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,2 ml'lik PCR tüplerine dağıtıldı.
5. Soğutucu blok üzerindeki tüplere 10'ar µL DNA ilave edildi.
6. Aynı şekilde pozitif ve negatif kontrol içeren Tüp 3 ve Tüp 4'den de PCR tüplerine 10'ar µl konularak tüpler kapatıldı.
7. Kalan reaksiyon karışımı gerekirse daha sonra kullanım için $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu.
8. Tüpler cihaza yüklemenden önce bir çalışma protokolü oluşturuldu.
9. Çalışmayı başlatmadan önce örnekler için tanımlama parametreleri girildi.
10. Örneklerdeki nükleik asit aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı



11. Cihaza örnekler yerleştirildi ve kapağı kapatıldı. Çalışma başlatıldı (113 dakika süreli).
12. Amplifikasyon işlemi, sinyallerin saptanması ve yorumlanması Rotorgene Q cihazı ile yapıldı.
13. Oluşan floresan eğrileri Rotorgene software 2.0 ile değerlendirildi.
14. Sonuçların değerlendirilmesi, Tablo 3.1 'de yer alan kriterlere göre yapıldı.

Tablo 3.1. Real time PCR sonuçlarının yorumlanması

Örnek	Real time PCR Ct***	İnternal kontrol Ct	Yorum	Yapılacaklar
Negatif kontrol	39 veya saptanmadı	28.4-35	*NK uygun	Hasta sonuçları geçerli
Negatif kontrol	39 veya saptanmadı	<28.4 veya >35	NK uygun değil	Çalışma tekrarlanır
Negatif kontrol	<39	28.4-35	kontaminasyon	Çalışma tekrarlanır
Pozitif kontrol	15-20 arası	Uygulanabilir değil	**PK uygun	Hasta sonuçları geçerli
Pozitif kontrol	<15 veya >20	Uygulanabilir değil	PK uygun değil	Çalışma tekrarlanır
Hasta	39 veya saptanmadı	28.4-35	<i>Aspergillus</i> negatif	<i>Aspergillus</i> spp. saptanmadı.
Hasta	<39	Uygulanabilir değil	<i>Aspergillus</i> pozitif	<i>Aspergillus</i> spp saptandı.
Hasta	<39 veya saptanmadı	<28.4 veya	İnternal kontrol başarısız	Test başarısız, inhibitör, diğer nedenler

*NK:negatif kontrol **PK: pozitif kontrol ***C_t:Saptama eşiği

b) Primer Design TM, genesig; *Aspergillus* real-time PCR testi

Kit İçeriği

- 1) *Aspergillus* spesifik primer/prob mix
- 2) Pozitif kontrol
- 3) İnternal ekstraksiyon kontrol DNA
- 4) İnternal ekstraksiyon kontrol primer/prob mix
- 5) RNA/ DNA içermeyen su

Testin yapılışı:

- 1.Ekstrakte edilen DNA'lar oda ısısına çıkartıldı (tüm işlemler biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirildi).
- 2.Test edilecek örnek başına bir 0,2 ml'lik PCR tüpü ve pozitif ve negatif kontrol için iki ilave PCR tüpü, soğutucu blok üzerine yerleştirildi.
- 3.Liyofilize haldeki tüpler dilüe edilmeden önce spin santrifüj uygulandı.

4. Primer /prob mixlerine 165 μ l, kontrollere 500 μ l DNA/ RNA içermeyen saf su eklendi, vortekslendi ve spin santrifüj uygulandı.

5. Her örnek için

Master mix	25 μ l	} 40 μ l mix ve 10 μ l DNA eklendi.
İnternal kontrol primer prob	1 μ l	
<i>Aspergillus</i> primer prob	1 μ l	
İnternal kontrol DNA	1 μ l	
DNA RNA içermeyen su	12 μ l	

6. Aynı şekilde pozitif ve negatif kontrol için de sırasıyla 40 μ l mix ve 10 μ l pozitif kontrol ve 10 μ l su konularak 50 μ l'lik bir karışım oluşturularak PCR tüpleri kapatıldı. Tüpler cihaza yüklemeye önce bir çalışma protokolü oluşturuldu.

7. Çalışmayı başlatmadan önce örnekler için tanımlama parametreleri girildi

8. Örneklerdeki nükleik asit aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı

95 °C	10 dk	} 45 siklus	denatürasyon	1 siklus
95 °C	15 saniye			
60 °C	60 saniye			

9. Cihaza örnekler yerleştirildi ve kapağı kapatıldı. Çalışma başlatıldı (113 dakika süreli).

10. Amplifikasyon işlemi, sinyallerin saptanması ve yorumlanması Rotorgene Q cihazı ile yapıldı.

11. Oluşan floresan eğrileri Rotorgene software 2.0 ile değerlendirildi.

12. Sonuçların yorumlanması tablo 3.2' ye göre yapıldı.

Tablo 3.2. İn house Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Hedef DNA	İnternal kontrol	Negatif kontrol	Pozitif kontrol	Yorum
Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>Aspergillus</i> saptandı
Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>Aspergillus</i> saptandı
Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>Aspergillus</i> saptanmadı
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Çalışma başarısız
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Çalışma başarısız

3.4.3. Geleneksel PCR

PCR reaksiyon karışımı tablo 3.3’de görüldüğü şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Geleneksel PCR reaksiyon karışımı

	Son konsantrasyon	Son hacim
Saf su	1X	11,7 µl
10X PCR tamponu	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5 µl
dNTP mix (100mM)	2,5 mM	2 µl
ITS-1 primeri (100µM)	2,5 µM	2,5 µl
ITS-4primeri (100µM)	2,5 µM	2,5 µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0,3µl
DNA		1 µl
Toplam hacim		25 µl

PCR için kullanılan primer ve prob dizileri ise panfungal primerler olup 18 S rRNA gen bölgesini hedef almaktadır.

5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG (F)

5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG (R)

Hazırlanan PCR reaksiyon karışımı vortekslendikten sonra, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,2 ml'lik PCR tüplerine 24 µl dağıtılıp, klinik örneklerden ekstrakte edilen DNA örneğinden 1 µl eklenerek termal cyclus cihazına yerleştirildi. DNA'ları çoğaltmak için kullanılan PCR amplifikasyon şartları tablo 3.4'de görülmektedir.

Tablo 3.4. Geleneksel PCR amplifikasyon şartları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu (ön ısıtma)	95	2 dakika	1
Denatürasyon	95	1 dakika	40
Primer bağlanması(annealing)	55	45 saniye	
Zincir uzama (elongasyon)	72	90 saniye	
Son uzama (post elongasyon)	72	5 dakika	1
Muhafaza	4		∞

Agaroz jel elektroforez aşaması

PCR sonrası oluşan ürünlerin, hazırlanan jelde yürütülmesi ile DNA'ların bant büyüklükleri, belli DNA fragmentlerini içeren DNA size marker ile karşılaştırılarak saptandı.

1) 1 gram agaroz hassas terazide tartıldı. 100 ml 1xTAE içeren erlenmayer içerisine ilave edildi.

2) Mikrodalga fırında agaroz tamamen çözünene kadar ısıtıldı.

3) Agaroz tamamen çözündükten sonra biraz soğuması beklendi.

4) Jel elektroforez tankı içindeki kalıba dökülmeden önce içine 2,5µl etidyum bromid (renklendirici DNA boyası) eklendi. Etidyum bromidin kanserojen etkisi nedeniyle ciltle temas etmemesine, oluşan buharlaşmaya dikkat edildi. Bu aşama biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi.

- 5) Jel tank içine yavaşça dökülerek taraklar yerleştirildi.
- 6) Yaklaşık 30 dakika sonra jel donduktan sonra taraklar çıkarıldı.
- 7) Oluşan kuyucuklara örnek yüklerken yükleme tamponu olarak Orange G kullanıldı.
- 8) Yükleme için aliminyum folyo üzerine her örnek için 3 µl orange G dağıtıldı. Termal Cycler'da çoğaltılan DNA örneğinden 9 µl alındı, orange G ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 9) Elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi.
- 10) Bir kuyucuğa ise elektroforez sonrası oluşacak DNA parçalarının bant büyüklüklerini tanımlamada yol gösterecek; belli DNA fragmentlerini içeren DNA size marker yüklendi.
- 11) Elektroforez tankının kapağında bulunan elektrotlar yerleştirilerek güç kaynağına bağlandı.
- 12) Güç kaynağı 90 Volt ve 60 mA olacak şekilde ayarlanarak çalıştırıldı.
- 13) Yükleme tamponunun jel üzerinde yürümesi takip edilerek yaklaşık 45–50 dakika jelin 3/4'lük kısmını yürümesi beklenerek elektroforez işlemi sonlandırıldı.
- 14) Jel, elektroforez tankından çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın verileri 'SPSS for Windows, Version 15.0' paket programı kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın verileri, ortalama değer \pm standart sapma (\pm SD), sayı ve yüzde değerler ile verildi. Gruplar arasında ortalamaların karşılaştırılmasında bağımlı örneklerde paired-t testi, bağımsız örneklerde t testi, frekansların karşılaştırılmasında Ki-kare testi veya Fisher's Exact Test kullanıldı. Ki-kare testinin uygun olmadığı durumlarda Kolmogorof-Smirnov testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen verilerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi ve bağımlı örneklerin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı.

İstatistiki değerlendirmede elde edilen p değerinin 0.05 değerleri'nden küçük olması anlamlı kabul edildi.

İnvaziv aspergillozu belirlemede çeşitli yöntemlerin PCR testine göre prediktif değerlerin hesaplanmasında aşağıdaki tanımlamalar esas alındı:

Duyarlılık; yöntemin gerçek hastalar içinden hasta ayırt edebilme yeteneğidir. Gerçek pozitiflerin, gerçek pozitif ve yalancı negatif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Özgüllük; yöntemin gerçek sağlamlar içinden sağlam ayırt edebilme yeteneğidir. Gerçek negatiflerin, gerçek negatif ve yalancı pozitif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Pozitif kestirim değeri; testin pozitif (hasta) sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten hasta olması durumunun koşullu olasılığının ölçüsüdür. Gerçek pozitiflerin, gerçek pozitif ve yalancı pozitif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Negatif kestirim değeri; testin negatif (sağlıklı) sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten sağlıklı olması durumunun koşullu olasılığının ölçüsüdür. Gerçek negatiflerin, gerçek negatif ve yalancı negatif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Doğruluk değeri; gerçek pozitif ve gerçek negatiflerin toplamının örneklem toplamına bölünmesiyle ve yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

4.BULGULAR

Ocak 2011- Ocak 2012 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji servisi ve Kemik iliği transplantasyon ünitesinde takip edilen ve invaziv aspergilloz şüphesi olan toplam 99 hasta çalışmaya dahil edilmiş olup, bu hastaların 161 febril nötropenik epizodu izlenmiştir. Avrupa Kanseri Araştırma Merkezi (EORTC) sınıflamasına göre bu epizodlar tanımlanmıştır. İnvaziv aspergilloz şüphesi olmayan 29 hasta ise kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları sırasıyla 50.77 ± 15.91 ve 48.79 ± 17.67 idi. Hasta grubu 59 erkek ve 40 kadından oluşmaktadır. Hasta grubunun 89'u hematoloji servisinde 10'u kemik iliği ve transplantasyon ünitesinde yatan hastalar oluşturmuştur. Çalışma grubuna ait demografik bilgiler tablo 4.1'de görülmektedir.

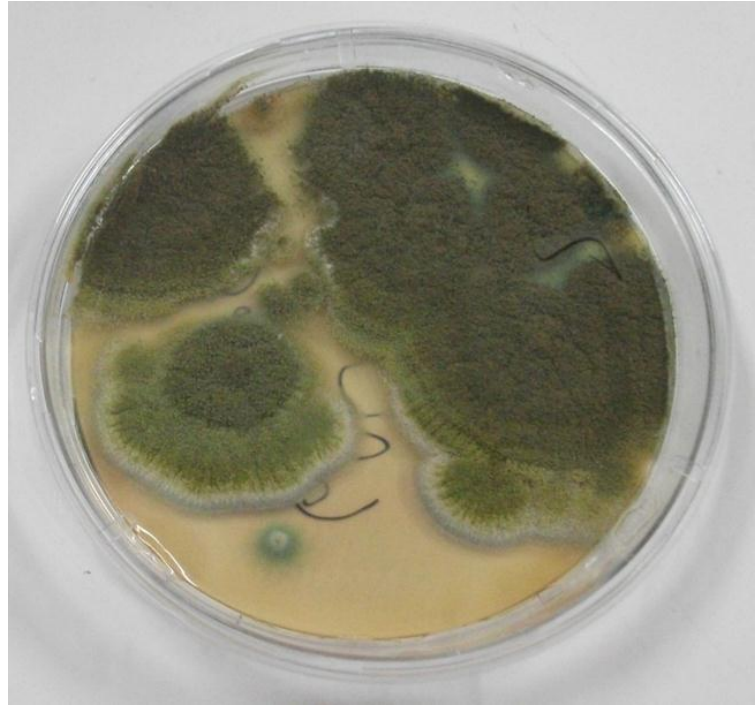
Tablo 4.1. Çalışma grubunun demografik özellikleri

		Hasta grubu n=99	Kontrol n=29
Cinsiyet	Erkek	59	7
	Kadın	40	22
Yaş yıl	($x \pm SD$)	50.77 ± 15.91	48.79 ± 17.67
	Ortanca	54	52
Yatılan servisler	Servis	89	29
	KİT ünitesi	10	-
Yatış süresi	($x \pm SD$)	$29,72 \pm 14,88$	$15,59 \pm 2,15$
	Ortanca		

Hastaların 161 febril nötropenik epizodundan 358 serum örneği elde edilmiştir. Hastalardan 61'inin tek febril nötropenik epizodu izlenirken, 22 hastanın iki, 11 hastanın üç, 2 hastanın dört, 3 hastanın beş febril nötropenik epizodu izlenmiştir. Aynı hastanın tekrar yatışındaki febril nötropeni epizodu yeni bir epizod olarak değerlendirmeye alınmıştır. Bu hastaların özellikleri tablo 4.2'de görülmektedir.

Hasta grubunda en sık altta yatan hastalık %39.4 ile AML olarak görülmüştür. 99 hastanın 38'i (%38) yeni tanı almış iken, 42'si (%42.4) tedavi gören, 19'u (%19.1) ise tedavi sonrası relaps olan hastalardan oluşmaktadır.

EORTC-MSG tanı kriterlerine göre yapılan sınıflamada bir hastada kanıtlanmış (proven) İA saptanmıştır. 24 yaşında daha önce bilinen kronik hastalık öyküsü bulunmayan erkek hastada akut invaziv rinosinüzit gelişmiştir. Tanı maksiller sinüsten elde edilen operasyon materyalinin mikrobiyolojik ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve ardından etkenin (*A.flavus*) kültürde izole edilmesiyle konulmuştur. Hasta yatışından 39 gün sonra kaybedilmiştir. Şekil 4.1'de hastadan izole edilen *A.flavus* görülmektedir.



Şekil 4.1 Kanıtlanmış İA olgumuzda izole edilen *A.flavus*

İzlenen 161 epizodun; 1'i kanıtlanmış İA, 17'si yüksek olasılıklı İA, 60'ı düşük olasılıklı İA, 83'ü ise İA riski taşıyanlar olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta grubuna ait özellikler

Özellikler	Hasta düzeyinde n (%)	Epizod düzeyinde n (%)
Risk düzeyleri		
Düşük olasılıklı İA	39 (39.4)	60 (37.2)
Yüksek olasılıklı İA	11 (11.1)	17(10.5)
Kanıtlanmış İA	0	1 (0.6)
İA açısından riskli	49 (49.5)	83(51.5)
Tanı		
AML	39 (39,4)	75(46.5)
ALL	17(17,2)	26(16.1)
HL	15 (15,2)	17(10.5)
AA, MDS, immün nötropeni	12 (12.1)	19(11.8)
NHL	6 (6.1)	12(7.4)
MM	6 (6.1)	6(3.7)
KLL, KML	4 (4.0)	6(3.7)
Eşlik eden hastalık *		
Hipertansiyon	17(45.94)	25 (46.3)
DM	13(35.13)	18 (33.3)
KOAH, kr.bronşit	5(13.5)	8 (14.8)
Prostat, mesane Ca	2 (0.5)	3 (0.5)

AML; akut myeloblastik lösemi, AA: Aplastik anemi, ALL; akut lenfoblastik lösemi, KML; kronik myelositer lösemi, NHL; non hodgkin lenfoma, DM; diabetes mellitus, MDS; myelodisplastik sendrom, MM; multiple myelom * birden fazla eşlik eden hastalık olabilir.

4.1. Olguların Kültür Üremeleri

161 epizodun 31'inde (%19.25) bakteremi ve 3'ünde de kandidemi saptanmıştır. Kan kültüründe en sık üreyen bakteri koagulaz negatif stafilkoklar olmuştur. Hastaların kan, idrar ve balgam kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı tablo 4.3'de görülmektedir. Kanıtlanmış İA olan tek hasta dışında hastaların hiçbirinin kan, idrar ve balgam kültürlerinden *Aspergillus* türleri ve diğer filamentöz mantarlar izole edilmemiştir.

Tablo 4.3 Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Kan Kültürü	Sayı (n)	Frekans (%)
<i>E.coli</i>	4	12.9
Koagulaz negatif stafilokok	14	45.1
<i>K.pneumoniae</i>	4	12.9
<i>S.aureus</i>	1	3.2
<i>Enterococcus sp.</i>	3	9.6
<i>A.baumannii</i>	2	6.4
<i>C.albicans</i>	1	3.2
<i>C.glabrata</i>	1	3.2
<i>C.kefyr</i>	1	3.2
İdrar Kültürü		
<i>E.coli</i>	5	62.5
<i>K.pneumoniae</i>	2	25
<i>E.faecalis</i>	1	12,5
Balgam Kültürü		
<i>E.coli</i>	1	20
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	40
<i>S.maltophilia</i>	2	40

4.2. Antibakteriyel ve Steroid Kullanımı

Epizodların 157 (%97.5)'sinde geniş spektrumlu antibakteriyel ve 16'sında da (%9.93) 1 mg/kg'ın üzerinde steroid kullanılmıştır. En sık kullanılan antibakteriyel ajanlar piperasilin-tazobaktam ve imipenem olarak görülmüştür.

4.3. Antifungal Kullanımı

161 epizodun 106'sında (%65.83) antifungal kullanılmıştır. EORTC tanı kriterlerine göre kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'sı olan hastaların tamamında antifungal tedavi başlandığı görülmüştür. Düşük olasılıklı İA olarak tanımlanan epizodların 54'ünde (%90)'nda, İA riski olan grupta ise 34'ünde (%40.9) antifungal kullanımı varken, sıklıkla kullanılan antifungaller amfoterisin B ve vorikonazol

olarak görülmüştür (30'unda amfoterisin B, 28'inde vorikonazol, 14'ünde Amfoterisin B ve vorikonazol).

4.4. Görüntüleme Yöntemleri Bulguları

161 epizodun 121'inde (%75.15) en az bir kez YRBT çekilmiştir. 12 epizotta aynı yatış sırasında 2 kez, 2 epizotta 3 kez, 1 epizotta da 4 kez YRBT çekilmiştir.

2 hastada paranazal BT, 2 hastada paranazal MR görüntüleme yöntemi olarak kullanılmıştır. Çekilen YRBT'lerde en sık gözlenen patolojik görünüm erken dönem bulgularından olan nodül ve/veya buzlu cam (%31.9) görünümü olmuştur. Görüntüleme yöntemlerinde izlenen bulgular tablo 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4. Görüntüleme yöntemlerindeki bulgular

YRBT (n=121)	Görülme sıklığı (%)
Patoloji olmayan	19 (15.7)
Nonspesifik nodül, atelektazi	17 (14)
Nodül	4 (3.2)
Buzlu cam	15 (12.3)
Nodül ve buzlu cam (halo)	26 (21.4)
Plevral sıvı	10 (8.2)
Kavite	2 (1.6)
Konsolidasyon	2 (1.6)
Paranasal Sinüs BT (n=4)	
Yumuşak doku dansitesi	4 (3.2)
Mukozal kalınlaşma	4 (3.2)

4.5. Galaktomannan Antijen Testi Bulguları

Değerlendirmeye alınan 99 hastanın 161 febril nötropenik epizodundan 358 serum örneği ve kontrol grubundaki 29 hastadan 29 serum örneği elde edilmiştir. Toplam 387 serum örneğinde ELISA yöntemiyle GM antijeni aranmıştır

Optik dansite indeksinin 0.5 ve üzerinde olması pozitif kabul edilerek 161 epizodun 26'sında (%16.14), 358 serum örneğinin 32'sinde (%8.9) GM antijen

pozitifliği saptanmıştır. Kontrol grubu serumlarının tamamı negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan GM antijen indeks değerleri 0,50 ile 7,71 arasında değişmekteydi.

EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA olarak tanımlanan hastaların GM düzeyleri ile ilgili bilgiler tablo 4.5’de görülmektedir.

Tablo 4.5. Olguların galaktomannan düzeyleri

EORTC sınıfı	Cins/yaş	Altta yatan hastalık	Serum örneği sayısı	GM düzeyleri (en düşük-en yüksek)
Kanıtlanmış İA	E/ 24	Aplastik anemi	8	0.14-0.60
Yüksek olasılıklı İA	K/32	AML	3	0.22-0.93
	E/59	Lenfoma	4	0.16-0.52
	K/21	AML	3	0,11-0.56
	K/44	Lenfoma	2	0.38-1.99
	E/45	ALL	8	0.20-0.53
	K/58	AML	7	0.10-0.76
	E/41	Lenfoma	3	0.28-0.75
	E/38	AML	3	0.20-0.59
	E/50	AML	10	0.09-2.03
	E/34	Lenfoma	8	0.13-0.62
	E/37	ALL	3	4.66-7.71
	K/32	AML	3	0.18-0.53
	K/21	AML	6	0.11-0.66
	E/33	Lenfoma	5	0.21-1.09
	K/46	AML	10	0.08-0.62
	E/33	ALL	3	0.28-1.90

Tüm epizodlar değerlendirildiğinde (kanıtlanmış, yüksek olasılıklı, düşük olasılıklı İA ve İA riski olan) GM antijen testinin duyarlılığı %16.14, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri (PPD) %100, negatif prediktif değeri (NPD) %17.68 ve doğruluğu % 28.94 olarak hesaplanmıştır.

EORTC'ye göre İA olarak sınıflandırılan grupta (kanıtlanmış, yüksek olasılıklı, düşük olasılıklı İA) duyarlılık %23.07, özgüllük %100, PPD %100, NPD %32.58 ve doğruluk %43.92 olarak saptanmıştır.

4.6.Real-time PCR Testi Bulguları

Serum örneklerinde *Aspergillus* DNA'sını tespit etmek üzere standardize edilmiş bir ticari real-time PCR kiti (Mycassay *Aspergillus* PCR) ile Primer Design firması tarafından in-house olarak hazırlanmış bir real-time PCR mixi olmak üzere iki farklı test uygulanmıştır.

4.6.1. Real-time PCR Sonuçları

Tüm epizodların 86'sında (%53.41) ve 358 hasta serumunun 125'inde (34.91) pozitiflik saptanmış olup kontrollere ait tüm serum örnekleri negatif bulunmuştur.

EORTC kriterlerine göre kanıtlanmış, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı İA olarak tanımlanan 78 epizodun 51'(%65.4) inde pozitiflik ,

Kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA olarak tanımlanan 18 epizodun 9'(%50) unda pozitiflik,

İA açısından riskli olan grupta ise 83 epizodun 35'inde (%42.16) pozitiflik saptanmıştır.

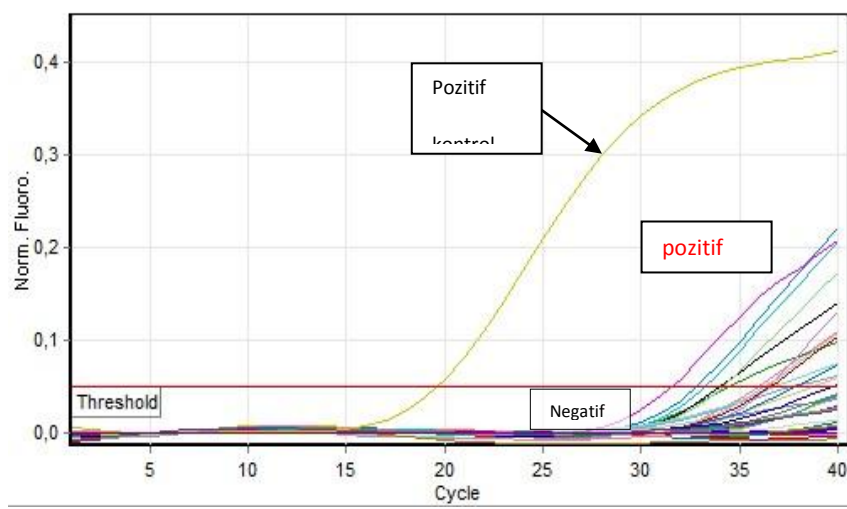
Tablo 4.6. Real-time PCR testinin gruplar arasında karşılaştırılması

Hasta grubu	Real time PCR		p değeri
	Pozitif	Negatif	
Kanıtlanmış+YO+DO	51 (%65.4)	27(%34.6)	< 0,05
İA riskli	35 (%42.2)	48(%57.8)	

EORTC'ye göre tanımlanan grup ve İA riskli olan grup real-time PCR yöntemi açısından karşılaştırılmıştır. Bu test için 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.6).

Tüm epizodlar değerlendirildiğinde real time PCR testinin duyarlılığı %53.41, özgüllüğü %100, PPD'i %100, NPD'i %27.88 ve doğruluğu sırasıyla %60.52 olarak saptanmıştır.

EORTC'ye göre İA olarak sınıflandırılan grupta duyarlılık %65.38, özgüllük %100, PPD %100, NPD %51.78 ve doğruluk %74.76 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.2. Real-time PCR görüntüsü

4.6.2. İn House Real-time PCR Testi Bulguları

Tüm epizodların 18'inde (%11.1), 358 hasta serumunun 22'inde (%6.14) pozitiflik saptanmıştır. 28 kontrole ait serum örneğinde pozitiflik saptanmazken, 1 kontrol serumunda pozitiflik saptanmıştır.

Kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA olarak tanımlanan 18 epizodun 4 (%22.2)'ünde pozitif sonuç bulunmuştur.

Düşük olasılıklı İA grubunda 60 epizodun 5'inde (%8.3), İA açısından riskli olan grupta ise 83 epizodun 9'unda (%10.8) pozitiflik saptanmıştır.

Tablo 4.7. İn house real-time PCR testinin gruplar arasında karşılaştırılması

Hasta grubu	İN house Real time PCR		Toplam
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
Kanıtlanmış İA, YO grup	4 (22.2)	14 (77.7)	18
DO grup	5 (8.3)	55 (91.6)	60
İA riskli grup	9 (10.8)	74 (89.1)	83
Kontrol grubu	1 (3.4)	28 (96.6)	29

YO: Yüksek olasılıklı, DO: Düşük olasılıklı

Tüm epizodlar değerlendirildiğinde testin duyarlılığı %11.18, özgüllüğü %96.55, PPD %94.73, NPD %16.37 ve doğruluğu %24.21 olarak hesaplanmıştır. EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta duyarlılık %11.53, özgüllük %96.55, PPD %90, NPD %28.86 ve doğruluk %34.57 olarak saptanmıştır.

4.6.3. Geleneksel PCR Testi Sonuçları

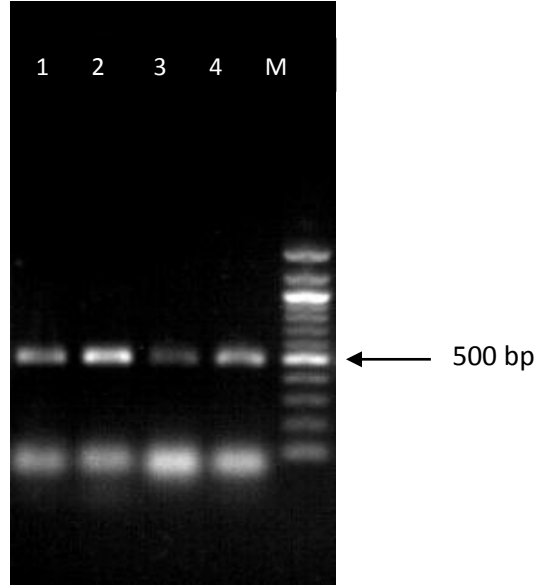
Tüm epizodların 9'unda (%5.59), 358 hasta serumunun 12'sinde (%3.35) pozitiflik saptanırken, kontrollere ait tüm serum örnekleri negatif olarak belirlenmiştir.

Kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA olarak tanımlanan 18 epizodun 3 (%16.66)'ünde pozitiflik,

Düşük olasılıklı İA grubunda 60 epizodun 4'ünde (%6.6), İA açısından riskli olan grupta ise 83 epizodun 2'sinde (%2.4) pozitiflik saptanmıştır.

Tüm epizodlar değerlendirildiğinde yöntemin duyarlılığı %5.59, özgüllük %100, PPD %100, NPD %16 ve doğruluk %20 olarak hesaplanmıştır.

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta ise duyarlılık %8.97, özgüllük %100, PPD %100, NPD %29 ve doğruluk %33.64 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.3. Panfungal primerler ile Jel elektroforez görüntüsü

M: 100bp DNA marker,

1: Düşük olasılıklı İA 2: Kanıtlanmış İA

3: Yüksek olasılıklı İA 4: Yüksek olasılıklı İA

Şekil 4.3’de 4 farklı hastanın 4 epizodundan elde edilen serum örneklerinin jel elektroforez işlemi sonrası oluşan bantlar görülmektedir. Örneklere ait jel görüntüsünde yaklaşık 500-550 baz çift (bp)’lik bölgede bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.8. GM antijen testi, real-time testleri, geleneksel PCR, YRBT’nin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif ve negatif prediktif değerleri

TESTLER	GM (%)	Real-time PCR (%)	İn house PCR (%)	Geleneksel PCR (%)	YRBT (%)	GM+ Real-time PCR (%)	GM+ İn house PCR (%)	GM+ Real-time PCR+ YRBT (%)
Duyarlılık	16.14	53.41	11.18	5.59	45.34	61.49	24.84	73.91
Özgüllük	100	100	96.55	100	100	100	96.55	100
PPD	100	100	94.73	100	100	100	97.56	100
NPD	17.68	27.88	16.37	16.0	24.78	31.86	18.79	40.84
Doğruluk	28.94	60.52	24.21	20	53.68	67.36	35.78	77.89

Epizodların tümünde yöntemlerin birlikte kullanılmasıyla duyarlılık, NPD ve doğruluk oranlarında artış görülmüştür. GM, real-time PCR ve YRBT birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %73.91, özgüllük %100, PPD %100, NPD % 40.84 ve doğruluk oranları %77.89 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.9. EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta GM, real-time PCR testleri, geleneksel PCR, YRBT'nin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif ve negatif prediktif değerleri

TESTLER	GM (%)	real-time PCR (%)	İn house PCR (%)	Geleneksel PCR (%)	YRBT (%)	GM+ real-time PCR (%)	GM+ İn house PCR (%)	GM+ real-time PCR+ YRBT (%)
Duyarlılık	23.07	65.38	11.53	8.97	93.5	73.07	29.41	98.72
Özgüllük	100	100	6.55	100	100	100	96.55	100
PPD	100	100	90	100	100	100	95.86	100
NPD	32.58	51.78	28.26	29	74.3	58	33.73	96.66
Doğruluk	43.92	74.76	34.57	33.64	95.3	80.3	47.66	99.06

Yöntemlerin duyarlık, özgüllük, PPD, NPD ve doğruluk oranları hesaplanırken düşük olasılıklı ve İA riski olan grup da İA olarak kabul edilip kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Yöntemlerin birlikte kullanılmasıyla EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta da duyarlılık, NPD ve doğruluk oranlarında artış görülmüştür. GM, real-time PCR birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %73.07, özgüllük ve PPD %100, NPD % 58 ve doğruluk oranları %80.3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

4.7. GM Antijen Testi, real-time PCR, in house PCR ve Geleneksel PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Epizod düzeyinde yöntemler birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

4.7.1. GM Antijen Testi ve real-time PCR Testi Karşılaştırılması

13 epizodda (12 epizod yüksek olasılıklı ve kanıtlanmış İA, 1 epizod İA açısından riskli) hem GM antijen testi hem de real-time PCR testiyle pozitif sonuç alınmıştır.

13 epizodda ise GM antijeni pozitif iken real-time PCR ile negatif olarak, 73 epizodda real-time PCR ile pozitiflik saptanırken GM antijeni negatif saptanmıştır.

91 epizodda ise GM antijen testi ve real-time PCR testi negatif olarak belirlenmiş olup 2 test karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta ; 12 epizodda iki testte de pozitiflik, 21 epizodda iki testte de negatiflik saptanırken, 39 epizodda GM antijen testi negatifken real time PCR pozitif, 6 epizodda ise real time PCR testi negatifken GM antijen testi pozitif olarak saptanmıştır. Real-time PCR ile GM antijen testleri bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.7.2. Real time PCR Testlerinin Karşılaştırılması

Real time PCR (Mycassay *Aspergillus* PCR) ve in house real time PCR testlerinin bulguları karşılaştırıldığında, 2 test ile de 13 epizodda pozitiflik saptanmıştır. 73 epizodda real-time PCR ile pozitif sonuç alınırken in house PCR ile negatif olarak belirlenmiştir. 5 epizodda ise in house PCR ile pozitif sonuç alınırken real-time PCR yöntemi ile negatiflik saptanmıştır. 2 test arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta iki yöntemle de 7 epizodda pozitif sonuçlanmıştır. 44 epizodda real-time PCR testi ile pozitif sonuç alınırken in house PCR testi negatif saptanmıştır. Real-time PCR testi ile in house real-time PCR'in bulguları karşılaştırıldığında iki test arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Real-time PCR ile pozitif saptanan 125 serum örneğinin ortalama Ct değeri (eşik değeri) 34.66 ± 2.62 iken in house PCR için bu değer ortalama 39.69 ± 2.61 olarak hesaplanmış olup 2 testin *Aspergillus* DNA'sını saptama eşik değerleri arasında istatistiksel olarak da anlamlı fark saptanmıştır. Real time PCR testi ile in house olarak hazırlanmış mixe göre daha erken siklularda pozitiflik saptanmıştır ($p<0.05$).

4.7.3. Real-time PCR ve Geleneksel PCR Testleri Bulguları Karşılaştırılması

Real-time PCR ve geleneksel PCR testleri bulguları karşılaştırıldığında, iki yöntem ile de 8 epizodda pozitiflik saptanmıştır. 78 epizodda real time PCR testi ile pozitif sonuç alınırken geleneksel PCR ile negatif sonuç alınmıştır, 1 epizodda ise geleneksel PCR ile pozitiflik saptanırken real-time PCR testi ile negatif olarak belirlenmiştir. 103 epizod ise 2 test ile de negatif sonuçlanmıştır. 2 test arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta real-time PCR ve geleneksel PCR yöntemlerinin bulguları karşılaştırıldığında da iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). İki yöntem ile de 7 epizodda pozitiflik saptanmıştır. 44 epizodda real-time PCR testi ile pozitif sonuç alınırken geleneksel PCR ile negatif sonuç alınmıştır.

Testlerin birlikte pozitif saptandıkları epizodlar ise

- 2 real time PCR testi ve geleneksel PCR ile pozitiflik saptanan 3 epizod (1 yüksek olasılıklı 2 düşük olasılıklı),
- Real time PCR testi, GM ve geleneksel PCR ile pozitif saptanan 2 epizod (1 yüksek olasılıklı İA, 1 kanıtlanmış İA),
- 2 real time PCR testi, geleneksel PCR ve GM antijen testi ile pozitif saptanan yüksek olasılıklı İA tanısı alan 1 epizod olarak belirlenmiştir.

4.8. Hasta Özelliklerinin Yöntemler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Hastaların tanıları, aldıkları antifungal, antibakteriyel tedavi, kemoterapi rejimi, nötrofil düzeyleri ve moleküler yöntemlerde kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisi değerlendirilmiştir(Tablo 4.10).

4.8.1. GM Antijen Testi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde GM antijeni pozitif saptanan hastalardan 11'i (%42.3) AML hastasıydı. Hastaların altta yatan hastalıkları ve GM antijen yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antibakteriyel kullanımı açısından değerlendirildiğinde 161 epizodun 157'sinde antibakteriyel kullanımı mevcuttu. Bu 157 epizod piperasilin tazobaktam içerenler ve içermeyenler olarak ikiye ayrıldı. Piperasilin-tazobaktamın tek başına veya diğer antibakteriyellerle kullanıldığı 141 epizod (%89.80) ve piperasilin tazobaktam kullanılmayan 16 epizod (%10.2) vardı. GM pozitifliği 141 epizodun 23'ünde (%16.31), 16 epizodun ise 3'ünde (%18.7) saptanmamıştır. Antibakteriyel kullanımı ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antifungal kullanımı açısından değerlendirildiğinde 161 epizodun 106'sında (%65.83) antifungal ajan kullanımı vardı. Bu 106 epizod tek antifungal kullanımı olan 65 epizod (%61.3), iki ve üzeri antifungal (kombine ya da ardışık) kullanımı olan 41 epizod (%38.6) olarak ikiye ayrılarak değerlendirilmiştir. GM pozitifliği tek antifungal kullanımı olan 8 (%12.3) epizodda, iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 11 epizodda (%26.8) saptanmıştır. Tek veya iki ve üzeri antifungal kullanımı, GM antijen testi arasında ya da antifungal kullanan ve kullanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar nötrojeni düzeyleri açısından değerlendirildiğinde 161 epizodun 91'inde (%56.5) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında, 70'inde (%43.4) $100-500/\text{mm}^3$ arasındaydı. Nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında olan 91 epizodun 17'sinde (%18.68), $100-500/\text{mm}^3$ olan 70 epizodun 9'unda (%12.8) GM antijen pozitifliği saptanmıştır. Derin nötrojenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da nötrojeni düzeyi ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar aldıkları kemoterapi rejimi açısından değerlendirildiğinde 161 epizodun 145'inde (%90) kemoterapötik tedavi veya kök hücre nakli tedavisi yapılmıştı. 145 epizodun 45'inde (%31) remisyon indüksiyon tedavisi, 59'unda (%40.6) konsolidasyon tedavisi, 29'unda (%20) relaps/rezistan tedavi, 12'sinde (%8.2) otolog veya allojenik kök hücre nakli yapılmıştı. Relaps/rezistan tedavi gören hastalarda 11/29 (%37.93) GM pozitifliği en yüksek oranda saptanmıştır. Alınan tedavi tipi ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.8.2. Real-time PCR Testi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde real-time PCR yöntemi ile pozitif saptanan hastalardan 43'ü (%50) AML hastasıydı. En yüksek pozitiflik oranı 17/26 (%65.3) ile ALL tanılı hastalarda görülmüştür. Hastaların altta yatan hastalıkları ve real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antibakteriyel kullanımı açısından değerlendirildiğinde; piperasilin tazobaktam ve/veya diğer antibakteriyellerin kullanıldığı 141 epizodun 75'inde (%53.1), TZP kullanılmayan 16 epizodun ise 11'inde (%68.7) pozitiflik saptanmıştır. Antibakteriyel kullanımı ile real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antifungal kullanımı açısından değerlendirildiğinde; tek antifungal kullanımı olan 65 epizodun 43'ünde (%66.1) iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 41 epizodun 21'inde (% 51.2) real-time PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Tek veya iki ve üzeri antifungal kullanımı, real-time PCR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Antifungal kullanan ve kullanmayan grup karşılaştırıldığında, pozitiflik saptanan epizodların 64'ü (% 74.4) antifungal ajan kullanıyordu. Real-time PCR ile antifungal kullanma durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Hastalar nötrojeni düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; $100/\text{mm}^3$ 'ün altında nötrofil sayısı olan 91 epizodun 59'unda (%64.8), $100/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde nötrofil olan 70 epizodun 27'sinde (%38) real-time PCR pozitifliği saptanmıştır. Derin nötrojenik olan grupta testin pozitiflik oranı daha fazladır. Nötrojeni düzeyi ile real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Hastalar aldıkları kemoterapi rejimi açısından değerlendirildiğinde, tedavi alan 145 epizod için remisyona induksiyon tedavisi gören hastalarda 31/45 (% 68.8) st real-time PCR pozitifliği en yüksek oranda saptanmıştır. Uygulanan kemoterapi rejimi ve real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Yöntemlerin uygulaması sırasında kullanılan serum miktarları da kaydedilmiştir. Buna göre 161 epizodun 66'sında (%40.9) işleme alınan serum miktarı 500µL'nin altında iken, 95 epizodda (%59) 500µL'nin üzerinde olarak belirlenmiştir. Buna göre 500µL altındaki 66 epizodun 23'ünde (%34.8) pozitiflik saptanırken 500µL'den fazla serum kullanılan 95 epizodun 63'ünde (%66.3) pozitif sonuç alınmıştır. Kullanılan serum miktarı ve real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).

4.8.3. İn house real-time PCR Yöntemi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde Primer Design real-time PCR yöntemi ile pozitif saptanan hastalardan 11'i (%61.1) AML hastasıydı. En yüksek pozitiflik oranı 11/75 (%14.6) ile AML'li hastalarda saptanmıştır. Hastaların altta yatan hastalıkları ve in house real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antibakteriyel kullanımı açısından değerlendirildiğinde; piperasilin tazobaktam ve/veya diğer antibakteriyellerin kullanıldığı 141 epizodun 15'inde (%10.6), TZP kullanılmayan 16 epizodun ise 3'ünde (%18.7) pozitiflik saptanmıştır. Antibakteriyel kullanımı ile in house real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antifungal kullanımı açısından değerlendirildiğinde; tek antifungal kullanımı olan 65 epizodun 9'unda (%13.8) iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 41 epizodun 5'inde (%12.1) in house real-time PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Tek antifungal kullanımında pozitiflik oranı daha fazla olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar nötropeni düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 100/mm³'ün altında nötrofil sayısı olan 91 epizodun 10'unda (%10.9), 100-500/mm³'ün üzerinde nötrofil olan 70 epizodun 8'inde (% 11.4) İn house real-time PCR pozitifliği saptanmış olup nötropeni düzeyi ile in house real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar aldıkları kemoterapi rejimi açısından değerlendirildiğinde, tedavi alan 145 epizod için konsolidasyon tedavisi gören hastalarda 8/59 (% 13.5) in house

real-time PCR pozitifliği en yüksek oranda saptanmıştır. Alınan tedavi tipi ve in house real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Kullanılan serum miktarı açısından yöntem değerlendirildiğinde; 500 μ L altındaki 66 epizodun 4'ünde (%6) pozitiflik saptanırken 500 μ L'den fazla serum kullanılan 95 epizodun 14'ünde (%14.7) pozitif sonuç alınmıştır. Kullanılan serum miktarı fazla olan epizodlarda pozitiflik oranı fazla olsa da serum miktarı ile in house real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.8.4. Geleneksel PCR Yöntemi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde geleneksel PCR yöntemi ile pozitif saptanan hastalardan 5'i (%55.5) AML hastasıydı. Altta yatan hastalık ve geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antibakteriyel kullanımı açısından değerlendirildiğinde; piperasilin tazobaktam ve/veya diğer antibakteriyellerin kullanıldığı 141 epizodun 8'inde (%5.6), TZP kullanılmayan 16 epizodun ise 1'inde (%6.2) pozitif olarak belirlenmiştir. Antibakteriyel kullanımı ile geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar antifungal kullanımı açısından değerlendirildiğinde; tek antifungal kullanımı olan 65 epizodun 4'ünde (%6.1) iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 41 epizodun 3'ünde (% 7.3) geleneksel PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Antifungal kullanımı ile geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hastalar nötrojeni düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 100/mm³'ün altında nötrofil sayısı olan 91 epizodun 8'inde (%8.7), 100-500/mm³'ün üzerinde nötrofil olan 70 epizodun 1'inde (%1.4) geleneksel PCR pozitifliği saptanmıştır. Nötrojeni düzeyi ile geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p<0.05$**).

Hastalar aldıkları kemoterapi rejimi açısından değerlendirildiğinde, tedavi alan 145 epizod için relaps/rezistan tedavisi gören hastalarda 3/29 (%10.3)

geleneksel PCR pozitifliği en yüksek oranda saptanmıştır. Tedavi tipi ve geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Kullanılan serum miktarı açısından yöntem değerlendirildiğinde; 500µL altındaki 66 epizodun 1'inde (%1.5) pozitiflik saptanırken 500µL'den fazla serum kullanılan 95 epizodun 8'inde (%8.4) pozitif sonuç alınmıştır. Kullanılan serum miktarı fazla olan epizodlarda pozitiflik oranı fazla olsa da serum miktarı ile geleneksel PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.10. Epizod düzeyinde hasta özelliklerinin ve kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisinin değerlendirilmesi

	Galaktomannan		Real-time PCR		İn house PCR		Geleneksel PCR	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Tanı								
AML	11	64	43	32	11	64	5	70
ALL	3	23	17	9	3	23	0	26
HL	4	13	6	11	1	16	2	15
diğerleri	8	35	20	23	3	40	2	41
P değeri	0.704		0.170		0.749*		0.391	
Antibakteriyel kullanımı								
kullanmayan	0	4	0	4	0	4	0	4
TZP içeren	23	118	75	66	15	126	8	133
TZP'siz	3	13	11	5	3	13	1	15
P değeri	1.000*		0.752*		0.828*		0.965*	
Antifungal Kullanımı								
yok	7	48	22	33	4	51	2	53
Tek	8	57	43	22	9	56	4	61
İki ve üzeri	11	30	21	20	5	36	3	38
P değeri	0.098		0.016		0.935*		0.716*	
Nötrofil düzeyi								
<100/mm ³	17	74	59	32	10	81	8	83
>100/mm ³	9	61	27	43	8	62	1	69
P değeri	0.319		0.001		0.930		0.044**	
Tedavi tipi								
Remisyon induksiyon	6	39	31	14	6	39	4	41
konsolidasyon	6	53	35	24	8	51	2	57
Relaps rezistan	11	18	14	15	3	26	3	26
OKHN-AKHN	2	10	2	10	0	12	0	12
Kemoterapi almayan	1	15	4	12	1	15	0	16
P değeri	0.256*		0.323*		1.000*		0.752	
Serum miktarı								
<500 µl			23	43	4	62	1	65
>500 µl			63	32	14	81	8	87
P değeri			0.000		0.086		0.083**	

*Kolmogorov Smirnov testi, ** Fisher's exact test

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta da hastaların aldıkları antifungal, antibakteriyel tedavi, kemoterapi rejimi, nötrofil düzeyleri ve moleküler yöntemlerde kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisi değerlendirilmiştir (Tablo 4.11).

EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta da serum miktarı ile real-time PCR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$).

Antibakteriyel kullanımı, antifungal kullanımı, altta yatan hastalık, tedavi sırasında kullanılan kemoterapi rejiminin de bu grupta real time PCR, in house PCR, geleneksel PCR ve GM antijen testi üzerine etkinliği değerlendirilmiş, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.9. Kanıtlanmış ve Yüksek Olasılıklı İA grubunda GM, real time PCR ve YRBT'de Pozitifleşme Zamanlarının Karşılaştırılması

Kanıtlanmış İA olgumuzda GM antijen testi YRBT ve Paranasal sinüs BT'den 12 gün önce pozitif sonuç vermiş, serumda PCR pozitifliği ise GM ve görüntüleme yöntemlerinden 30 gün önce saptanmıştır.

Yüksek olasılıklı İA'lu bir hastada ise PCR pozitifliği YRBT'den 23 gün önce, GM antijen testinden ise 38 gün önce görülmüştür.

Tablo 4.11. EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta hasta özelliklerinin ve kullanılan serum miktarının yöntemler üzerine etkisinin değerlendirilmesi

		Galaktomannan		Real time PCR		İn house PCR		Geleneksel PCR	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Tanı									
	AML	8	31	26	13	5	34	4	35
	ALL	3	10	9	4	1	12	0	13
	HL	2	4	4	2	0	6	1	5
	diğerleri	5	15	12	8	3	17	2	18
p değeri		0.910		0.946		0.737		0.610	
Antibakteriyel kullanımı									
	kullanmayan	0	0	0	0	0	0	0	0
	TZP içeren	15	52	44	23	9	58	6	61
	TZP içermeyen	3	8	7	4	0	11	1	10
p değeri		0.722		0.895		0.196		0.988	
Antifungal Kullanımı									
	yok	0	6	5	1	0	6	1	5
	Tek	7	33	28	12	5	35	3	27
	İki ve üzeri	11	21	18	14	4	28	3	29
p değeri		0.091		0.300		0.634		0.761	
Nötrofil düzeyi									
	<100/mm ³	12	35	34	13	6	41	6	41
	>100/mm ³	6	25	17	14	3	28	1	30
p değeri		0.526		0.112		0.676		0.149	
Tedavi tipi									
	Remisyon indüksiyon	5	21	19	7	4	22	3	23
	konsolidasyon	4	23	18	9	2	25	2	25
	Relaps rezistan	8	9	12	5	2	15	2	15
	OKHN-AKHN	1	2	1	2	0	3	0	3
	Kemoterapi almayan	0	5	1	4	1	4	0	5
p değeri		0.077		0.146		0.814		0.871	
Serum miktarı									
	<500 µl			14	14	2	26	1	27
	>500 µl			37	13	7	43	6	44
p değeri				0.033		0.363		0.212	

5.TARTIŞMA

Son yıllarda özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda *Aspergillus* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlar başta olmak üzere hayatı tehdit eden invaziv fungal enfeksiyonların insidansında artış görülmektedir.

Hematolojik maligniteli hastalara uygulanan yoğun kemoterapi rejimleri ve kök hücre transplantasyonunu takiben uygulanan immünsüpresif tedaviler bu hasta grubunu invaziv fungal enfeksiyonlar için riskli hale getirmektedir. Ancak en yüksek risk taşıyan grup yoğun kemoterapi sonrası uzun süreli nötropenisi olan hastalardır. Bu hasta grubunda mantar enfeksiyonlarının özellikle de küf mantarlarının görülme sıklığı artmaktadır. Bu hasta grubunda invaziv mantar enfeksiyonlarının sıklıkla görülen etkenleri *Aspergillus* türleridir [4, 13].

Nötropenik hastalardaki ateşin sıklıkla nedeni bakteriyel enfeksiyonlar ve kullanılan ilaçlar olmakla beraber, bu hastaların yaklaşık %5-10'unda etken mantar enfeksiyonlarıdır [92]. İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonlarının özgül klinik belirtileri bulunmadığından olgular genellikle geç tanımlanırlar ve hızla ilerleme gösterirler. Bazı olgularda tanı ancak postmortem yapılabilmektedir. Dolayısıyla hastaların prognozu olumsuz yönde etkilenmekte, uzun yatış süreleri, yüksek maliyetli tedaviler ve %80'leri aşan mortaliteyle sonuçlanmaktadır.

İnvaziv fungal enfeksiyonların kesin tanısında dokudaki mantarın mikroskopi ve kültür ile izolasyonu halen altın standart tanı yöntemi olma değerini korumaktadır. Ancak çoğunlukla genel durumu bozuk, trombositopenisi olan hastalarda biyopsi ve BAL gibi örneklerin alınması invaziv işlemler gerektirdiğinden nadiren uygulanabilmektedir. Kan, balgam, sürüntü gibi klinik örneklerin kültürlerinin duyarlılığının düşüklüğü ve sonuçların alınması için geçen süre dezavantajlarıdır [87].

Görüntüleme yöntemlerinden yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT)'de halo belirtisi veya makronodül gibi erken patolojik bulgular saptanabilir. Bu bulgular uzamış nötropenisi olan riskli hasta grubunda invaziv aspergillozu (İA) desteklemekle birlikte sadece İA'a özgül değildirler [85].

Klinik ve radyolojik bulguların özgül olmaması, kültür ve mikroskopi gibi geleneksel yöntemlerin duyarlılığının düşük olması yüksek mortalite oranları ile seyreden İA'un erken tanısında yaşanan önemli sorunlardır. Bu nedenle örnek almak

için invaziv prosedür gerektirmeyen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hastalığı erken dönemde saptayabilecek hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla son yıllarda *Aspergillus* antijenlerinin ya da DNA'sının saptanmasına yönelik serolojik ve moleküler tanı yöntemlerine olan ilgi artmıştır [35, 60].

Galaktomannan (GM), İA'lu hastalarda *Aspergillus* türlerinin üremesi sırasında dolaşıma salınan bir hücre duvar polisakaritidir. Hastaların serum ve diğer vücut sıvılarında ELİSA, lateks aglütinasyon, RİA gibi yöntemler ile saptanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda nötropenik hastalardaki İA'un saptanmasında hastalardan ardışık şekilde alınan örneklerde GM antijen testinin yararlı olduğu gösterilmiştir [93].

Bizim çalışmamızda, EORTC'ye göre sınıflandırılan olguların tümünde (kanıtlanmış İA, yüksek olasılıklı İA ve düşük olasılıklı İA) GM antijen testi için duyarlılık %23.07, özgüllük %100, PPD %100, NPD %32.58 ve doğruluk %43.92 olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız benzer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte GM antijen testinin duyarlılığındaki düşüklük dikkat çekicidir. Buna neden olarak aşağıda sıralanan olasılıklar düşünülmüştür.

GM salınım kinetiğinin değişken olması nedeniyle, düzenli olarak ardışık serum örneği alınamayan hastalarda GM pozitifliği saptanamamış olabilir [67].

Serum anti *Aspergillus* antikorlarının GM antijeni ile bağlanarak yalancı negatifliğe yol açabileceği bildirilmiştir. Hedeflenen riskli popülasyonda *Aspergillus* ile önceden karşılaşma ve antikor gelişimi sözkonusu olabilir [63].

Antifungal profilaksi ve/veya tedavinin GM salınımını azaltabileceği çeşitli yayınlarda bildirilmiştir. Çoğunluğunu antifungal kullanan hastaların oluşturduğu çalışma grubumuzda GM negatifliğinin nedeni antifungal kullanımı olabilir [94].

Çalışma grubumuzdaki kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'lu hasta sayısının azlığı da saptadığımız duyarlılıkta etken olabilir. Çünkü bu hasta grubunda genellikle daha yüksek duyarlılık oranları elde edilmektedir.

FDA verilerine göre GM antijen testinin duyarlılığı %80.7, özgüllüğü %89.2 dir. Bununla birlikte farklı merkezlere göre duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %33-100 ve %65-100 arasında değişmektedir. Duyarlılıktaki ve özgüllükteki bu farklılığın hastanın kliniğine, antifungal tedavi alımına, örnek sayısına, tipine, örneğin

enfeksiyonun hangi zamanında alındığına, kabul edilen eşik değerlerine göre değişebileceği bildirilmiştir [61, 95].

Tanrıöver ve arkadaşlarının, hematolojik malignitesi olan 45 hastada GM düzeylerini inceledikleri bir çalışmada, 'European Organisation for Research on Treatment of Cancer-Mycoses Study Group' (EORTC-MSG) kriterlerine göre bir kanıtlanmış ve dört yüksek olasılıklı İA tanısı alan hasta yer almaktaydı. Bu çalışmada eşik değeri 0.5 olarak kabul edildiğinde duyarlılık %60, özgüllük %21 bulunmuş ve testin birçok faktörden etkilenebileceği, her merkezin kendi durumuna göre testin yararlılığını değerlendirmesi gerektiği belirtilmiştir [96].

Leeflang ve arkadaşlarının 30 çalışmanın incelendiği bir meta-analizinde, eşik değerinin 0.5 olarak belirlendiği yedi çalışmada (901 hasta), duyarlılık %78 ve özgüllük %81 bulunmuştur [97]. Tanrıöver ve arkadaşları tarafından, İA şüphesi olan 87 hastanın incelendiği bir başka çalışmada, hastaların 57'si (üçü kesin, 33'ü yüksek olasılıklı ve 21'i düşük olasılıklı) İA tanısı almış, GM antijen testi için eşik değeri 0.5 olarak kabul edilmiştir. Bu durumda duyarlılık %38, özgüllük %95, PPD %95 ve NPD %44 olarak bulunmuştur [98]. GM testinin tanısal değerinin araştırıldığı Pfeiffer ve arkadaşlarının 27 çalışmayı içeren metaanalizinde, kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'da duyarlılığın %61, özgüllüğün ise %93 olduğu belirlenmiştir. Prospektif bir çalışmada GM testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %33.3, %98.6 olduğu bildirilmiştir [68, 99]. Herbrecht ve arkadaşları hematolojik maligniteli hastalarla yaptıkları 31'i kanıtlanmış, 67'si yüksek olasılıklı ve 55'i de düşük olasılıklı olarak sınıflandırılmış hasta grubunda GM antijen testi duyarlılıkları gruplara göre sırasıyla % 64.5, %16.4, %25 olarak bildirilmiştir. Delibalta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada duyarlılık %43, özgüllük % 55, NPD %94 olarak saptanmıştır [100, 101].

Çalışmamızda GM antijen test performansı üzerine antifungal kullanımı, antibakteriyel kullanımı, nötropeni düzeyi, altta yatan hastalık ve kemoterapi rejimlerinin etkileri de değerlendirilmiştir. Hasta grubumuzda tek veya iki ve üzeri antifungal (kombine veya ardışık) kullanımı ile GM antijen testi arasında ya da antifungal kullanan ve kullanmayan grup arasında GM testi duyarlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Bu nedenle antifungallerin GM testine etkinliğini değerlendirecek daha ileri çalışmalar gerektiği düşünülmüştür.

Mc Culloch ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları deneysel çalışmada, İA oluşturulmuş ve antifungal tedavi uygulanan ratlarda GM ve kantitatif PCR'ın İA'ü saptaması araştırılmıştır. Amfoterisin B ve kaspofungin uygulanan ratlarda GM saptanmasında gecikme olmazken, Posakonazol uygulananlarda gecikme saptanmıştır. Özellikle fungistatik etkili antifungallerin yöntemleri negatif yönde etkilediği ve sonuçların antifungal kullanımı dikkate alınarak yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır [102].

Marr ve arkadaşları ise serum örneklemeinden önceki onbeş gün içinde itrakonazol, vorikonazol veya amfoterisin B gibi antifungal kullanan hastalarda, antifungal kullanmayanlara göre testin duyarlılığının anlamlı şekilde düşük olduğunu bildirmişlerdir [94]. Sonuç olarak antifungal kullanımının GM testi üzerine etkisi ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, teorik olarak antifungal ilaçların testi etkileyebileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızla benzer şekilde Luong ve arkadaşlarının BAL örnekleri ile yaptıkları çalışmada antifungal kullanımının GM antijen testi üzerine etkisi olmadığını bildirmişlerdir [103]. Nyugen ve arkadaşları BAL örneklerinde GM antijen testi ile antifungal kullanımını değerlendirdikleri çalışmada 3 günden daha kısa süreli antifungal kullanımının GM testini performansını etkilemediğini bildirmişlerdir [104].

Antibakteriyel kullanımı özellikle piperasilin-tazobaktam (TZP), ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat gibi mantarlardan elde edilen antibakteriyeller yanlış pozitifliğin en önemli nedenleri arasında gösterilmektedir [66]. Bununla birlikte çalışmamızda TZP içeren veya içermeyen antibakteriyel kullanımı arasında GM testi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Aubry ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı hematolojik maligniteler nedeniyle izlenen hastalarda TZP uygulaması ile GM yanlış pozitifliği arasında belirgin bir ilişki bulunmuştur. Hastaların %90'ında 3 gün içinde GM ölçülebilir düzeye ulaşırken, ortalama GM indeksi 3.65 olarak saptanmıştır [105]. Gerlinger ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları çalışmada TZP'ye bağlı GM yalancı pozitif sonuçların üreticilere bağlı olduğu ve TZP flakonlarının tedavi öncesi GM değerleri açısından test edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır [66]. Çalışmamızla benzer şekilde Mikulska ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise hematopoietik kök hücre

transplantasyonu yapılmış hastalardan elde edilen 2223 serum örneği değerlendirilmiş, TZP kullanan ve kullanmayan hastalar arasında GM testi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Rastgele seçilen TZP şişelerinde de GM pozitifliği saptanmamıştır [106].

Çalışmamız nütropeni derinliğinin GM test performansı üzerine etkisi açısından değerlendirildiğinde; nötrofil sayısı 100/mm³'ün altında olan hastalarda GM pozitifliği sayısal olarak fazla olmakla birlikte nütropeni düzeyi ile GM pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Cordonnier ve arkadaşları tarafından hematoloji hastalarında antijen düzeyi ile nütropeni şiddeti arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir; nötrofil sayısı <100 olan hastalarda nötrofil sayısı daha yüksek olan hastalara göre anlamlı şekilde yüksek GM seviyeleri tespit edilmiştir [107]. Delibalta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da nütropeni düzeyi ile GM pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunmuştur [101].

Çalışmamız altta yatan hastalık açısından değerlendirildiğinde; AML hastalarının 11'inde (%42.3) GM antijeni pozitif olarak saptanmıştır. İA gelişimi için risk faktörlerinin değerlendirildiği çalışmalarda hematolojik maligniteler arasında AML diğer malignitelere göre İA gelişimi açısından daha yüksek riskli olarak bildirilmektedir. Sayısal olarak çalışmamızda AML'li hastalardaki GM pozitifliği fazla olarak saptansa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) [22].

Alınan yoğun kemoterapi tedavilerinin de İA gelişimi için risk oluşturduğu bildirilmektedir. Kemoterapi rejimlerinden özellikle hasta tanı aldıktan sonra uygulanan remisyona indüksiyon tedavisi döneminde diğer protokollere göre daha fazla oranda İA gelişim oranları bildirilmiştir [22].

Çalışma grubumuzda GM pozitifliği ile kemoterapi rejimi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde relaps-rezistan tedavi görenlerde pozitiflik oransal olarak daha fazla görülmüştür. Çalışmamızda uygulanan kemoterapi rejimlerinin GM antijen testi üzerine etkisi istatistiksel olarak saptanmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamızda GM testi performansı üzerine antibakteriyel kullanımı, kemoterapi rejimleri, altta yatan hastalık etkisi ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı etki saptanmamış olmakla birlikte benzer çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde bu faktörlerin test üzerine etkisinin araştırılmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç

olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle GM test sonuçlarının değerlendirilmesinde bu ve benzeri birçok faktörün gözönünde bulundurulması yararlı olacaktır.

Nötropenik ateşin erken döneminde ve YRBT ile yapılan görüntülemelerde İA'u akla getiren halo işareti, hava hilal belirtisi vb görülebilir. Ancak bu patolojik görüntülerin invaziv aspergilloza özgül olmadığı unutulmamalıdır. Greene ve arkadaşları tarafından yapılmış geniş kapsamlı çalışmada hematolojik malignitesi olan ve AKHN yapılmış hastaların çoğunda halo işareti ve/veya makronodül varlığı gösterilmiştir [84]. Maertens ve arkadaşları GM'nin YRBT ile birlikte kullanımının yararını araştırmışlar ve klinisyene antifungal tedaviye başlama kararında yol gösterici olabileceğini bildirmişlerdir. Epizodların %7'sinde invaziv fungal enfeksiyon gelişmediği halde antifungal tedavi başlandığını bu çalışmada göstermişlerdir [60]. Çalışmamızda YRBT ve GM 'nin birlikte kullanılmasıyla duyarlılık oranlarının artacağı görülmüştür (sadece YRBT %45, GM ile birlikte %68). Çeşitli çalışmalarda GM ile YRBT 'nin beraber kullanımının YRBT'nin tek başına kullanılmasına göre daha iyi duyarlılık ve doğruluk oranları sağladığı bildirilmiştir [60, 108].

İnvaziv aspergilloz tanısındaki güçlükler moleküler tanı yöntemlerini gündeme getirmiş ve farklı PCR tekniklerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Buna rağmen halen standardize edilmiş ve EORTC tanı kriterlerine dahil edilmiş bir moleküler yöntem bulunmamaktadır.

Melchers ve arkadaşları çok kopya sayılı 18S rRNA genini kodlayan primerleri kullanarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Aspergillus* türlerine ait DNA'nın gösterilmesinde PCR yöntemini açıklamışlardır. Daha sonra çoğu PCR deneyinde hedef olarak bu gen seçilmiştir [109]. Çalışmamızda kullandığımız 2 real-time PCR testinde de 18S rRNA gen bölgesi hedeflenmiştir.

PCR' nin kullanımını değerlendiren çalışmalarda örnek tipi (serum, BAL, tam kan), ekstraksiyon protokolü (enzimatik, mekanik, otomatize, ticari kit vb), amplifikasyon sistemi (nested, geleneksel), protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve geleneksel), hedeflenen gen bölgesi (18S rRNA, 28S rRNA vb) ya da pimer seçimi (*Aspergillus* ya da tüm küflere özgül, panfungal) gibi çok sayıda faktörde büyük çeşitlilik gözlenmektedir [81].

Kan ve özellikle fungal DNA'nın serbest olarak dolaştığı serum örneklerinin kullanılması, gerektiğinde girişimsel bir işleme ihtiyaç duyulmadan alınabileceğinden en kolay ulaşılabilir örnek olarak değerlendirilmektedir. Martinez ve arkadaşlarının tam kan ve serum örneklerini karşılaştırdığı çalışmasında iki örnek arasında duyarlılık farkı olmadığı belirtilmiştir. Tam kan örneklerini ekstraksiyon aşamasında EDTA ile muamele etmek gerektiği ve bunun da PCR reaksiyonlarındaki inhibitör etkisi olabildiği vurgulanmıştır. BAL'ın kan örneklerine göre İA'un erken tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bazı yayınlarda bildirilse de, hava kaynaklı sporların inhalasyonu ve akciğerde kolonizasyonu gibi nedenlerle BAL ve balgam örneklerinde yanlış pozitif PCR sonuçları da görülebilmektedir [76, 81].

Çalışmamızda kullandığımız Mycassay *Aspergillus* PCR kiti serum örnekleri için standardize edilmiş ticari bir kittir ve Eylül 2010'dan itibaren kullanılmakta olup Avrupa'ya uygunluk (CE) onayı almıştır. Mycassay *Aspergillus* PCR testinin duyarlılığı EORTC'ye göre sınıflandırılan grupta % 65.38, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Bunun yanında Primer Design firması tarafından in-house olarak hazırlanmış real-time PCR testinde beklenen performans elde edilememiştir. İn house real-time PCR mixi ile ilk çalışmalarda istenilen sonuçlar elde edildiği halde, kit içeriği üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygun saklama koşullarına uyulmasına rağmen, sonraki çalışmalarda aynı performansı gösterememiştir. PCR mixinin standardizasyonunda sorun olabileceği, zamanla mix içindeki enzim aktivasyonunun azaldığı tahmin edilmektedir.

Geleneksel PCR aşamasında ise ilk uygulamalarda termal siklus şartlarının oluşturulmasıyla ilgili sorunlar yaşanmış olup farklı denemelerle optimizasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Amplifikasyon şartları ve PCR reaksiyon karışımı içeriğinde değişiklikler yapılarak yöntem tekrarlanmıştır. Fakat beklenen sonuçlar elde edilememiştir.

Geleneksel PCR'ın real-time PCR'a göre daha ucuz olması, cihaz ve kit bağımlılığı gerektirmemesi gibi avantajları yanında kontaminasyon riskinin yüksekliği, emek yoğun olması, daha uzun zamanda sonuçlanması, sağlıklı kantasyon yapılamaması, analitik özgüllüğünün düşüklüğü ve çok sayıda hasta örneğinin aynı anda çalışılmaması önemli dezavantajlarıdır. Bu yönden

değerlendirildiğinde standardize edilmiş bir real-time PCR yönteminin rutin laboratuvar uygulamalarında tanı amaçlı kullanım için daha uygun olacağı düşüncesindeyiz.

Bu güne kadar yayınlanan çalışmalarda farklı örnek tipleri için farklı duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiştir. Mengoli ve arkadaşlarının 2009 yılında 16 çalışmayı içeren metaanalizlerinde İA açısından yüksek risk altındaki 1618 hastadan 10000 kan, serum veya plazma örneği değerlendirilmiştir. Tek pozitif PCR sonucu için duyarlılık ve özgüllük oranları %88 ve %75 olarak, 2 ve üzeri pozitif PCR sonucunda ise %75 ve %87 olarak bildirilmiştir.[110] Reinwald ve arkadaşlarının çalışmasında 29 kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı hastada BAL PCR'in duyarlılığı %59, özgüllüğü ise % 87 olarak bildirilmiştir [111].

Hebart ve arkadaşları febril nötropenik hematolojik maligniteli veya KİT hastalarında yaptıkları çalışmada panfungal primerler kullanarak prospektif 92 epizod değerlendirmişler. Bu epizodların 48'i yüksek olasılıklı ve kanıtlanmış İA olan hastalardan oluşmaktaydı. İn house PCR'in duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ve %73 olarak bildirmişlerdir [112]. Halliday ve arkadaşları febril nötropenik epizodları olan hematolojik maligniteli ve kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastalarda prospektif olarak kan örneklerinde nested PCR uyguladıkları çalışmada kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA grubunda %100 duyarlılık, %75 özgüllük oranları bildirmişlerdir [113].

White ve arkadaşlarının serum örneklerinde ticari *Aspergillus* PCR yöntemi (Mycassay *Aspergillus* PCR) ve in house real-time PCR yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada Mycassay *Aspergillus* PCR'in duyarlılığı %70, özgüllüğü %90.5 iken in house PCR'in özgüllüğü %80, duyarlılığı %100 olarak bildirilmiştir [114]. Torelli ve arkadaşlarının BAL örneklerinde GM ve real-time PCR (Mycassay *Aspergillus* PCR) ve in house PCR'ı değerlendirdikleri çalışmada kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı hastalarda real-time PCR'in duyarlılığı %94, özgüllüğü %98 olarak bulunmuştur [115].

Loeffler ve arkadaşlarının çalışmasında 68 kan kültür örneğinin hiçbirinde *Aspergillus fumigatus* saptanmazken, PCR ile 68 örnekten 17'sinde (%25) *Aspergillus* DNA' sını tespit edilmiştir. Millon ve arkadaşlarının serum örneklerinde mitokondriyal ve ribozomal DNA bölgelerini hedef alan ve real-time PCR yöntemi

uyguladıkları çalışmada duyarlılık %57, özgüllük ise %94 olarak bildirilmiştir [74, 116]. Mahallawy'nin yüksek riskli pediatrik hastalarda 91 febril nötropenik epizod değerlendirilerek ve panfungal primerler kullandıkları çalışmada %75 duyarlılık ve %92 özgüllük oranları bildirilmiştir [117]. Doksanbir epizodun 42'si yüksek olasılıklı ve kanıtlanmış epizotlardan oluşmaktaydı. Çalışmadaki hasta grubunun çoğunlukla yüksek olasılıklı ve kanıtlanmış İA'lu hastalardan oluşması saptananan yüksek duyarlılık ve özgüllüğün nedeni olabilir.

İnvaziv aspergillozda sporlar inhale edildikten sonra akciğer alveollerinde birikmekte ve hif formu gelişmektedir. Fungal DNA (sporlar ve/veya hifler) bu evrede dolaşıma salınabilmektedir. *Aspergillus*'un kandan iç organlara yayılımı klinik belirtilerin başlamasından çok önce gelişebilir. Akut lösemili veya hematolojik kök hücre nakli yapılan hastaların prospektif çalışmaları sonucunda klinik belirtilerden yaklaşık beş gün önce, PCR en erken invaziv fungal enfeksiyon belirleyicisi olarak değerlendirilmiştir [112]. Çalışmamızda kanıtlanmış İA olan bir hastada PCR pozitifliği GM pozitifleşmeden 30 gün önce, YRBT'den ise 12 gün önce saptanmıştır. Yüksek olasılıklı İA olan başka bir hastada ise PCR pozitifliği GM antijen testinden 38 gün önce, YRBT'den 23 gün önce saptanmıştır. Seri real-time PCR, GM ve YRBT'yi beraber değerlendirdikleri çalışmada Cuenca Esterella ve arkadaşları kanıtlanmış İA' lu hastalarında GM pozitifliğinden 65 gün önce, YRBT' den ise 67 gün önce PCR pozitifliği bildirmişlerdir [118].

Mevcut kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisinin İA'lu hastalar için yeterli duyarlılığa sahip olmamalarından ve her testin enfeksiyonun farklı zamanlarında pozitifleşmesinden dolayı testlerin birarada kullanılmasının performanslarını arttıracığı düşüncesi kabul görmüştür. GM ve PCR testlerinin birlikte duyarlılığının karşılaştırıldığı çalışmalarda farklı oranlarda duyarlılıklar bildirilmektedir. Çalışmamızda da GM antijen testi ve real-time PCR (Mycassay *Aspergillus* PCR) testinin birlikte kullanımı ile duyarlılığın %73'e yükseldiği görülmüştür.

Millon ve arkadaşları GM pozitif olan serum örneklerine real-time PCR uyguladıklarında duyarlılık ve özgüllük oranlarında artış olduğunu bildirmişlerdir [119]. Reinwald ve arkadaşları BAL örneklerinde GM ve PCR'ı değerlendirdikleri çalışmada GM ve PCR'ın birlikte kullanımıyla duyarlılık %83'e NPD %89'a

yükselmiştir. Buna benzer çalışmalarda GM ve PCR testinin birlikte kullanımı önerilmektedir [120].

İA'lu hastalarda *Aspergillus* DNA'sını saptamaya yönelik yapılan real-time PCR testi üzerine antifungal kullanımı, nötropeni düzeyi, altta yatan hastalık ve uygulanan kemoterapi rejimlerinin etkisi de bu çalışmada değerlendirilmiştir.

Antifungal tedavi ekstraksiyon üzerinde etki yapmasa da PCR'nın saptadığı tespit limitini düşürerek negatif PCR sonucuna yol açabileceği, etkili bir ekstraksiyon yönteminin ve daha fazla miktarda örnek kullanılmasının antifungal etkiyi engelleyebileceği belirtilmiştir [80].

Çalışmamızda ise antifungal kullanan grupta real-time PCR yöntemiyle pozitiflik arasındaki ilişki değerlendirildiğinde tek antifungal kullananlarda daha fazla pozitiflik oranı görülmüş, ardışık veya kombine iki ve üzeri antifungal kullanımında yöntemin duyarlılığında azalma oransal olarak görülmüştür. Antifungal kullanımı ile real-time PCR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$).

Reinwald ve arkadaşları BAL örneklerinde PCR uygulanan hastalarda antifungal kullanımının PCR'na etkilerini değerlendirdikleri bir çalışmada birden fazla sayıda antifungal kullanımıyla PCR duyarlılık oranlarında azalma görüldüğü bildirilmiştir. Mc Culloch ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada İA oluşturulmuş ve antifungal tedavi uygulanan ratlarda GM ve kantitatif PCR'ın İA'u saptaması araştırılmıştır. Antifungal tedavinin PCR'ın duyarlılığını anlamlı şekilde azalttığını bildirmişlerdir [102,120].

Çalışmamızda $<100/mm^3$ nötrofil sayısı olan grupta real-time PCR ve geleneksel PCR yönteminin duyarlılığı daha yüksek saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Risk faktörlerinin değerlendirildiği bir çalışmada $<100/mm^3$ nötrofil sayısının HRCT'deki bulgularla ilişkisi olduğu belirtilmektedir. Nötropeni düzeyinin PCR üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır.

Antibakteriyel kullanımı, altta yatan hastalık, tedavi sırasında kullanılan kemoterapi rejiminin de PCR üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu açıdan uyguladığımız testler değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir ($p>0.05$).

Fungal yükün az olduğu örneklerde örnek hacmini arttırmanın ekstraksiyon etkinliğini arttıracığı düşünülebilir. Bununla birlikte bu hasta grubu için bu kadar fazla hacimde kan örneklerinin elde edilmesinin zorluğu unutulmamalıdır.

Bu verileri dikkate alarak çalışmamızda kullanılan serum miktarının PCR üzerine etkinliği de araştırılmıştır. Kit prospektüsünde önerilen 500 µL'nin altındaki serum örneklerinde duyarlılık oranı 500 µL üzerinelere göre daha düşük bulunmuş olup, istatistiksel olarak belirgin fark saptanmıştır ($p<0.001$). Suarez ve arkadaşları da 100 µl ve 1000 µl hacimlerde serum örneklerinde real-time PCR duyarlılığını değerlendirdikleri çalışmalarında artan serum miktarıyla PCR'in duyarlılığının artacağını bildirmişlerdir [121].

2010'da Avrupa *Aspergillus* PCR İnsiyatif Grubu (EAPCRI) Avrupa'daki farklı merkezlerin kan örneklerindeki PCR sonuçlarını ve performanslarını içeren bir rapor yayınlamışlardır. Bu rapora göre PCR'in amplifikasyon aşamasından ekstraksiyonla ilgili öneriler bulunmaktadır. Önerilerden en önemli olanı çalışmamızdaki verilerle benzer olarak yüksek örnek hacimleri kullanılmasıdır. Kan için 3 ml'den fazla örnek kullanımı, negatif ve pozitif ekstraksiyon kontrolleri ile internal kontrollerin kullanılması ve ekstraksiyon son aşamasında DNA elüsyon hacminin 100 µL'den az olması önerilmiştir [122].

GM antijen testi ve moleküler yöntemler ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar gösterse de invaziv olmayan tanı yöntemleri olarak erken tanıda oldukça ümit vaad edicidir. Özellikle İA açısından yüksek riskli hasta gruplarında bu testler için daha yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmektedir. Erken tanı ile etkili antifungal tedavi uygulamak, kötü prognozu iyileştirerek, yüksek mortaliteyi azaltmak amacıyla serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanımı gözönünde bulundurulmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmmün düşkün konakta gelişen invaziv mantar enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri *Aspergillus* türleri olup, yüksek riskli hematolojik maligniteli hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Bu hastalarda erken tanı hayati önem taşır ve tanıda klinik bulgular, histopatolojik inceleme, görüntüleme yöntemleri ile mikrobiyolojik testler birlikte değerlendirilmelidir.

İnvaziv aspergilloz olgularında erken tanı konulmasının güçlüğü ve altın standart olan kültürde etkeni üretme aşamasında tanı/tedaviye geç kalınmasından hareketle çalışmamızda serolojik ve moleküler testleri değerlendirmeyi amaçladık.

Galaktomannan (GM) antijen testi oldukça hızlı sonuçlanan invaziv olmayan bir serolojik tanı yöntemi olmakla birlikte duyarlılık ve özgüllük oranları ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmektedir. Bu testin hasta veya klinik örnekle ilgili birçok faktörden etkilenebileceği bilinmektedir. Çalışmamızda serolojik tanı amacıyla GM antijen testi kullanılmış olup duyarlılık ve negatif prediktif değerleri düşük saptanmıştır. Bu düşüklüğün nedeninin GM salınım kinetiğinin değişkenliğine, antifungal profilaksi veya tedavi alan hastaların grubumuzda fazla olmasına, kanıtlanmış veya yüksek olasılıklı İA olgularımızın azlığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu faktörler göz önünde bulundurularak GM antijen testi sonuçlarının hastanın klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Aspergillus DNA'sının tespitine yönelik moleküler çalışmalarda ise farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda da kullandığımız geleneksel PCR'ın optimizasyon zorluğu, kontaminasyon riski, fazla emek gerektirmesi ve uzun zamanda sonuç vermesi, düşük duyarlılık ve özgüllük oranları nedeniyle hızlı tanı amaçlı kullanıma uygun olmadığı görülmüştür.

Real-time PCR ise hızlı sonuç veren, kapalı sistemlerde çalışıldığından kontaminasyon riski daha az olan, çoğalan DNA'yı saptayan ve kantitasyon yapılabilen bir yöntemdir. Ancak real-time PCR yönteminin de standardizasyon sorununun aşılması gerekmektedir.

İn house real-time PCR yöntemiyle de kullanılan örnek tipi, primerler ve hedeflenen gen bölgesi seçimi gibi değişkenlere bağlı olarak çeşitli yayınlarda farklı duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmiştir. Çalışmamızda standardize real time

PCR testi olan Mycassay *Aspergillus* PCR testi ile Primer design firması tarafından hazırlanmış in house real time PCR testine göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları elde edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız kültür dışı tanı yöntemleri tek başına invaziv aspergilloz tanısı için yeterli duyarlılık göstermemiştir. Bununla birlikte yöntemlerin birlikte kullanılması ile duyarlılık oranlarının arttığı gözlenmiştir. Bu yaklaşım maliyeti arttırabilir ancak özellikle riskli hasta grubunda erken tanı hayati önem taşımaktadır. Hastalar, tanıdaki gecikmeler veya yetersizlikler nedeniyle kaybedildiğinden, İA açısından riskli hasta grubunda mevcut yöntemlerin birlikte kullanımı önem kazanabilir. Her zaman ve her koşulda mikrobiyolog ve klinisyenin işbirliğinin önemi tekrar vurgulanmalıdır.

Ayrıca GM, PCR, radyoloji ve klinik bulgular birlikte değerlendirilirse etkin ve doğru tanı ve tedavi yaklaşımı açısından umut verici sonuçlar alınacaktır. Dolayısıyla erken tanı ile İA olmayan hastalarda maliyeti yüksek ve toksik etkileri fazla olan antifungal tedavinin gereksiz kullanımı da engellenebilecektir.

İnvaziv aspergillozda erken tanıyı ve preemtif tedaviyi yönlendirmek amacıyla GM ve standardize edilmiş real time PCR testleri, özellikle birlikte kullanıldıklarında, önemli bir yere sahip olacak gibi görünmektedir. Bunun yanında moleküler testlerin rutin kullanıma girebilmesi için bu testlerin duyarlılıklarının arttırılmasına ve iyi belirlenmiş hasta grupları ile daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2002; 15: 569-574
2. Carol A.Kauffman. The changing landscape of invasive fungal infections: Epidemiology, diagnosis and pharmacologic options. *Clinical Infectious Disease*. 2006; 43:1-2.
3. Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G et al., The Nationwide Austrian Aspergillus Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010; 36(6): 531-536.
4. Washinton Winn Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Printed in the United States of America. Lippincott Williams & Wilkins: Chapter 21 Mycology, 2006:p. 1174-81
5. Stevens David A. Diagnosis of fungal infectious: current status. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49(1): 11-19.
6. Denning D.W. Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Disease*. 1998; 26: 781-805.
7. Richardson MD, Kokki M. *Aspergillus*. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003: p. 273-296.
8. Patterson TF. *Aspergillus* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R editors, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7. ed. Philadelphia. Churchill Livingstone ; 2010. p. 3241-55.
9. Klich A M. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology*. 2006; 44: 127-31.
10. <http://www.aspergillus.org.uk/> (12.09.2011)

11. Tümbay E. Türkiye'de Aspergilloz.3.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyumu. 2006. Bursa.
12. Asan A. Check List of *Aspergillus* and *Penicillium* Species Reported From Turkey. Turkish Journal of Botany. 2000; 24: 151-67
13. Murray RP, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry LM.İç: Başustaoğlu A, editör. *Aspergillus*, *Fusarium* ve diğer fırsatçı mantarlar. 9.baskı. Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Atlas Kitapçılık ; 2009. s.1802-1838.
14. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi SH, et al. Identification of *Aspergillus* species using Morfological Characteristics. Pakistan Journal of Medical Science. 2007; 6: 867-72.
15. Klich M.A. Biogeography of *Aspergillus* Species in Soil and Litter. Mycologia. 2002; 94: 21-27.
16. Vonberg R-P, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings, Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Medical School Hannover, Germany, Journal of Hospital Infection. 2006; 63: 246-54.
17. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: Mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, anifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. Cerrahpaşa Journal of Medicine. 2003; 34:140-157.
18. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey G et al. Invasive fungal infection in patients with hematological malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). Haematologica. 2006; 91: 986-9.
19. Bilezikci B, Demirhan B., Haberal A.N, Arıkan Ü., Invasive Pulmonary Aspergillosis in Solid-Organ Transplant Recipients: Postmortem Histopatologic Findings. Turkish Journal of Medical Science. 2002; 32: 31-34.
20. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas G. Prospective surveillance for invasive fungal

- infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clinical Infectious Disease*. 2010;50: 1091-1100.
21. Brakhage, A.A., Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Current Drug Targets*. 2005; 6(8): p. 875-86.
 22. Pogano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assesment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66 (1): 5-14.
 23. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Martino B, Specchia G, Pastore D, Stanzani M, Cattaneo C, Fanci R, Caramatti C, Rossini F, Luppi M, Potenza L, Ferrara F, Mitra ME, Fadda RM, Invernizzi R, Aloisi T, Picardi M, Bonini A, Vacca A, Chierichini A, Melillo L, de Waure C, Fianchi L, Riva M, Leone G, Aversa F, Nosari A. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica*. 2010; 9: 644-50.
 24. Erol S. Hastane kaynaklı Aspergilloz. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2010; 44: 323-38.
 25. Singh N, Paterson L D. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18(1): 44-69
 26. Hansen D, Blahout B, Benner D, Popp W. Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *Journal of Hospital Infections*. 2008; 70(3): 259-64.
 27. Panackal, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M et al., Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Disease*, 2010. 50(12): p. 1588-97.
 28. Metin D Y, Kiraz N. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu. İç: Ener B, editör. *Aspergillus* taksonomisinde yenilikler. Bursa; 2006. 25-29.

29. Özyaral O. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. İç: Ener B editör, *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık 2006. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın. 2006; 50: 30-41
30. Kaştımur S, editör “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu”. Ankara :Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, 2010. s:1-160.
31. Bernard M, Latge J.P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Medical Mycology*. 2001;39(1): 9-17.
32. Kartsonis NA, Nielsen J , Douglas C M et al. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates*. 2003. 6(4): 197-218.
33. Rocus R. Klont, Monique A.S.H, Mennink-Kertsen et al. Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens. *Clinical Infectious Disease*. 2004;39: 1467-74.
34. Zeichner-Ostrosky L, Alexander B D, Kett D H, J. Vazquez et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3) β -D-Glukan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans . *Clinical Infectious Disease*. 2005; 41: 654-59.
35. Zeichner Ostrosky L. Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. *The American Journal of Medicine*. 2012;125: 14-24.
36. Latge J P . *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis . *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12: 310-50.
37. Yıldırım ŞT. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. Ustaçelebi Ş, editör Ankara: Güneş Kitapevi; 1999.s.1129-44
38. Alp Ş. *Aspergillus* cinsi mantarların olası virülans faktörleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2006; 40: 109-19.
39. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009; 22(3): 447-65.
40. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virülans faktörleri. *ANKEM Dergisi*. 2012; 26 (2): 261-269.

41. Lewis RE, Wiederhold N P, Chi J, Han X Y et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infection and Immunity*. 2005;73: 635-7
42. Leblond IT, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*. 2005; 60: 1004-1013.
43. Tomee JF, Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000; 30: 476-84.
44. Carvalho A, Pasqualotto CA, Pitzurra L, Romani L, Denning DW, Rodrigues F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *Journal of Infectious Disease*. 2008; 197(4): 618-21.
45. Kantarcıoğlu SA, Yücel A. Mantarların Rinosinüzitlerdeki Rolü: Epidemiyoloji, Mikoloji, İmmünoloji, Patogenez, Sınıflama Kriterleri, Laboratuar Tanımı, Antifungallerin Tedavideki Yeri. *Cerrahpaşa J*. 2006; 37: 137-54.
46. İnci R. Aspergilloz. İç: Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi;1999:s. 1093-97
47. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infectious Disease*. 2005; 5: 609-22.
48. Chandrasekar, P., Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. *European Journal of Haematology*. 2009; 84: 281-90.
49. Pauw de B , Walsh TJ, Donnelly JP, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative and G.N.I.o.A.a.I.D.M.S.G.E.M.C. Group:, 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 . *Clinical Infectious Disease*. 2008; 46(12): 1813-21.
50. Akan H. Fungal İnfeksiyonlarda EORTC tanımları. *ANKEM Dergisi*. 2009; 23(2): 130-34.

51. Arda B. İnvaziv mantar enfeksiyonu tanısında kullanılan radyolojik ve serolojik testlerle ilgili tanımlar. ANKEM Dergisi. 2009; 23: 122-125.
52. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Medical Mycology. 2005; 43: 125-28.
53. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections . Lancet Infectious Disease. 2003; 3: 230-240.
54. Bouza E, Guinea J, Pelaez T, Molina PJ et al. Workload due to *Aspergillus fumigatus* and significance the microbiology laboratory of a general hospital. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 2075-79.
55. Ascioğlu S, Rex JH, Pauw de B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA and Walsh TJ, et al., Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clinical Infectious Disease. 2002; 34(1): 7-14.
56. Beirao F, Araujo R. State of the art diagnostic of mold diseases: a practical guide for clinicians. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease. 2012; 12:1722-27.
57. Mutlu G. Aspergilloz. İç: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, editör. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:46 2003. s. 221-32
58. Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. Current Clinical Topics and Infectious Disease.1998; 18: 101-153.
59. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasiv aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33: 497-500.

60. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clinical Infectious Diseases*. 2005; 41: 1242–50.
61. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *Journal of Infectious Diseases*. 2004; 190: 641-49.
62. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P et al. *Aspergillus* Galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 1496-99.
63. Verweij P.E., and Mennink-Kersten, M. A. S. H. , Issues with galactomannan testing. *Medical Mycology*. 2006; 44: 179-183.
64. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. *Lancet* 2004b; 363: 325-27.
65. Millon L, Grenouillet F, Crouzet, J. Larosa, F et al. False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Medical Mycology*. 2010; 48(4): 661-4.
66. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C et al. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Medicine of Maladies Infectieuses*, 2012; 42(1):10-4.
67. Morton CO, Loeffler J, De Luca A, Frost S et al. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *Journal of Medical Microbiology*. 2010; 59: 408-13.
68. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 42: 1417-27.

69. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullber BJ et al. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by nonculture- based microbiological methods and management. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 1186-89.
70. Park SH, Choi SM, Lee DG, Choi JH et al. Serum galactomannan strongly correlates with outcome of invasive aspergillosis in acute leukaemia patients. *Mycoses*. 2011; 54(6): 523-30.
71. Chai LY, Kullberg BJ, Johnson EM, Teerenstra S et al. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(7): 2330-36.
72. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H. et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39: 199-205.
73. Marty FM, Koo S. Role of (1-->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*. 2009; 47(1): 233-40.
74. Millon L, Grenouillet F, Legrand F, Loewert S et al. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(3):1058-63.
75. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33: 1504-12.
76. Klingspor L, Loeffler J. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Medical Mycology*. 2009; 47 (1): 241-47.
77. Kaştımur S. "Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu". G.Ü.İletişim Fakültesi Basımevi: Ankara.2010
78. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, Sorda ML, Franco A, Fadda G. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41: 3922-25.
79. Pınar A. PCR ve real time PCR hakkında genel bilgi. Real time PCR Kursu. Ankara Mikrobiyoloji Derneği. Ankara.2009.s: 2-5
 80. White PL, Barton R, Guiver M, Linton JC et al. A Consensus on Fungal Polymerase Chain Reaction Diagnosis? *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006; 8(3): 376-84.
 81. Bretagne S. Primary diagnostic approaches of invasive aspergillosis--molecular testing. *Medical Mycology*. 2011; 49(1): 48-53.
 82. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers VJ et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(4): 1231-40.
 83. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Denning DW et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19: 253–9.
 84. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P. et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 44(3): 373-39.
 85. Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP et al. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*. 2011; 52(9):1144-55.
 86. Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12(4):376
 87. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: An update. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002; 21(3):161-72.

88. Dismukes, WE. Introduction to antifungal drugs. *Clinical Infectious Diseases*. 2000; 30(4): 653-7.
89. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46(3): 327-60.
90. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006; 173(7): 707-17.
91. Withington S, Chambers ST, Beard ME, Inder A et al., Invasive aspergillosis in severely neutropenic patients over 18 years: impact of intranasal amphotericin B and HEPA filtration. *Journal of Hospital Infections*. 1998; 38(1):11-8.
92. Karthaus M, Cornelly OA. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Annals of Hematology*. 2005; 84: 207-16
93. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K et al. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*. 2007; 50 (1): 2-17.
94. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40: 1762-69.
95. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*. 2001;91: 311-18.
96. Tanriover MD, Ascioğlu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses*. 2010; 53(1): 16-25. 96.
97. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;8(4)

98. Tanriover MD, Ascioğlu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses*. 2008(epub ahead)
99. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B. et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*. 2004; 125(2): 196-202.
100. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B et. al. *Aspergillus* Galactomannan Detection in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20: 1898-1906.
101. Delibalta DG, Gencer S, Çağ Y, Özer S, Uzamış Ateşli Nötropenik Olgularda Galaktomannan Ölçümünün İnvaziv Aspergilloz Yönünden Değerlendirilmesi. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2012; 17(1): 11-17.
102. McCulloch E, Ramage G, Rajendran R, Lappin DF et al. Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2012; 65(1): 83-6.
103. Luong ML, Filion C, Labbe AC, Roy J et al. Clinical utility and prognostic value of bronchoalveolar lavage galactomannan in patients with hematologic malignancies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010; 68(2): 132-9.
104. Nguyen M, Leather H, Clancy CJ, Cline C et al. Galactomannan Testing in Bronchoalveolar Lavage Fluid Facilitates the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Malignancies and Stem Cell Transplant Recipients. *American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011; 17: 1043-50.
105. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with

- beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44:389-94.
106. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM et al., Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012; 67(7): 1746-8.
107. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, Pautas C et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15: 81-86.
108. Busca A, Locatelli F, Barbui A, Limerutti G, Serra R, Libertucci D, Falda M. Usefulness of sequential *Aspergillus* galactomannan antigen detection combined with early radiologic evaluation for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2006; 38: 1610-13.
109. Melchers WJ, Verweij PE, H van den P, Belkum van A, Pauw de BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32: 1710-17,
110. Mengoli C, Cruciani M, Barnes A R, Loeffler J et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2009; 9: 89-96
111. Reinwald M, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ et al. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples. *European Journal of Haematology*. 2012; 89(2): 120-7.
112. Hebart H, Loeffler J, Meisner C, Serey F et al. Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181:1713-19.

113. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, Bleakley M, Bradstock K, Chen S. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2006;132: 478-86.
114. White PL, Perry MD, Moody A, Follett SA, Morgan G, Barnes RA et al. Evaluation of analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay *Aspergillus* when testing serum specimens for diagnosis of invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(6): 2169-74.
115. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(12): 4273-8.
116. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najwar L et al. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185:1203-6
117. El-Mahallawy HA, Shaker HH, Ali Helmy H, Mostafa T et al. Evaluation of pan-fungal PCR assay and *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients. *Medical Mycology*. 2006; 44(8): 733-9.
118. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(2): 379-84.
119. Millon, L, Piarroux, R, Deconinck, E, Bulabois C E et al. Use of real time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(10): 5097-101

120. Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaya E, Spiess B, Heinz WJ et al. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012; 67(9): 2260-7.
121. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(11): 3772-7
122. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(11): 3652-8

