

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AFYONKARAHİSARDAKİ DÖRT FARKLI HASTANE
ORTAMLARINDA *ASPERGİLLUS* ARAŞTIRMASI VE İZOLE
EDİLEN *ASPERGİLLUS*' LARIN ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Nedim TUNÇ

AFYONKARAHİSAR 2008

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AFYONKARAHİSARDAKİ DÖRT FARKLI HASTANE
ORTAMLARINDA *ASPERGİLLUS* ARAŞTIRMASI VE İZOLE
EDİLEN *ASPERGİLLUS*' LARIN ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Nedim TUNÇ

Danışman: Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

AFYONKARAHİSAR 2008

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Afyonkarahisardaki Dört Farklı Hastane Ortamlarında *Aspergillus* Araştırması ve İzole Edilen *Aspergillus*'ların Antifungal Duyarlılıklarının Saptanması

Tezi Hazırlayan : Dr.Nedim TUNÇ

Tez Savunma Tarihi :28.04.2008

Tez Kabul Tarihi :28.04.2008

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

İşbu çalışma jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'ında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Doç.Dr.Orhan Cem AKTEPE

ÜYE

Doç.Dr.Zafer ÇETİNKAYA

ÜYE

Doç.Dr.Mustafa ALTINDİŞ

ONAY

DEKAN

Prof.Dr. Necat İMİRZALIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danışmanım Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA hocama yardımları için teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ ve Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamda, hava toplama cihazı ile desteklerinden dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD başkanı ve değerli hocalarına teşekkür ederim.

Tezimi çalıştığım sürece ve eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. TARİHÇE VE SINIFLAMA.....	3
2. 2. GENEL ÖZELLİKLER.....	5
2. 2. 1. Makroskobik Morfoloji.....	5
2. 2. 2. Mikroskobik Morfoloji.....	6
2. 2. 3. Hücre Yapısı.....	8
2. 2. 3. 1. Hücre duvarı.....	8
2. 2. 3. 2. Sitoplazma membranı	9
2. 2. 3. 3. Sitoplazma.....	10
2. 2. 4. Antijenik Özellikleri.....	10
2. 2. 4. 1. Galaktomannan Antijeni.....	10
2. 2. 4. 2. β - (1 \rightarrow 3)- D-Glukan.....	11
2. 2. 5. Virülans Faktörleri ve Patojenite.....	11
2. 2. 5. 1. Isı toleransı (Termotolerans).....	12
2. 2. 5. 2. Demir kazanımı.....	12
2. 2. 5. 3. Katalaz.....	12
2. 2. 5. 4. Pigment.....	12
2. 2. 5. 5. Gliotoksin.....	12
2. 2. 5. 6. Enzimler.....	13
2. 2. 5. 7. Fosfolipaz.....	13
2. 2. 6. Patogenez.....	13
2. 2. 6. 1. Organizmaya Ait Faktörler.....	14
2. 2. 6. 2. Konağa Ait Faktörler.....	15
2. 2. 7. Metabolik Ürünler.....	16
2. 2. 8. Üreme Şekilleri.....	17
2. 2. 8. 1. Anamorfik üreme.....	17
2. 2. 8. 2. Telemorfik üreme.....	17
2. 3. KLİNİK.....	17
2. 4. TANI YÖNTEMLERİ.....	22
2. 4. 1. Direkt Tanı Yöntemleri.....	23
2. 4. 1. 1. Mikroskobik İnceleme.....	23
2. 4. 1. 2. Kültür.....	23
2. 4. 1. 3. Moleküler Yöntemler.....	25
2. 4. 1. 4. Histopatolojik İnceleme.....	26
2. 4. 2. İndirekt Tanı Yöntemleri.....	27
2. 5. TEDAVİ.....	28
2. 6. EPİDEMİYOLOJİ.....	31
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. KAYIT İŞLEMLERİ.....	33
3.2. ÖN HAZIRLIK.....	33

3. 3. BESİYERİ HAZIRLANMASI.....	34
3. 4. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	34
3. 5. DEĞERLENDİRME VE İDENTİFİKASYON.....	35
3. 6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK ÇALIŞMASI.....	36
3. 6. 1. Antifungal İlaç Miktarlarının Tartılması.....	37
3. 6. 2. Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	38
3. 6. 3. RPMI 1640'ın Hazırlanması.....	43
3. 6. 4. İnokülümünün Hazırlanması.....	44
3. 6. 5. Mikrodilüsyon.....	45
IV. BULGULAR.....	47
4.1. İLKBAHAR DÖNEMİ.....	53
4. 2.YAZ DÖNEMİ.....	53
4. 3. KIŞ DÖNEMİ.....	53
4. 4. SONBAHAR DÖNEMİ.....	54
4. 5. HASTANE BÖLÜMLERİ.....	55
4. 6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARI.....	57
4. 6. 1. Amfoterisin B.....	58
4. 6. 2. İtrakonazol.....	59
4. 6. 3. Vorikonazol.....	60
4. 6. 4. Flukonazol.....	60
V-TARTIŞMA.....	63
VI-SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
VII-ÖZET.....	78
VIII-SUMMARY.....	80
IX-KAYNAKLAR.....	82

KISALTMALAR

AMB	: Amfoterisin B
ANS Hastanesi	:Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Araştırma ve Uygulama Hastanesi
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EORTC	: European Organisation for Research on Treatment of Cancer
ELİSA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FDA	: Food and Drug Administration
FLU	: Flukonazol
GHH	: Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi
GM	: Galaktomannan
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HEPA	: High-Efficiency Particulate Air
ITR	: İtrakonazol
İFAT	: İmmün floresan antikor testi
KDH	: Kocatepe Devlet Hastanesi
KOH	: Potasyum hidroksit
LA	: Lateks aglütinasyon
LSU	: Large subünit
LAF	: Horizontal Laminer Air Flow
MIK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MOPS	: (3-[n-morpholino] propanesulphonic acid)
MSG	: Mycoses study group
NNIS	: National Nosocomial Infection Surveillance
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroza agar
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit

RİA	: Radio immünassay
ROR	: Reaktif oksijen radikalleri
RNA	: Ribonükleikasit
RNaz	: Ribonükleaz
rRNA	: Ribozomal ribonükleikasit
mRNA	: Mesenger ribonükleikasit
S	: Sveberg ünitesi
SDA	: Sabouraud dekstroaz agar
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSU	: Small subünit
VOR	: Vorikonazol

TABLO LİSTESİ

Tablo-I	: <i>Aspergillus</i> Türlerinde Makroskobik ve Mikroskobik Görünümler.....	8
Tablo-II	: <i>Aspergillus</i> Türlerinin Neden Olduğu Hastalıklar.....	21
Tablo-III	:Antifungallerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması....	29
Tablo-IV	:Stok Solüsyonlarının Hazırlanmasında Kullanılan Solventler ve Diluentler.....	39
Tablo-V	:Suda Çözünebilen Antifungal İlaçların Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	40
Tablo-VI	:Suda Çözünemeyen Antifungal İlaç Dilüsyonlarının Hazırlanması	40
Tablo-VII	:RPMI 1640 Mediyumun İçeriği.....	43
Tablo-VIII	:İzole Edilen <i>Aspergillus</i> ' ların Sayı ve Yüzde Oranları.....	51
Tablo-IX	:En Sık İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türlerinin Hastanelere ve Mevsimlere Göre Dağılımı, Total <i>Aspergillus</i> İçindeki Yüzde Oranları ve Nem Değerleri.....	55
Tablo-X	:İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türlerinin Hastane Bölümlerine Göre Dağılımı ve Oranları.....	57
Tablo-XI	:Antifungal İlaçlarda Saptanan MİK ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Aralıkları.....	58
Tablo-XII	:Amfoterisin B, İtrakonazol, Vorikonazol ve Flukonazol için <i>Aspergillus</i> Türlerinde Saptanan MİK Değerlerinin Dağılımı	61
Tablo-XIII	:Amfoterisin B, İtrakonazol, Vorikonazol, Flukonazol' e Karşı 118 <i>Aspergillus</i> Suşunda Saptanan Duyarlılıkların Dağılımı.....	62

ŞEKİLLER

Şekil-1	: <i>Aspergillus</i> Cinsinin Genel Yapısı.....7
Şekil-2	:Uniseriate ve Biseriate Vezikülün Mikroskopik Görünümü.....7
Şekil-3	:Flukonazolün Final Konsantrasyonlarının Hazırlanması..... .41
Şekil-4	:Amfoterisin B, İtrakonazol, Vorikonazol ve Flukonazol'un Final Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....42
Grafik-1	:İzole Edilen <i>Aspergillus</i> 'ların Hastanelere Göre Dağılımı.....52
Grafik-2	:İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Sayılarının Mevsimlere Göre52
Fotoğraf-1	:PDA Besiyeri (inkübasyon sonrası alttan ve üstten görünüm)....47
Fotoğraf-2	: <i>A.fumigatus</i> , PDA Besiyerindeki Görüntüsü.....48
Fotoğraf-3	: <i>A.niger</i> , PDA Besiyerindeki Görüntüsü.....48
Fotoğraf-4	: <i>A.versicolor</i> , Cezapek Agardaki Görüntüsü.....49
Fotoğraf-5	: <i>A.terricola</i> , Cezapek Agardaki Görüntüsü.....49
Fotoğraf-6	: <i>A.fischeri</i> ve <i>A. sydowii</i> , Cezapek Agardaki Görüntüsü.....50
Fotoğraf-7	: <i>A.carneus</i> , Cezapek Agar- <i>A.flavus</i> PDA Görüntüsü.....50

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Aspergillus'lar doğada yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır. Doğal yaşam ortamları toprak, çürümüş bitki örtüsü ve organik maddelerdir. Doğada saprofit olarak yaşarlar ve ürettikleri enzimler sayesinde organik maddelerin ayrıştırılmasında görev alırlar (1,2). *Aspergillus* cinsi içinde patojen ve fırsatçı patojen olan türler bulunmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen klinik örneklerde, en sık izole edilen patojen türler başta *Aspergillus fumigatus* olmak üzere *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus*' tur. İnsanlarda ciddi invazif infeksiyonlara neden olan en önemli tür ise *A. fumigatus*' tur (3).

Bitki, hayvan ve insanlarda patojen olabilen *Aspergillus*' ların üreme hız ve kapasiteleri yüksek olup havada en yüksek yoğunlukta bulunan hifli mantarlardan birisidir (4). İnsanlarda, immün sistemin durumuna göre değişmekle birlikte zararsız bir kolonizasyondan, akut invaziv hastalığa kadar değişebilen farklı klinik görünümde infeksiyonlara neden olabilmektedirler (1,2,5).

İmmün sistemi sağlam bireylerde solunumla alınan *Aspergillus* konidiaları, primer savunma mekanizmaları ile zararsız hale getirilerek hastalık oluşması engellenmektedir. Ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda, primer savunma mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu yüksek mortalite ile sonuçlanan invaziv hastalıklara yol açabilmektedirler (1).

Son yıllarda solid organ tümörü ve hematolojik malignensi gibi yoğun kemoterapi gerektiren hastalara, modern immünsüpressif tedavi protokollerinin uygulanması, immün sistemi baskılanmış hasta sayısında artışa neden olmuştur. Bu da fırsatçı patojen olan *Aspergillus* türlerine ait infeksiyon sıklığını arttırmaktadır (5). Hava kaynaklı fırsatçı invaziv infeksiyonlara neden olan küf mantarlarının başında *Aspergillus* türleri gelmektedir (6).

Sitotoksik tedavi, uzun süreli kortikosteroid uygulaması, uzamış nütropeniler gibi predispoze faktörler, invazif akciğer aspergillozunun gelişmesi için risk oluşturabilmektedirler (3,7,8). İmmün baskılanmış hastalarda, invazif aspergilloz olasılığına karşı ampirik veya profilaktik antifungal tedavi uygulanmaktadır. Antifungal tedavilere rağmen, bu hastalarda invazif *Aspergillus* infeksiyonları gelişebilmektedir (9).

Amfoterisin B; *Aspergillus* infeksiyonlarının tedavisinde standart antifungal ilaç olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tedaviye rağmen bahsedilen hasta grubunda mortalitenin yüksek seyretmesi, *Aspergillus* türlerinin antifungal ilaçlara karşı direncini akla getirmektedir (10). Erken tanı sonrası etkene yönelik antifungal duyarlılık testlerinin yapılması ve alternatif antifungal tedavi protokollerinin uygulanmasının hastalık prognozunu olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.

Normal açık havadaki mantar sporu sayısı 10^3 - 10^5 /m³ bulunurken, kapalı ortamlarda bu sayı 10^9 mantar sporu/m³'e çıkabilmektedir. *A. fumigatus* için normal açık havadaki ortalama spor sayısı 0.2-3.5 spor/m³, filtre edilmemiş havadaki spor sayısı ise 5.0 spor/m³ dür (11,12). *Aspergillus* türleri hastane kaynaklı salgınlar yapabilmektedir.

Hava kaynaklı fırsatçı *Aspergillus* sporlarına maruziyet, riskli hastalarda morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle hastane ortamlarında *Aspergillus* spor yoğunluğunu arttıran etmenlerin bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir (12).

Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesindeki merkeze bağlı dört hastanenin on farklı biriminden toplanan hava örneklerinden *Aspergillus* cinsi mantar türlerinin aranması, izole edilen bu türlerin, standart mikrodilüsyon yönteminin kullanılması ile antifungal duyarlılık profillerinin çıkarılması, ortam sıcaklığı ve neminin *Aspergillus* cinsi mantarların üremesine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

II-GENEL BİLGİLER

2. 1. TARİHÇE VE SINIFLAMA

Aspergillus 'lar tüm dünyada doğal ortamlarda bulunan yaklaşık 200 türden oluşan bir genustur. *Aspergillus* ' lar ilk kez 1729 yılında İtalyan papaz ve biyolog Pietro Antonio Micheli tarafından tanımlanmıştır. Mikroskop altında bu mantarların görünümü, kutsal su serpmeye yarayan aspergillumun şeklini andırdığı için bu genus'a *Aspergillus* adı verilmiştir (13).

Aspergillus'ların primer olarak etken oldukları enfeksiyonlar genel olarak 19. yüzyılın ortalarından itibaren bildirilmeye başlanmıştır. 1945 yılında Thom ve Raper adlı araştırmacılar bu tarihe kadar tanımlanmış *Aspergillus* tür ve varyetelerini "Aspergillus'ların el kitabı" adlı bir kitapta toplamışlardır. Daha sonraki yıllarda da toprak ve doğal ortamlardan birçok *Aspergillus* türü izole edilmiştir (14).

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 ekimlerini yaparak kültür izolasyonlarını yapmışlardır. Daha sonraki izolasyonlar ise agar substratının üzerine kurgulanmış farklı besiyerlerinden ve farklı sıcaklık derecelerinde ki inkübasyonlarla sağlanmıştır (14).

Thom ve Raper tarafından önerilen agar bazlı besiyerini takiben, yeni izolatların karşılaştırılarak incelenmesi ve tanımlanan türlerin yeniden soylarına ayrılmasında, Czapek solüsyonu, high-sugar Czapek's, malt extract, potato dextrose, corn meal besiyerleri tanımlanmıştır. Kültürel karakteristikler ve detaylı morfolojik özellikleri oluşturabilme özelliğindeki Czapek solüsyonu ve malt extract agar, tür ve varyetelerin saptanmasında kullanılmıştır (14).

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 varyeteyi tanımladıkları ilk taksonomi yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda sekonder metabolitlerin kromatografisi ve deoksiribonükleik asit (DNA) hibridizasyon gibi yeni tanı metodlarının kullanılması ile türler saflaştırılmıştır (15).

Aynı araştırmacılar 1977 yılında ise *Aspergillus*'ların tanımlanmasına yönelik ilk tanı protokolünü oluşturmuşlardır. Samson, 1979 yılında bu taksonomik tabloya 42 tür ilavesi yapmıştır (16). Gams ve Samson 1985'te de, Raper ve Fennell'in tanımladığı *Aspergillus* türlerini tiplendirerek, *Aspergillus* telemorflarını oluşturmuşlardır. Bugün bu cinsin kabul edilmiş 180' den fazla türü ve 70 telemorfu bulunmaktadır (17).

İnsanda ilk aspergilloz olgusu, 1842 yılında tüberküloz kavitesinde aspergillom olan bir hastanın, balgamında etkeni gören Bennett tarafından bildirilmiştir (18). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda görülen invazif aspergilloz ise ilk defa 1953 yılında fırsatçı bir infeksiyon olarak tanımlanmıştır (18). Gairdner 1853'te plevra infeksiyonu, Virchow 1856'da bronşial ve pulmoner aspergillozlu olgular bildirmişlerdir (15).

Henrici 1939 yılında *Aspergillus*'ların ürettikleri toksinler ile enjeksiyon bölgesinde apse ve nekroza yol açabildiklerini bildirmiştir. Cowley 1947 yılında nadiren olsa *Aspergillus*'lara bağlı subkütanöz infeksiyon gelişebileceğini bildirmiştir (19). *Aspergillus*'lara bağlı ilk mantar endokarditi 1945'de kronik lenfositik lösemi'li bir hastanın postmortem otopsisinde saptanmıştır (20). Matthews ve Greovic 1959'da *Aspergillus*'lara bağlı deri lezyonunu bildirmişlerdir (19). Oppe, ilk kez 1897'de sfenoid sinüsü tutan beyin aspergillozisini bildirmiştir. Watjen, 1928'de, 1931'de ise Egas Moniz ve Loff, beyin içindeki diğer kranial sinüslerinde aspergilloz hastalığı için primer kaynak olabileceklerine dikkat çekmişlerdir (21).

Bakterilerde olduğu gibi *Aspergillus*'larda 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. Hem cins hemde tür adları italik yazılmaktadır.

Aspergillus türleri; *Ascomycota* filumunda, *Euascmycetes* 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. Taksonomik düzenlemede *Aspergillus*'lar funguslar aleminde sınıflandırılmaktadır (22,23).

2. 2. GENEL ÖZELLİKLER

2. 2. 1. Makroskobik Morfoloji

Mikoloji laboratuvarlarında *Aspergillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasında genel olarak makroskobik ve mikroskobik özelliklerden yararlanılmaktadır (2,4). *Aspergillus* cinsi mantarların tür tanımlanmasında makroskobik özellikler oldukça önemlidir. Oluşturdukları kolonin rengi, büyüklüğü ve termotoleransı identifikasyonda yol gösterici olmakta ve türlerin tanımlanmasında kolaylıklar sağlamaktadır (24). Koloni yüzeyleri başlangıçta beyaz olup bir süre sonra türlere göre sarı, yeşil, kahverengi veya siyah renge dönüşürler. Koloni tabanı beyaz, sarı veya kahverengi olabilmektedir (25).

Genellikle kolonilerinin yüzeyi pudralı görünümündedir. Bununla birlikte örneğin *A. nidulans*'sın bazı soylarında koloninin arka yüzü zeytin yeşili- mor renkte veya *A. versicolor*'da olduğu gibi portakal rengi ile mor renk arası olabilmektedir (24). Patojen türlerin sporlanması genellikle 30-37°C'de 36-48 saat inkübasyonda oluşurken, bazı türlerin sporlanması için daha uzun süre gerekmektedir. *A. fumigatus* besiyerlerinde çok hızlı üreyebilmektedir. Termotoleran özelliği ile 40°C'nin üzerinde bile üreyebilmekte ve %0.1'den daha

az O₂ basıncı gibi zor şartlara dayanabilmektedirler. Tablo-I'de bazı *Aspergillus* türlerine ait koloni morfolojileri verilmiştir (2,26).

2. 2. 2. Mikroskobik Morfoloji

Mikroskobik morfoloji, genelde tüm türlerde aynı olmakla birlikte bazılarında türe özgü olup, identifikasyon için anahtar rolü oynamaktadır. *Aspergillus*'lar hif ve konidiaları yardımıyla seksüel ve aseksüel üreme gösterirler. Telemorfik üreme fazını laboratuvar ortamında göstermek zor olduğu için *Aspergillus*'lar genelde aseksüel üreme fazındaki anamorfik yapılarının (hif ve konidiya) özelliklerine göre tanımlanmaktadır (24).

Anamorfik tanımlama da önemli olan morfolojik yapılar şunlardır:

Hif (filamentöz uzantılar): duvarları birbirine paralel, septalı ve hiyalinlidir.

Konidiya (spor): aseksüel evrede üremeyi sağlayan yapıdır. Tek hücreli, bölmesiz, yüzeyi düzgün, desenli, pürüklü, dikensi, şeffaf yada renkli olabilmektedir (27).

Konidiyofor: bir konidiyajen hücre sistemi ve onu taşıyan hifden (gövde-sap) oluşan yapıya konidiyofor (fertil hif) denilmektedir. Rengi ve yüzeyinin düz, tırtıklı olması türden türe farklılıklar göstermektedir (24).

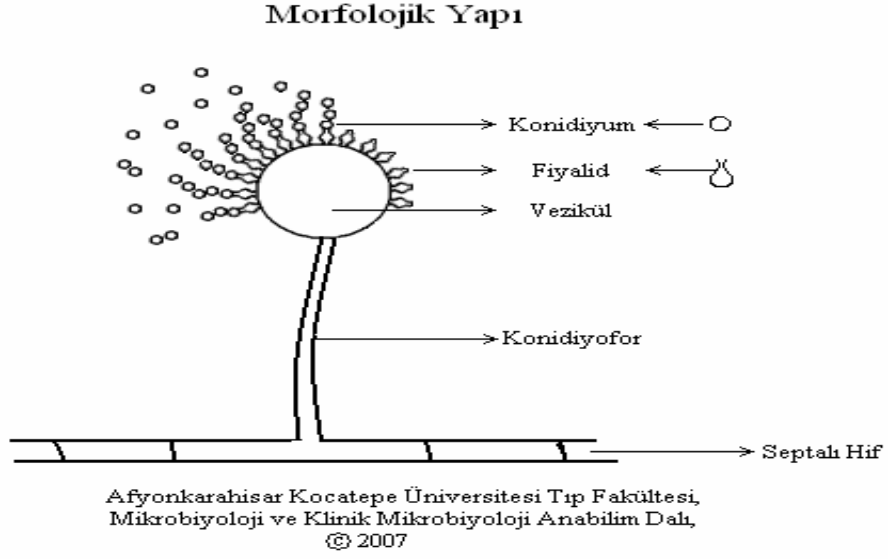
Vezikül: konidiyoforun üst yarısındaki şişkin bölüm olup *Aspergillus* cinsi için tipik bir yapıdır (24). Şekil-1'de *Aspergillus*'ların genel yapısı şematize edilmiştir.

Fiyalid: vezikülü kısmen veya tamamen örten dar boyunlu şişecik biçiminde ki yapılardır. Veziküle bitişik olan fiyalid'lerin tek sıralı (uniseriate) veya çift sıralı (biseriate) dizilimleri, türden türe değişiklik göstermektedir (24).

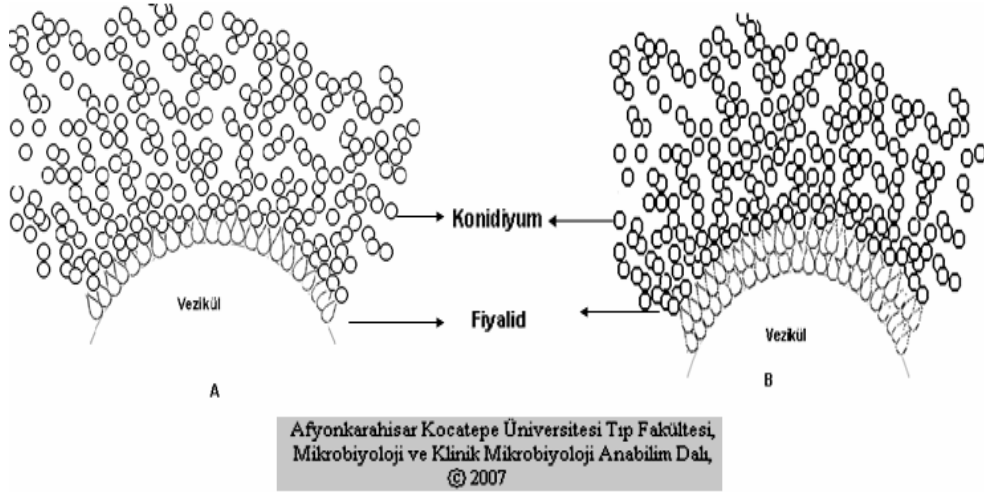
Sterigma: veziküle bitişik ve konidiya oluşumunu sağlayan fiyalidlerdir. Tek sıra dizilimli yapılarda birincil sterigma (metula), çift sıra dizilimli yapılarda ise ikincil sterigma konidiya oluşumunu sağlamaktadır. Şekil-2'de uniseriat ve biseriate vezikül şematize edilmiştir (17).

Bazı *Aspergillus* türlerinde Hülle hücreleri, Siklerotya ve Ask keseleri gibi özel yapılara da rastlanmaktadır (24).

Tablo-I'de insanlar için önemi olan *Aspergillus* türlerine ait mikroskobik özellikler verilmiştir.



Şekil-1: *Aspergillus* cinsinin genel yapısı.



Şekil-2: Uniseriat ve biserial vesikülün mikroskobik görünüm.

Tablo-I: <i>Aspergillus</i> türlerinde makroskopik (koloni rengi) ve mikroskopik görünüm (2)					
Türler	Makroskopik Görünüm (Koloni rengi)		Mikroskopik Görünüm		
	Yüzey	Taban	Konidiyofor	Fiyalid	Vezikül
<i>A. fumigatus</i>	Gri, mavi yeşil	Bronzdan beyaza	Kısa (<300µm), düz, renksiz veya yeşil	Uniseriate	Yuvarlak, kolumnar baş
<i>A. flavus</i>	Sarı-yeşil	Sarıdan kırmızı kahverengiye	Renksiz, pürüzlü	Uniseriate veya Biseriate	Yuvarlak, radyal baş
<i>A. niger</i>	Siyah	Beyazdan sarıya	Uzun, düz, renksiz veya kahverengimsi	Biseriate	Yuvarlak, radyal baş
<i>A. terreus</i>	Tarçın, kahverengine	Beyazdan kahverengine	Kısa (<300µm), düz, renksiz	Biseriate	Yuvarlak, sıkı kolumnar
<i>A. versicolor</i>	Başlangıçta beyaz, sonra sarı, bronz, soluk yeşil veya pembe	Beyazdan sarıya veya kırmızı mor	Uzun, düz, renksiz	Biseriate	Yuvarlak, dağınık radyal baş

2. 2. 3. Hücre Yapısı

2. 2. 3. 1. Hücre duvarı

Mantar hücresine şeklini veren kuvvetli bir yapıya sahiptir. Bu yapı mantarın dış çevre ile ilişkisini sağlamakta ve konak hücreleri ile temasta rol oynayan enzim ve antijenleri barındırmaktadır. Oldukça katı bir katman olan hücre duvarı, miçelyum ve konidiyayı fagositik hücrelerin öldürücü etkisinden, ultraviyole ışını, enzimatik yıkım, organik solventler, toksik kimyasallar ve kuruluğa karşı korumaktadır. 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 (28-30).

Hücre duvarının fibriler özelliğini kitin oluşturur. Bunlar, N-asetilglikozamin ve glikoz polimerlerinin β -(1,4) tarzında birleşmesinden

meydana gelmiş düz zincirlerdir. Glikoz polimerlerinin dallı olmaları ve hücre duvarının diğer komponentleri ile çapraz bağlar kurabilme yetenekleri, hücre duvarının kuvvetini ve sağlamlığını arttırmaktadır. Genel olarak kitin, polisakkarit yapıda olup bütün mantarların duvar yapısında bulunmaktadır. Duvarın dış yüzeyi, antijenlerin ve aglutininlerin substratlara, konağa ve diğer hücrelere adezyonunu ve birleşmesini sağlayan bir alandır. Duvarın en iç tabakası ise polisakkaritler, kitin, kitin-glukan kompleksi ve selülozdan oluşmaktadır. Duvarda bulunan başlıca polisakkaritler; β -(1-3) glukan, β -(1,6) bağlantıları ile dallanan β -(1,3) glukan, kitin, kitin- β -(1,3) glukan, α -(1,3) glukan, galaktofuran ve galaktomannandır (28-30).

Duvardaki proteinler, polisakkaritlere bağlı ya da serbest halde bulunurlar. Serbest olanlardan bazıları duvar sentezinde rol oynayan enzimlerdir. Duvar ile sıkı bağlantısı olan asit fosfatazlar, hücre bütünlüğünün bozulduğu durumlarda ortama salınan enzimlerdir. Lipidler ise; glikozilseramid ve galaktozilseramidten oluşmaktadır. Bu lipidler normal gelişim sürecindeki esansiyel yapıları oluşturmaktadır (28,29). Septum; hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzanarak karşı cidara kadar devam eder. Yapısı, hücre duvarının yapısı ile aynı özelliği gösterir. Septumun ortasında delik (por) yer almaktadır. Sitoplazmanın, bir kompartımandan diğerine geçirmesine izin verirken, çekirdeği geçirmez (30).

2. 2. 3. 2. Sitoplazma membranı

Sitoplazma membranı, hücre ve çevresi arasındaki iletişimi sağlar. Membrandan iyonların geçişi veya kimyasal grupların transferinde rol oynayan ozmoenzimleri barındırmaktadır. Aynı zamanda biyosentezde de rol oynamaktadır. İntrensik membran proteinleri olan proteaz, fosfolipaz C, protein G veya fosfoinositol, sinyal iletimi için reseptör görevi üstlenirler. Elektron mikroskopik incelemelerde sitoplazmik membran 3 tabakadan yapılmıştır ve ünit membran özelliği göstermektedir. Yapısında, fosfolipid, protein ve steroller (ergosterol) bulunur (30).

2. 2. 3. 3. Sitoplazma

Mantar hücresi, ökaryotik hücrelere benzer sitoplazma kompozisyonuna sahiptir. Sitoplazmada bulunan endoplasmik retikulumun etrafı, çift kat ünit membranla çevrilidir ve üzerinde ribozomlar bulunur. Protein sentezinde ve madde taşınmasında rolleri vardır (30). Vakuol yapıları içinde pigment ve amorf maddeler bulunur ve hücre duvarına yakın olarak yerleşim gösterirler. Sitoplazma içinde, hücre duvarının sentezinde ve lizisinde etkinlikleri olan enzimleri, inorganik elementleri, polisakkaridleri ve lipidleri içeren veziküllerde bulunmaktadır (30). Sitoplazma içinde hücrenin enerji merkezi fonksiyonunu üstlenen çok sayıda mitokondriyum bulunmaktadır (30). Ayrıca protein senteziyle ilişkili çok sayıda ribozom da bulunmaktadır. Bunlar, hücre sitoplazmasında serbest veya endoplasmik retikulumlar üzerinde bulunurlar. Ökaryotik özellik gösteren mantar ribozomları 80S (Svedberg ünitesi) (40 S + 60 S) sedimentasyona sahiptir (30).

Nükleuslar genellikle 2-3 µm boyutlarında olup normal ışık mikroskopları ile zor görünürler. Çekirdeğin etrafında çift katlı ve delikli bir membran bulunur. Her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın, çok genç ve çok çabuk üreyen hifalarda bazen birden fazla nükleusa rastlanabilir. Çekirdek içinde bulunan kromozom, DNA yapısında olup, birden fazla sayıdadır. Kromozomun yapısı ökaryotik ve prokaryotik hücre kromozomlarına benzerlik gösterir. DNA daki G + C oranı % 35-65 arası olup türler arasında bu sınırlar içinde farklar görülmektedir. Transkripsiyon ve translasyon olguları ökaryotiklerde olduğu gibidir. Çekirdekçik yapısında % 80 Ribonükleik asit (RNA) ve protein bulunmaktadır (30).

2. 2. 4. Antijenik Özellikleri

Aspergillus türlerinin iki önemli antijeni bulunmaktadır.

2. 2. 4. 1. Galaktomannan Antijeni

Mantar hücresinin duvarında bulunan ve ekzoantijen olarak hücre dışına salgılanabilen bir polisakkarittir. Galaktomannan (GM), dokuda hifal büyüme

esnasında salgılanan hücre duvar polisakariti olup, çözünebilir olduğundan idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral mayi gibi örneklerden de saptanabilmektedir (31). Çekirdek olarak adlandırılan mannan polimerleri ve yan zincir galaktofuran polimerlerinden oluşmuştur. Yan zincirde, dallanmış ve düz olmak üzere iki yapı vardır. Düz yapı β -(1,5) galaktofuranoz ve β -(1,4) galaktopiranozdan oluşmaktadır. Yan zincirdeki dallanmış yapı ise β -(1,5) ve β -(1,6) galaktofuranoz dan oluşmaktadır. GM antijeni arama testlerinde kullanılan monoklonal antikolar, β -(1,5) galaktofuranoz epitopuna bağlanmaktadır (28).

2. 2. 4. 2. β - (1-3)- D-Glukan

Bu antijenik yapı *Aspergillus* türleri başta olmak üzere maya ve küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür. Beta glukan antijeni, denizde yaşayan ve Horseshoe crab olarak bilinen ve özellikle de *Tachypleus tridentatus* ve *Limulus polyphemus* canlılarının doğal immün sistemi tarafından tanınabilmektedir. Bu canlılardan izole edilen faktör G, (1-3)- β -D-Glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon oluşturmaktadır. Beta glukan antijenini saptamaya yönelik testler bu temele dayanmaktadır. Serumdaki Beta glukan seviyesi, invazif aspergilloz ve diğer birçok fungal infeksiyonların erken safhalarında pozitifleşebilmektedir (32,33).

2. 2. 5. Virülans Faktörleri Ve Patojenite

2. 2. 5. 1. Isı toleransı (Termotolerans)
2. 2. 5. 2. Demir kazanımı
2. 2. 5. 3. Katalaz
2. 2. 5. 4. Pigment
2. 2. 5. 5. Gliotoksin
2. 2. 5. 6. Yıkıcı enzimler
2. 2. 5. 7. Fosfolipaz

Aspergillus'ların konağı istila edebilmesi için öncelikle konakçı dokuya tutunması ve penetre olması gerekmektedir. Mantarın, konağa yerleşmesinde ve infeksiyon oluşturmada birçok virülans faktörüne ihtiyaç vardır (34). Hastalık oluşmasında rol oynayan virülans faktörleri şunlardır:

2. 2. 5. 1. Isı toleransı (Termotolerans)

A. fumigatus, 37°C’de hızlı üreyebilmekte ve 50°C’ye kadar olan ısıları tolere edebilmektedir. Genel olarak normal vücut ısısında üreyebilen mantarlar daha patojen olarak bilinmektedir. Patojen ve patojen olmayan türlerin ayırımında bir kriter olarak kullanılabilir (35).

2. 2. 5. 2. Demir kazanımı

A. fumigatus’un konaktaki demiri kullanabilmek için proteinaz ve siderofor sentezlediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *A. fumigatus*’un serum içerikli besiyerlerindeki demir iyonunu kullanarak daha hızlı ürediği gösterilmiştir (36).

2. 2. 5. 3. Katalaz

Alveoler makrofaj ve polimorfonükleer hücreler (PMNL), mantarın öldürülmesinde görev yaparlar. Makrofajlar konidiyaları fagosite ederek, PMNL’ler ise fagosite edilemeyen hifal yapıları, ortama salgıladıkları sindirim enzimleri ile yok etmeye çalışırlar (37). Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen radikalleri (ROR, konidiyalar için toksik etkilidir. İmmün sistem hücreleri tarafından salgılanan bu enzimlerin zararlı etkilerinden kurtulabilmek için *A. fumigatus*’un 3 farklı katalaz enzimi sentezleyebildiği gösterilmiştir (37).

2. 2. 5. 4. Pigment

A.fumigatus konidiyası 1,8-dihidroksinaftalen benzeri melanin içermektedir. Bu melanin pigmenti; radyasyon, enzimatik yıkım, oksidanlar ve ısı değişikliklerine karşı koruma sağlayan hidrofobik yapıda, negatif yüklü bir makromoleküldür (38,39).

2. 2. 5. 5. Gliotoksin

Hif çoğalması sırasında *Aspergillus* tarafından oluşturulan bir metabolittir. İn vitro yapılan çalışmalarda, gliotoksinin makrofaj fagositozunu ve PMNL’ in oksidatif öldürme etkisi yanında sitotoksik T lenfosit aktivasyonunu inhibe ettiği

gösterilmiştir. Bu sayede *Aspergillus*'lar immün sistem hücrelerinden kaçabilmekte ve onların öldürücü etkilerinden kurtulabilmektedirler (40).

2. 2. 5. 6. Enzimler

A. fumigatus, infeksiyon süreci sırasında dokulardaki protein, elastin ve kollajeni tahrip etmek için alkalın serin proteaz, metalloproteaz, aspartik proteaz ve elastaz gibi litik enzimler salgılamaktadırlar (39).

2. 2. 5. 7. Fosfolipaz

Konak hücre membranının en önemli bileşenleri fosfolipidler ve proteinlerdir. Hücre membranındaki gliserolipidleri hidrolize edebilen fosfolipaz enzimleri, konak hücrenin tahrip edilebilmesinde rol oynamaktadırlar. Yapılan çalışmalarda *A. fumigatus* izolatlarının, fosfolipaz A yanında B, C ve D izoenzimlerini de sentezleyebildikleri gösterilmiştir (39,41).

2. 2. 6. Patogenez

Aspergillus'lar doğada ve çevremizde yaygın olarak bulunan saprofitik, konidiyaları ile çoğalan filamantöz mantarlardır. Konidiyaları hava yolu ile yayılarak her yere dağılabilmektedir. Uzak mesafelerden gelen konidiyalar insanlar tarafından gerek solunum gerekse bütünlüğü bozulmuş deri yolu ile alınabilmektedir (21). İnhalasyon, derideki çatlaklar ve intravenöz katater uygulamasının yapıldığı bölgeler en önemli giriş kapılarını oluşturmaktadır (42). *Aspergillus*'lar konak vücuduna girdiğinde allerjik cevap, hava boşluklarında kolonizasyon ve doku invazyonu gibi üç farklı klinik duruma sebep olmaktadır (4) *Aspergillus*'ların invazyon, kolonizasyon ve disseminasyonun da üç temel faktör rol oynamaktadır:(20)

1-Bağışıklığı zayıflatan hastalıklarda, hastaların fungal infeksiyonlara duyarlılığının artması,

2-Deri ve müköz membranlardaki lokalize lezyonların (insizyon, yırtık, sıyrık) en önemli giriş kapısı olması,

3-Terapötik amaçlı çeşitli antibiyotik ve hormonal kombinasyonların kullanılmasının sonucu olarak mantarlar ve bakteriler arasındaki ekolojik dengenin değişmesidir.

İnsanlarda hastalığa yol açan en önemli *Aspergillus* türleri; başta *A. fumigatus* olmak üzere *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* olmakla birlikte tüm olguların %90'dan *A. fumigatus* sorumludur. Bu nedenle sadece *A. fumigatus* baz alınarak hastalık patogenezinin bahsedilecektir (2). *A. fumigatus* sahip olduğu virülans faktörleri ile konak hücreye adezyonunu ve kolonizasyonunu sağlamakta, konağın bağışıklık mekanizmalarını etkisizleştirerek yaşamını sürdürmeye çalışmaktadır. Enfeksiyon oluşmasında hem organizmaya hemde konağa ait bir takım faktörler rol oynamaktadır (4).

2. 2. 6. 1. Organizmaya Ait Faktörler

A. fumigatus konidialarının uygun nem ve ısıda, orijinal hacimlerinin dört ile sekiz katı şişerek genişlemesi ve hif oluşturmaları patojenitede önemlidir. Sporun hifal forma dönüşmesi ile mantar, logaritmik faza geçer ve miçel yapılarını oluşturur. Bu sayede yoğun konidiya üretimi yaparak çevreye yayılım göstermektedir. 37°C'de üreme ve koloni oluşum hızları patojen ve patojen olmayan *Aspergillus* türlerini birbirinden ayırabilen önemli bir özelliklerdir. Örneğin *A. fumigatus* 37°C'de en hızlı üreyen türdür (4). Yine *A. fumigatus* konidiaları 2-5 µm çapında gri-yeşil renkte, dikensi çıkıntıları olan yapılardır. Boyutlarının küçük olması nedeniyle uzun süre havada asılı olarak kalabilir, solunumla alındıklarında akciğerin en derin noktalarına kadar ulaşabilmektedirler (15, 36, 43).

Konidialar olağanüstü bir şekilde atmosferik şartlara dayanabilmektedirler. Hidrofobik protein katmanı hem olumsuz dış çevre şartlarına dayanmayı hemde konak savunmasından kurtulmayı sağlamaktadır. Ayrıca patojen türlerin tümü özellikle de *A. fumigatus*, laminin ve fibrinojeni bağlayabilmekte ve bu sayede invazyon öncesi hava yollarına adezyonunu sağlayabilmektedir (15). Ayrıca konidyumlar, fibrinojen, laminin, fibronektin, albümin, kollajen ve surfaktan gibi proteinleri de bağlayabilmektedirler. Bu bağlanmada hidrofobik proteinler ve

karbonhidratlar rol oynamaktadır. Pigmentten yoksun olan *A. fumigatus*'un bazı kökenleri, yeşil konidyumlu kökenlerden daha az patojen oldukları belirlenmiştir. Sahip oldukları melanin pigmenti, mantarları konak savunmasından korumakta, in vivo canlı kalmada yardımcı olduğu tahmin edilmektedir (4).

A. fumigatus'ların ürettikleri sekonder metabolitlerden gliotoksin, makrofaj ve nötrofil fagositozunu engellediği, B ve T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca toksik etkili 18-kDa ribonükleaz (RNaz) ve 30 kDa hemolizin üretmektedirler. Ancak patojenitedeki rolleri tartışmalıdır. Mantarın konak dokusunda ilerleyebilmesi için çeşitli proteaz, ribotoksin ve fosfolipazlar salgılamaktadır. Ancak bunlarında patogenezdaki rolleri henüz aydınlatılmamıştır. *Aspergillus*'ların süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve mannitolde üretebildikleri gösterilmiştir. Bu moleküller mantarı ROR'dan koruyabilmektedirler (4).

2. 2. 6. 2. Konağa Ait Faktörler

Solunum yolu ile alınan konidiyalar öncelikle fiziksel bariyerler ve bronşiyal mukus gibi primer savunma mekanizmaları ile karşılaşmaktadırlar. Bu mekanizmalar özellikle büyük konidiyalara karşı etkili olmaktadır. Örneğin *A. flavus*'un konidiyaları yaklaşık 5 µm çapındadır. Çoğunlukla üst solunum yollarında yakalandıklarından dolayı en sık sinüzite neden olmaktadır. *A. fumigatus* ise daha küçük konidiyaları ile bu bariyerleri kolayca aşarak akciğerlere ulaşmakta ve akciğer infeksiyonlarına neden olmaktadır (44).

İmmün sistemi sağlam bireylerde, muko-silier aktivite ve fagositik alveoler makrofajlar, solunumla alınan konidiyaları fagosite ederek öldürmekte ve hastalık geliştirmesine engel olmaktadır. Makrofaj fagositozundan kurtulan konidiyalar ise hif yapısı oluşturmaya başlarlar. Bu durum bölgeye nötrofil göçünün artmasına neden olur. Nötrofiller tarafından fagosite edilemeyen hif yapıları da ortama sekrete edilen ROR ve vakuol degranülasyonu ile öldürülmektedir. Aspergillozlu bir hastada histolojik yanıt, immün sistemin durumuna bağlı olarak granümatöz cevaptan ciddi nekroza kadar değişebilmektedir (37).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda bu mekanizmaların etkin çalışmaması ya da yetersiz kalması durumunda, solunumla alınan *Aspergillus* konidiaları çok sayıda dallanan septalı hifler oluşturmakta, kan damarlarını invaze ederek enfarkt, tromboz ve nekroza neden olmaktadır (45). Hücre duvarında bulunan polisakkarit, protein ve lipidler antifagositer özellikte olup, miçelyum ve konidiyanın olumsuz çevre şartlarına dayanmasını sağlamaktadır. Proteinlerle birlikte polisakkaritler konak hücreye tutunmada rol oynarlar ve infeksiyonun gelişmesine katkıda bulunurlar (28,29). Hücre duvarındaki melanin pigmentide antifagositer özellikte olup, ROR'den korunma sağlar (46) .

2. 2.7. Metabolik Ürünler

Filamentöz mantarların insan sağlığına zararlı olan sekonder metabolitlerine mikotoksinler denilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı olmaları nedeniyle immün sistemi uyarımazlar (40,47-49). *Aspergillus*'lar yiyeceklerde bozulma ve çürümeye neden olan küflerdir. Yaklaşık 50 türünün toksik metabolitler oluşturduğu bilinmektedir. Mikotoksin oluşturan belli başlı türler; *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* ve *A. fumigatus*' tur. En önemli toksinleri; aflatoksin, okratoksin, sterigmatosistin, patulin, gliotoksin, sitrinin, siklopiazonik asit, ergot alkaloidler, fumagillin, helvolik asit, kojik asit, ribotoksiler ve tremorjenik toksinlerdir (40,50-52).

Aflatoksin ve okratoksin en önemlileri olup bunlardan aflatoksin, özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilmektedir. Bu toksinin 20'den fazla türü bulunmakla birlikte en toksik olanı aflatoksin B₁ dir. En etkili ve en kanserojen toksin olarak da bilinmektedir (53). Konakta, hepatotoksisite, hepatokarsinojenite, nefrotoksisite, teratojenite, mutajenite, DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu gibi hastalıklara yol açabilmektedirler. Okratoksin ise ilk kez *A. ochraceus*'un bir metaboliti olarak tanımlanmıştır. Kuvvetli nefrotoksikiteye sahip olup en sık rastlanan ve en toksik olanı ise okratoksin A' dır (49,52).

2. 2. 8. Üreme Şekilleri

Aspergillus 'lar da anamorfik ve telemorfik olmak üzere iki türlü üreme şekli görülmektedir.

2. 2. 8. 1. Anamorfik üreme

Üreme, farklılaşmamış bir hif bölgesinden ayak hücresi adındaki yapının gelişmesi ile başlamaktadır. Bu hücreden önce konidiofor, daha sonra da bu yapının apikal kısmının genişlemesi ile vezikül oluşur. Oluşan vezikülün üzerinden de tomurcuklanma ile fiyalidler ya da primer ve sekonder sterigmata tabakaları gelişmektedir. Fiyalidler, zincir şeklinde konidiya oluşturan hücrelerdir. Konidiya oluşumu, ısı, ışık, nem ve besin durumu gibi faktörlerden etkilenmektedir (27,54,55). Kısa sürede gerçekleşir ve oluşan aseksüel sporlar çevreye dağılarak, hızlı bir şekilde su ve hava ile yayılım gösterir (56,57).

2. 2. 8. 2. Telemorfik üreme

İki uygun çekirdeğin aynı hücre içerisinde füzyonu ile başlamaktadır. Hücre içerisindeki iki çekirdek önce mitotik bölünmeye uğrar, daha sonra dikaryotik hücrelerin oluşumu ve mayoz bölünme gerçekleşir. Mayoz bölünme sonrası askus keseleri oluşur. Her askus içinde 8 askospor bulunmaktadır. Askuslar ise klaystotesyum içerisinde bulunurlar. Askus, askospor ve klaystotesyumların şekli, rengi, sayısı tür ayrımında önemlidirler. Hülle hücreleri ise fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte klaystotesyumlar için besin kaynağı oldukları sanılmaktadır (54,58). Daha uzun sürede gerçekleşir ve komplike bir olaydır (27,57). Seksüel üreme yapılarının (klaystotesyum, hülle hücreleri) gelişimini izleyebilmek için telemorfik türlerin uygun besiyerlerinde ve yeterli sürede inkübe edilmeleri gerekmektedir. Oluşan bu yapılar, zor çevre şartlarında mantarın canlılığını sürdürmesini sağlayan yapılardır (24).

2. 3. KLİNİK

Aspergillus türleri insanlarda, genel olarak (i) opportunistik infeksiyon, (ii) allerjik hastalıklar ve (iii) toksikozlar olmak üzere üç farklı klinik durumun

oluşmasında rol oynamaktadırlar. İnsan vücudundaki hemen hemen tüm organ ve sistemleri tutabilmektedirler (24,59). Tablo-II’de *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar sınıflandırılmıştır (15).

Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz

Allerjik hastalık, alveolleri etkilediğinden “ ekstresek allerjik alveolitis” olarak tanımlanmaktadır. Atopik olmayan bireylerde, küf mantarına uzun süre ve yoğun şekilde maruz kalınması ile gelişir. Maruziyet sonrası öksürük, nefes darlığı, halsizlik ortaya çıkar (18,60,61).

Aspergilloma

A. fumigatus’a bağlı gelişen ve en sık rastlanan pulmoner aspergilloz formudur. Bu yapı, iyi drene olamayan akciğer alanları veya önceden geçirilmiş tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi gibi hastalıkların bir sekeli olarak oluşan kavitelere *Aspergillus* konidiya ve hifleri yanında yangısal hücreler, fibrin ve mukustan oluşan miçel topudur (18,60-62).

İnvazif Akciğer Aspergilloz

İnvazif aspergillozun en sık görülen klinik tipidir. Özellikle hematolojik maligniteleri olan ve yoğun kemoterapi altındaki hastalarda yüksek morbidite ve mortaliteyle sonuçlanan bir hastalıktır. Kemik iliği nakli yapılan hastalarda mortalite daha yüksek seyretmektedir. Risk faktörleri arasında derin nötropeni (<100 nötrofil/ml), uzun süre yüksek dozda kortikosteroid kullanımı, graft-versus host hastalığı, solid organ transplantasyonu sonrası akut rejeksiyonu sayılabilir (60-63). *Aspergillus* hiflerinin kan damarlarını invaze etme özelliğinden dolayı pulmoner aspergillozun değişik formlarında görülebilmektedir. Bunlar, nekrotizan bronkopnömoni, pulmoner hemorajik infarkt, kavite içi apseler ve granuloma şeklinde olabilir. Klinik olarak başlangıç sinsi ve genellikle ilk semptom ateştir (60-63).

Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz

Hastalığın oluşmasında altta yatan bir predispozan faktör yoktur. Kronik, kavitasyon ve aspergillomaya neden olan bir durumdur. Kesin tanı akciğer dokusunda hiflerin gösterilmesi ve kültürde *Aspergillus* üremesidir (62).

Dissemine Aspergilloz

İki veya daha fazla komşu olmayan organın tutulmasıdır. Klinik aspergillozun en ağır formudur. Lösemi ve kemik iliği transplantasyonu yapılan vakaların yaklaşık %30-40'da major organ infeksiyonunu izleyerek disseminasyon bildirilmiştir. Primer odak genelde akciğerler veya sinüslerdir. Ayrıca SSS, GİS, deri, karaciğer, böbrekler de tutulabilmektedir (64).

Kulak İnfeksiyonları

Otomikozis dış kulak yolunun mantar infeksiyonu olup tropikal ve subtropikal bölgelerde sık görülmektedir. En sık etken *A. niger*'dir. Timpanik membrana yakın bölgeden başlayan hif ve konidyalardan oluşan siyah kitle büyüyerek tüm kanalı doldurmaktadır (64).

Burun, Sinüs ve Göz İnfeksiyonları

Özellikle ılıman ve nemli iklimlerde yaşayanlarda ve diş hastalarında görülmektedir. Bu hastalarda, kronik sinüzit bulguları gösteren noninvazif sinüs aspergillozuna neden olmaktadır (60,61). İmmünsüpre bireylerde ise sinüs duvarının harabiyeti ile orbitaya ve beyin içerisine yayılım göstererek fulminan seyreden invazif sinüs aspergillozu gelişebilmektedir. Mortalitesi oldukça yüksektir (60).

Göz infeksiyonları için en önemli predispozan faktör travmadır. *Aspergillus*' lar gözde en sık infeksiyona neden olan mantar türüdür. Göz infeksiyonları, invazif sinüs infeksiyonlarının komplikasyonu olarak, travmatik keratit veya postoperatif olarak gelişmektedirler (61,64).

Diğer infeksiyonlar

Sinoorbital infeksiyonların, immünsüprese hastalarda dissemine olması ile SSS hastalıkları gelişebilmektedir. Tanı genelde postmortem konulmaktadır (65). Aynı hastalarda kemik aspergillozu görülebilmektedir (61,64,66). İntravenöz katater giriş bölgesi, kol ve bacağına takılan atellerin oluşturduğu travma, yanık bölgelerinde direkt inokülasyon veya hematojen yayılım sonucunda deri aspergillozu gelişebildiği de bildirilmiştir (64). Açık kalp ameliyatı sırasında havadan mantarın bulaşması sonucu oluşan *Aspergillus* endokarditi, nadiren de olsa dalak, periton, mikotik aort anevrizması, sindirim sistemi, tiroid, testis ve adrenal aspergillozu görülebilmektedir (64).

Tablo-II: *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar (15)

1. Allerjik aspergilloz

- a. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz
- b. Allerjik *Aspergillus* sinüziti

2. Saprofitik aspergilloz

- a. Pulmoner aspergilloma
- b. Sinüslerde mantar topu(sinüs aspergillomu)

3. Yüzeysel aspergilloz

- a. Otomikoz
- b. Onikomikoz
- c. Kutanöz aspergilloz (immünsüprese olmayan konakçıda)

4. Doku hasarı, cerrahi veya yabancı cisimle ilişkili infeksiyon

- a. Keratit ve/ veya endoftalmit
- b. Deri ve yumuşak doku infeksiyonu (ör. yanıklarda)
- c. Cerrahi alan infeksiyonu (ör. prostetik kapak endokarditi, karaciğer transplantasyonu sonrası yara infeksiyonu, subdural ampiyem)
- d. Yabancı cisimle ilişkili (Hickman kateteri veya diğer intravenöz kateterler, vasküler greft infeksiyonu, sürekli ambulator diyaliz kateteri)

5. İmmünsüprese konakçıda infeksiyon

- a. Primer kutanöz veya muköz membran aspergillozu
- b. Pulmoner aspergilloz
 - i. Akut invazif aspergilloz
 - ii. Kronik nekrotizan aspergilloz
- c. Hava yolları aspergillozu
 - i. Tıkayıcı bronşiyal aspergilloz
 - ii. İnvazif *Aspergillus* trakeobronşiti
- d. Nazal veya paranazal sinüzit (rinosinüzit)
- e. Dissemine aspergilloz, özellikle serebral aspergilloz

2. 4. TANI YÖNTEMLERİ

Aspergillus'lar mantarlar aleminin *Hypohomycetes* sınıfının *Moniliaceae* ailesinde yer alırlar. *Eumycetes* grubu mantarlardan olup, küf fazında ürerler (25). Günümüzde 180'den fazla tür içeren *Aspergillus* cinsi mantarlar, insanlarda fırsatçı infeksiyonlara yol açarlar. Olguların %90'ından sorumlu olan ve en sık izole edilen türler, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. terreus*'dur (1,67,68).

Nadiren infeksiyon oluşturan türler ise; *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulatus*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Neosartoria fischeri*' dir (4).

Aspergillus türlerinin etken olduğu hastalıkların tanısı yapılırken, bir takım zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu mantar cinsi doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Laboratuarda ki kültür işlemleri sırasında kültür plağını çok rahat kontamine edebilmektedirler. Rutin mikrobiyolojik kültürlerde, *Aspergillus* türü mantar kolonilerine rastlanması durumunda; infeksiyon, kolonizasyon ve kontaminasyon olasılıkları ayrı ayrı irdelenmelidir (65,67,69). Bu nedenle laboratuvara gelen klinik materyallerin direkt veya boyalı mikroskopik incelemeleri büyük önem taşımaktadır (70). *Aspergillus* tanısında şu yöntemler kullanılmaktadır.

2. 4. 1. Direkt Tanı Yöntemleri

Direkt tanı yöntemleri dört başlıkta incelenebilir:

2. 4.1.1. Mikroskopik İnceleme

Nativ preparat hazırlanması ve gram boyama dokulardaki *Aspergillus* türlerini göstermekte kullanılan metodlardır.

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. Bu işleme klarifikasyon denmektedir. Nativ preparatın mikroskopik incelenmesinde mantar sporları ve dallanma yapan septalı hiflerin görülmesi *Aspergillus* türü mantar olasılığını her zaman düşündürmelidir (65,71).

Kalkoflor ve Blanophor; mantar hücre duvarını boyayarak görünmelerini sağlayan maddelerdir. %10-20 KOH ile yapılan klarifikasyon işlemi, kalkoflor beyazı veya Blanophor ile karıştırılarak birlikte hazırlanırsa, floresan mikroskopta hifal yapılar daha net görünür hale getirilebilmektedir. Örnek içerisinde 45 derecelik açılma yapan hiyalen görünümlü, septalı hiflerin görülmesi *Aspergillus*'lar için tipik özelliklerdir (65,67,71,72).

Gram boyama; Klinik örneklerin rutin bakteriyolojik gram boyası ile boyanmasında *Aspergillus*'lara ait septalı hif ve konidialar gram pozitif boyalı olarak görünürler (65).

2. 4. 1. 2. Kültür

Direkt mikroskopide görülen hifal yapıları, aspergillozisle bağdaştırabilmek için kültürde *Aspergillus*'ın izolasyonu gerekmektedir. Balgam, bronkoalveoler lavaj, sinüs ponksiyon aspiratı, akciğer doku biyopsisi gibi solunum yolu örnekleri yanında kan, yara, idrar örnekleri kültür ekimleri için kullanılabilir örneklerdir. *Aspergillus*'ların neden olduğu endokarditlerde, etkenin kan kültüründe üreme olasılığı yüksektir ve tanıda önemlidir (70). Laboratuvara gelen klinik örneklerden

izolasyon ve identifikasyon kültürleri yapılır. İzolasyon kültürlerinde *Aspergillus*'ların eşeysiz şekillerini, identifikasyon besiyerlerinde ise telemorf şekillerini görmek mümkündür. İzolasyon için bakteriyel kontaminantların üremesine engel olmak için gentamisin veya kloramfenikol ilaveli Sabouraud kanlı agar, Sabouraud- dekstroz agar (SDA), Patates-dekstroz agarda (PDA), inhibitör mould agar kullanılırken; üreyen *Aspergillus* cinsi mantarın türünün belirlenmesinde ise malt-extract agar, corn-meal agar veya Czapek agar'dan birisi kullanılmaktadır (73).

Klinik örneklerin uygun bir izolasyon besiyerine ekimleri yapıldıktan sonra kültür plakları 25-30°C'de aerobik olarak, nemli ortamda, dört hafta inkübasyona bırakılmaktadır. Bu süre sonunda üreme olmazsa kültür negatif olarak sonuçlandırılır (24,59). Hızlı üreyen bazı küf mantarlarının üremesini engellemek ve bir ölçüde besiyerinin seçiciliğini arttırmak için mantar besiyerlerine ilave edilen sikloheksimid, *Aspergillus* türlerinin üremesini inhibe edebilmektedir. Bu nedenle *Aspergillus* şüpheli örneklerin kültür ekimleri, sikloheksimid içermeyen besiyerlerine yapılmalıdır (3,59,71).

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 yada PDA' da, 30-37°C' de ve 36-48 saatlik inkübasyonlardan sonra gerçekleşmektedir. Ancak bazı türlerde sporulasyonun gerçekleşebilmesi için daha uzun sürelerle ihtiyaç duyulabilmektedir (59,65,67,72).

Aspergillus türleri termotoleran olup, insanlarda hastalık oluşturan türler, birçok besiyeri vasatında hızla üreyerek kolonilerini oluşturabilmektedirler. Örneğin insanlarda invazif infeksiyona neden olan *A. fumigatus* 45°C'de bile üreyebilmektedir (3). Oluşturdukları koloninin rengi, büyüklüğü ve termotoleransı identifikasyonda yol gösterici olmaktadır. Kültürde üreyen koloniden hazırlanan laktofenol pamuk mavisini preparatında *Aspergillus*'lara spesifik septalı hif, konidiyoforum ucunda vezikül yapısı ve vezikülün üzerini kaplayan fiyalidler ve bunların ucundan çıkan konidiyaların görülmesi tanı açısından önemlidir.

Mikroskopik olarak konidiyum ve konidiyofor özellikleri türlerin tanımlanmasında kolaylıklar sağlamaktadır (24,71). Ağır ve uzun süreli nötropeni olan, uzun süre kortikosteroid kullanan ve lösemi hastalarından alınan örneklerde *Aspergillus* izolasyonu, yine tekrarlayan örneklerde aynı etkenin izole edilmesi ve kültürde çok fazla sayıda aynı tip koloni üremesi *Aspergillus*'ların etken olduğu invazif aspergillozis lehine bulgular olarak değerlendirilebilir (74).

2. 4. 1. 3. Moleküler Yöntemler

Moleküler tanıda, mitokondriyal ve ribozomal DNA genleri tercih edilmektedir. Ancak mitokondriyal DNA genleri, ribozomal DNA genlerine göre daha fazla değişkenlik göstermeleri nedeniyle tür düzeyindeki tanımlamalar için uygun görülmemektedir (75). Moleküler teknikler, fenotipik yöntemlere göre türleri daha iyi ayırabilmektedir. En ayrıntılı tanımlamalar (ribozomal ribonükleik asit) rRNA nükleotid dizilerinin küçük subüniti (18S-SSU) ile büyük subünitinin (26S-LSU) karşılaştırılması ile elde edilmiştir (23). Moleküler tanıya yönelik literatürde; klasik PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), nested-PCR, Real-time PCR gibi yöntemlerle yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (76,77).

Klasik PCR; hedef organizmanın belirli bir nükleotit dizisini, primerler, dNTP'ler ve polimeraz enzimini kullanarak, denatürasyon- yapışma- sentezlenme siklusları ile çoğaltılması ve çoğaltılan nükleik asitlerin agaroz, poliakriamid jel elektroforez ya da etidyum bromürle boyanan jelde gözlenmesini sağlayan moleküler test yöntemidir (78).

Nested-PCR; yüksek duyarlılık gereken hedefler için uygulanan PCR yöntemidir. İki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada bölgeye özgü primerler kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilir. İkinci aşamada ise birinci turda çoğaltılan bölgenin içinde bir bölge hedef alınarak buraya özgü primerlerle, PCR'ın yapıldığı yöntemdir (78).

Real-Time PCR; nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç alınabilen PCR yöntemidir (78).

Aspergillus'lar için henüz standardize edilmiş bir PCR yöntemi bulunmamaktadır. Literatürde tanımlanmış protokollerde bir standardizasyonun olmaması nedeniyle PCR tekniği, European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC) tanımladığı klasik invazif mantar infeksiyon tanı kriterleri arasında yer almamaktadır (79).

Real Time PCR, infeksiyonun erken safhalarında mantar DNA'nı saptamaya imkan sağlayan bir tekniktir. Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastaların serum örneklerinde yapılan prospektif çalışmalarda yüz güldürücü sonuçlar rapor edilmesine rağmen standardizasyonun hala sağlanamamış olması yaygın kullanımını sınırlamaktadır (80). Moleküler tanı için bronkoalveoler lavaj, kan ve doku örnekleri kullanılabilir (76). Moleküler testlerdeki yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik problemleri nedeniyle, testlerin tek örnek yerine birden fazla örnekte çalışılması önerilmektedir (81).

PCR temelli amplifikasyon yöntemlerinin, klinik örneklerdeki mantar DNA'nın 1-10 fg'nı saptayabildiği bildirilmektedir (77). Kan örneklerinden real-time PCR, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve (1-3)- β -D-glukanın karşılaştırdığı çalışmada, invazif pulmoner aspergillosis tanısı almış hastalardaki spesifiteler sırası ile % 92, % 97 ve % 84 olarak saptandığı bildirilmektedir (76).

2. 4. 1. 4. Histopatolojik İnceleme

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, Periyodik asit- Schiff (PAS) gibi yöntemlerle boyayarak doku içerisindeki hifal yapıları göstermek mümkündür (82). Klinik materyallerin mikroskopik incelemesinde ve doku biyopsi örneklerinden septalı hifal yapıların görülmesi ve mantar kültüründe de *Aspergillus* üremesi tanıyı desteklemektedir. Dallanan bakteriler olarak bilinen *Nocardia*'lar, özellikle solunum örneklerinde en çok yanığa sebep olan bakterilerdir. Bu nedenle örneklerin modifiye Kinyoun asit fast ile boyanması yardımcı olabilmektedir (65,67,69,72).

2. 4. 2. İndirekt Tanı Yöntemleri

İndirekt tanı yöntemleri, *Aspergillus*'a ait bir takım antijen yapılarının tesbit edilmesine yönelik tanı testleridir. *Aspergillus* infeksiyonlarının direkt tanı yöntemleri ile tesbiti her zaman mümkün olmamaktadır. Bunun nedeni ampirik yada profilaktik antifungal kullanımı sonucu *Aspergillus* kültürünün negatif olması yada kültürde üreyen *Aspergillus* türünün gerçekten infeksiyon etkeni olup olmadığının değerlendirilememesidir. İnvazif aspergillozda mortalite oranlarını düşürmek ve erkenden antifungal tedavi başlamak için hastalığın erken tanısı büyük önem arz etmektedir (83).

Antijen saptamaya yönelik birçok yöntem tanımlanmıştır. Ancak hastalardan ardışık örnek alma zorunluluğu bu metodların sensitivitesini sınırlandırabilmektedir. Sistemik *Aspergillus* infeksiyonlarının tanısında kullanılacak serolojik testler immüdifüzyon, ELİSA, Radio İmmünassay Assay (RİA), İmmün Floresan Antikor Testi (İFAT)'dir (73,84). Antijen saptamaya yönelik kullanılan ilk test, vücut sıvılarında *Aspergillus*'ların ekzoantijeni olan GA saptanmasıdır. GA, invazif aspergillozun erken tanısında bir tarama testi olarak kullanılabilir (85).

İnvazif aspergillozis'in tanısı için Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (MSG) ve EORTC tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında GA bulunmaktadır. GA, klinik bulgular ortaya çıkmadan 5-8 gün öncesinden pozitifleşebilmektedir (86). Bu antijeni saptamaya yönelik piyasada rat monoklonal antikorlarının kullanıldığı sandwich ELİSA kitleri bulunmaktadır. Sensitivitesi oldukça yüksek olan bu yöntemle, test edilen serum örneklerindeki GA'nın en az 1 ng/ml'si saptanabilmektedir (80).

Yapılan bir çalışmada yöntemin sensitivite ve spesifitesinin sırası ile % 50-92.6 ve % 94-99.6 olduğu, erişkin serumlarında yanlış pozitiflik oranının ise % 5.7-14 olduğu bildirilmektedir (31). Sandviç ELİSA yönteminin hem çok duyarlı hemde klinik çalışmalarla uyumlu birliktelikler gösterdiği ve serum

örneklerinin incelemeler için en iyi örnek olduğu bildirilmektedir (87). RIA ve Lateks Aglütinasyon (LA) testleri de GA saptayan diğer metodlardır. LA, ELİSA'dan daha yüksek GA değerlerini saptayabilmektedir (31). Hasta serumlarında GA'nın arandığı bir çalışmada sandwich ELİSA ile LA karşılaştırılmıştır. Düşük sensitivitesinden dolayı LA metodunun güvenilir bir yöntem olmadığı bildirilmiştir (88).

Serebral aspergillozisli hastaların beyin-omurilik sıvılarından ELİSA yöntemi ile yapılan GA araştırmasında, hastaların BOS'dan yüksek oranda GA seviyeleri saptandığı ve serebral aspergilloz tanısı için GA'nın kullanılabilceği bildirilmiştir (88). *Aspergillus*'ların hücre duvarında bulunan bir diğer komponentte (1-3)- β -D-glukan'dır. İmmünolojik molekül olmamasına rağmen tanıda kullanılmaktadır Testin en önemli dezavantajı belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır (84,89). 1995 yılında hematolojik maligniteli hastalarda invazif aspergilloz tanısına yönelik yapılan çalışmada beta-glukan testinin duyarlılığı %90 özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir (90). ELİSA ile yapılan bir başka çalışmada da β -glukan antijeniyle elde edilen sonuçların, GA antijeni ile elde edilen sonuçlarla çok yakın paralellik gösterdiği bildirilmektedir (91).

Doku kesitlerindeki mantar hiflerine spesifik olarak bağlanan poliklonal veya monoklonal antikorların kullanıldığı immünohistokimyasal yöntemler de kullanılabilir. Ancak kullanılan poliklonal antikorların diğer mantar türleri ile çapraz reaksiyonlar vermesi ve monoklonal antikorların ise tanıda yetersiz kalması yöntemin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır (83).

2. 5. TEDAVİ

Hem oral hemde topikal etkili poliyen grubu antifungal olan nistatin, 1951 yılında bulunmuştur. Poliyen grubundan bir antibiyotik olan amfoterisin B ise 1956 yılında bulunmuş ve sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur. Bir yıl sonra sitostatik bir ilaç olan flusitozin, mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. En son 1980 yılında geniş spektrumlu flukonazol ve

ittrakonazol piyasaya sürülmüştür. Tablo-III'de antifungallerin etki mekanizmaları gösterilmektedir (92,93). İmmün düşkün bireylerde *Aspergillus*' lara bağlı gelişen invazif aspergillozun prognozunun kötü seyretmesi ve %85 varan oranlarda mortalite ile sonuçlanması antifungal ilaçların önemini arttırmıştır (93) .

Tablo-III: Antifungallerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması	
Etki	İlaç
Nükleik asit sentezini inhibe edenler	5-florositozin
Sterol halkasına bağlanarak hücre membranını etkileyenler	Poliyenler
14 α dimetilaz bağımlı sitokrom P-450' yi inhibe edenler	Azoller
Squalen epoksidaz inhibitörü (Ergosterol sentezi inhibitörü)	Allilaminler
β -(1-3) D-glukan sentaz inhibitörü	Ekinokandinler

Aspergillus infeksiyonlarının sağaltımında temel olarak poliyenler, azoller ve ekinokandinler olmak üzere 3 grup antifungal ilaç kullanılmaktadır (92).

Poliyen grubu antifungal ajanlar

Hücre zarındaki ergosterole bağlanarak zarın permeabilitesini bozar ve zar üzerinde porlar oluşturarak mantarın ölümüne neden olurlar. Amfoterisin B bu grupta yer alır ve invazif mantar infeksiyonlarının tedavisinde onaylanmış standart ilaçtır. Yeni geliştirilen ilaçların etkinlikleri ve güvenilirlikleri bu ilaçla karşılaştırılarak yapılmaktadır. İlacın nefrotoksik etkisini azaltmak için lipid bazlı 3 farklı formülasyonu vardır (93). Yüksek konsantasyonlarda hücre duvar sentezinde görevli kitin sentaz enziminide inhibe edebilmektedir (94). *A. terreus*, amfoterisin B' ye intrensek dirençli bir türdür. Bu nedenle *A. terreus* ile oluşan infeksiyonlarda artışlar bildirilmektedir (95). Direnç mekanizması; hücre zarındaki lipid yapısının değişmesi, hücre duvarında bulunan β -(1-3) glukan içeriğinin değişmesi ve artmış katalaz aktivitesi direnç gelişmesine yol açabilmektedir (96).

Azol grubu antifungal ajanlar

Etkilerini sitokrom p-450 14 α lanosterol dimetilaz enzimini (ergosterol sentezinde görevli enzim) inhibe ederek hücre membranının yapısını bozar ve hücre ölümüne neden olurlar. Azollerle sık karşılaşma, ilaca direnç gelişmesinde en önemli risk faktörüdür. Bu grup içerisinde flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol gibi ilaçlar bulunmaktadır (93).

Yapılan çalışmalar da uzun süre itrakonazol kullanan hastalarda dirençli klinik izolatlar rapor edilmektedir. Vorikonazol ve posakonazol benzer etkili geniş spektrumlu azol grubu antifungallerdir. *Aspergillus*'lara karşı fungusidal etki yaparlar (93). Direnç mekanizması; 14 α lanosterol dimetilaz enziminde mutasyon, enzimin fazla eksprese edilmesi, ilacın hücreye alınmasında azalma, efluks pompası azol grubuna karşı direnç gelişmesinde etkili faktörlerdir (96).

Nükleik Asit Sentez İnhibitörü antifungal ajanlar

Florositozin bu gruptandır. Hücre duvarında 5-florourasile dönüşerek RNA'nın yapısındaki urasilin yerine geçer. DNA ve protein sentezini inhibe eder. Küf mantarlarına etkisi çok sınırlıdır (93).

Alillamin grubu antifungal ajanlar

Etkilerini skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek göstermektedirler. Sonuçta ergosterol sentezi inhibe olur (93).

Ekinokandinler grubu antifungal ajanlar

Bu grupta yer alan Kaspofungin, hücre duvarında yer alan β -(1-3) glukan sentetaz enzimini inhibe ederek fungusidal etki gösteren bir ilaçtır. 2001 yılında FDA tarafından diğer tedavilere yanıtız veya tolere edemeyen invazif aspergilloz vakalarında kullanımı onaylanmıştır. Mikafungin ve anidulafungin de benzer etkinliğe sahip diğer ilaçlardır (93).

2. 6. EPİDEMİYOLOJİ

Aspergillus'lar, dünyanın özellikle kuzey yarım küresinde (Antartika dahil) olmak üzere dünyanın her tarafında yaygın olarak bulunan küf türü filamantöz mantarlardır. Hava, toprak, ev tozu, kazı, yıkım, yapım ve onarım gibi inşaat işlerinin yapıldığı alanlar da bulunurlar. Sahip oldukları enzimlerle organik maddeleri parçalayarak kullanır ve çürümeye yol açarlar. Düşük nem oranlarında bile üreyebildikleri için depolanmış tahıl ambarları ve unlar gibi çok çeşitli gıda ve eşyalar üzerinde de bulunabilmektedirler (25,97,98).

Aspergillus'lar hastane ortamında da bulunabilmektedir. Yapılan çalışmalarda havalandırma sistemleri, yer döşemeleri ve süs bitkilerinden ayrıca hastane içi ortam havasından alınan örneklerde de bu mantarlar saptanmıştır. Hastane içi ve çevresindeki yıkım, onarım, bakım gibi inşaat işlerinin varlığı, yüzeylerde birikmiş olan kontamine tozların etrafa yayılmasını kolaylaştırmakta ve ortam havasındaki konidiya yoğunluğunu arttırmaktadır. Bu durumun, yüksek riskli hastalarda gelişen hastane kaynaklı invazif aspergilloz hastalığı ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (1,99). Bu genus içinde 180'den fazla tür bulunmaktadır. Bu küflerin sadece bir kısmı insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilmektedir. *Aspergillus*'ların neden olduğu hastalıklara aspergillozis adı verilmektedir (97,98).

Almanya'da ki bir eğitim hastanesinde 1978-1992 yılları arasında yapılan bir postmortem otopsi çalışmasında, %4 invazif aspergilloz saptanmıştır. Japonya'da 1970-1995 yılları arasında yapılan otopsi çalışmasında, invazif aspergillozis insidansı, %1.4 olarak bulunmuştur (15). 1980-1990 yılları arasında National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) verilerine göre, hastane kökenli *Aspergillus* infeksiyon oranının %1.3 olduğu bildirilmiş olsada, kemik iliği transplantasyonu yapılan ünitelerde infeksiyon oranının %36 olduğu bildirilmektedir (71).

Ülkemizde bu güne kadar *Aspergillus* infeksiyonları ile ilişkili direkt, serolojik, moleküler tanı ve kültür çalışmaları yapılmıştır. Türkiye'de ilk aspergilloz olgusu 1923 yılında, akciğer aspergilloz'una ilişkin ilk olgu ise 1956 yılında bildirilmiştir. Akciğer aspergilloz'una ait ilk serolojik çalışma ise 1972 yılında yapılmıştır. 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 (100).

Aspergillus'lar en fazla hava kaynaklı potansiyel patojen olarak bildirilmektedir. Bu cinsin üyeleri halen lösemi tedavi merkezlerinde ve solid organ transplantasyonu yapılan ünitelerde başta gelen ölüm sebebi olarak bildirilmektedir (99). Kanser hastalarına yoğun kemoterapi uygulanması, yüksek immünsüprese ilaç rejimleri, profilaktik yada ampirik geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması, uzun süreli parenteral beslenme ve AIDS'in yaygınlaşması gibi predispozan faktörler, invazif aspergillozis'li hasta sayısında dramatik bir artışa neden olmuştur.

Spesifik tanı metodlarının ve tedavi rejimlerin hala sınırlı olması nedeniyle invazif aspergillozis'te mortalite %30-90 oranında seyretmektedir (101). Bu nedenle sürveyans çalışmalarında hastane havasındaki *Aspergillus* konidiya yoğunluğunu saptayabilmek için belirli aralıklarla hastane içi hava örneklerinin toplanması gerekmektedir. İnvazif aspergilloz hastalığının oluşmasında spor konsantrasyonunun eşik değeri üzerinde henüz tam bir fikir birliği yoktur. Ancak korunmuş odalarda ki 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 (102).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Afyonkarahisar bölgesindeki hastanelerin on farklı ünitesinden Ekim 2006-Eylül 2007 tarihleri arasındaki sonbahar-kış-ilkbahar ve yaz aylarında olmak üzere periyodik olarak hava örneklerinin toplanması planlanmıştır. Daha sonra belirlenen günlerde her hastaneye ait mevcut birimlerden hava örnekleri toplanmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda 11 farklı türde toplam 118 *Aspergillus* suşu izole edilmiştir. Standart suş *Aspergillus niger* ATCC 9142 ile birlikte izole edilen tüm *Aspergillus* izolatlarına antifungal duyarlılık çalışması yapılmıştır.

3.1. KAYIT İŞLEMLERİ

Çalışmamıza Afyonkarahisar bölgesinde Sağlık Bakanlığına bağlı Afyonkarahisar Devlet Hastanesi (ADH), Kocatepe Devlet Hastanesi (KDH) ve Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi (GHH) ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Araştırma ve Uygulama Hastanesi (ANS hastanesi) olmak üzere toplam dört hastane dahil edilmiştir. Hava örneklerinin toplanacağı hastane birimleri olarak, hastane dışı, hastane içi, hastane girişi, acil servis, poliklinikler koridoru, göğüs hastalıkları servisi, ameliyathane girişi, dahiliye yoğun bakım, kardiyovasküler cerrahi yoğun bakım ve yenidoğan yoğun bakım olmak üzere on farklı birim seçilmiştir. Hastane yönetimleri ile görüşmeler yapılarak çalışmamız hakkında bilgilendirmeler yapıldı ve gerekli izinler alındı. Daha sonra her hastane ve o hastaneye ait on farklı birimin adları ile izole edilen *Aspergillus* türünün, koloni sayısının ve makroskopik morfoloji özelliklerinin kayıt edileceği tablolar hazırlanmıştır.

3. 2. ÖN HAZIRLIK

Gerekli malzemeler; 26°C'ye ayarlı etüv, Klass II air flow laminer kabin, hava toplama cihazı (Air/IDEAL 90 mm biocollector/BioMerieux, Fransa), hava toplama cihazının filtre aparatını sterilize etmek için kaynatma kabı, higrograf,

2 adet 1 litrelik balon joje, beher, toplanacak örnek sayısı kadar 90 mm çapında plastik steril petri kutusu, yeteri miktarda PDA ve Czapek-Dox besiyeri ve sterilizasyonu için otoklav hazırlandı. Antifungal çalışması için de yeterli sayıda steril 15 ml'lik plastik falkon tüpü, 10 ml'lik steril cam tüpler, spektrofotometri cihazı, 96 kuyucuklu steril mikroplate'ler, 100 µl ve 1000 µl'lik pipet ve yeteri miktarda steril 100 µl ve 1000 µl'lik pipet ucu temin edildi. İnokülüm hazırlamada ve antifungal dilüsyonlarda kullanılmak üzere ise hazırlanan standart besiyeri RPMI 1640'ı (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), 20 ml'lik steril plastik enjektör ve RPMI 1640'ın sterilizasyonu için 0.22 µm çaplı membran filtreler, pH metre, laktofenol pamuk mavisi çözeltisi, selofan bant, lam temin edildi.

3. 3. BESİYERİ HAZIRLANMASI

PDA besiyerini hazırlamak için 39 gram toz PDA hassas terazide tartıldı ve 1 litrelik balon joje içine aktarıldı. Üzerine 1 litre distile su ilave edilerek su banyosu içerisinde eriyinceye kadar bekletildi. Tam homojenizasyon sağlandıktan sonra besiyeri 1 atmosfer basınç ve 121 °C'ye ayarlanmış otoklavda 20 dakika beklenerek sterilize edildi. Daha sonra sterilize edilen PDA çözeltisi yaklaşık 50 °C'ye kadar soğuduktan sonra 2cc gentamisin 40 mg ilave edildi. Daha sonra steril petrilere 4 mm kalınlık oluşturacak şekilde döküldü ve besiyerinin katılaşması beklendi. Katılaştıran besiyerleri + 4°C'de muhafaza edildi. Czapek-Dox agar'da aynı şekilde litrede 45.4 gram olacak şekilde hazırlandı. Ancak herhangi bir antibiyotik ilavesi yapılmadı.

3. 4. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Hava örneklerini toplamak için Air/IDEAL 90 mm biocollector cihazı kullanıldı. Bu cihaz; çalıştırıldığında 30 saniye içinde 50 litre havayı aspire ederek delikli filtre aparatının altına yerleştirilen PDA besiyerinin üzerinden geçirebilmektedir. Bu cihazda kullanılan filtre aparatı 5 µm'den küçük partiküllerin geçişine izin verecek şekilde tasarlanmıştır. Bu sayede ortam havasında bulunan 2-5 µm çapında ki mantar sporlarının bu deliklerden geçerek

besiyeri ortamına inokülasyonu sağlanmıştır. Besiyeri olarak 40 mg gentamisin ilave edilmiş PDA besiyeri kullanılmıştır. Sistematik olarak her hastanenin önceden planlanmış bütün bölümlerinden, bu cihaz yardımı ile hava örnekleri toplandı. Olası karışıklıkları önlemek içinde her PDA besiyerinin üzerine farklı kodlamalar yapıldı. Önceden hazırlanmış toblolara da aynı kodlamalar yazılarak düzenli kayıtlar oluşturuldu. Tüm örnekler toplandıktan sonra bütün PDA besiyerleri 26°C'ye ayarlı etüv de bir hafta süreyle, nemli ortamda inkübasyona bırakıldı.

3. 5. DEĞERLENDİRME VE İDENTİFİKASYON

İnkübasyon sonrası üreyen kolonileri saf olarak elde etmek ve izolasyon ve identifikasyon işlemlerini sağlıklı yapabilmek için üreyen bütün küf kolonilerine ayrı ayrı harf kodlaması yapılarak her koloniden çengel öze ile bir miktar örnek alındı ve uygun harf kodlamasının yapıldığı PDA ve Czapek-Dox agara eşzamanlı batırma ekimleri yapıldı. Yine aynı koloniden çengel öze ile örnek alındı ve mantar stoğu oluşturmak içinde, içerisinde 2 ml steril distile su bulunan 5 ml'lik kapaklı cam tüplere konuldu. Bu şekilde hazırlanan bütün stok tüpler antifungal duyarlılık çalışmasında tekrar kullanılmak üzere oda ısısında bekletildi. Ekimi yapılan besiyerleri ise 26°C de 5 gün süreyle, nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. PDA besiyeri *Aspergillus*'ların pigment oluşumunu ve sporlanmasını daha iyi sağladığı için, Czapek-Dox agar (%3 sukroz) da seksüel üreme yapılarını oluşturabildiği için tercih edilmiştir. İnkübasyon sonrası PDA ve Czapek-Dox agarda ki koloniler incelendi. Makroskobik değerlendirme çıplak gözle normal ışık altında yapıldı. Mikroskobik değerlendirme içinde yaklaşık 4 cm uzunluğunda ki selofan band, küf koloninin üzerine bastırılarak çekildi ve üzerine bir damla laktofenol pamukmavisi damlatılan lama yapıştırıldı. Daha sonra mikroskobun 40X objektifi ile inceleme yapıldı. Mikroskobik olarak, septalı hif, konidyofor, vezikül, vezikül üzerinde tek yada çift sıra dizilimli fiyalidler ve konidyumun rengi, şekli, düz yada pürtüklü olması ve septa varlığı gibi mikroskobik özellikler araştırıldı. Makroskobik ve mikroskobik görünümüne göre izole edilen *Aspergillus*'lar türlerine ayrıldı. Bütün değerlendirme sonuçları düzenli olarak

önceden hazırlanmış tablolara kaydedildi. Kullanılan besiyerleri ve içerikleri aşağıdaki gibidir:

Czapek Dox Agar (Oxoid, 45.4 g/L ; CM 97,UK)

Sodium nitrat	2.0 g/L
Potassium chloride	0.5 g/L
Magnesium glycerophosphate	0.5 g/L
Ferrous sulphate	0.01 g/L
Potassium sulphate	0.35 g/L
Sucrose	30.0 g/L
Agar	12.0 g/L
pH	6.8+/- 0.2

Potato Dextrose Agar (PDA - Oxoid, 39 g/L; CM 139,UK)

Potato extract	4.0 g/L
Glucose	20.0 g/L
Agar	15.0 g/L
pH	5.6 +/- 0.2

Lactophenol Blue Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, France)

3. 6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK ÇALIŞMASI

Filamentöz fungusların sıvı dilüsyon antifungal duyarlılık deneyleri için Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)'nin önerdiği M38-A'nın referans bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Bu yöntem *Aspergillus spp.* de dahil *Fusarium spp.* *Rhizopus arrhizus* ve *Sporothrix schenckii* ve diğer oportunistik küf patojenlerini de içeren ve invaziv fungal infeksiyonlara neden olan filamentöz fungusların duyarlılık testleri için uygun görülen standart bir yöntemdir. Çalışmaya alınan *Aspergillus* türlerinin amfoterisin B (AMB), flukonazol (FLU), itrakonazol (ITR) ve vorikonazol'e (VOR) karşı antifungal duyarlılık deneylerinde, CLSI tarafından önerilen M38-A mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı (103). Çalışmada kalite kontrol suşu olarak *A. niger* ATCC 9142 kullanılmıştır

3. 6. 1. Antifungal İlaç Miktarlarının Tartılması

Tüm antifungaller standart ünite dozlarda hazırlanmaktadır. Aşağıdaki formüller, standart stok solüsyonu hazırlamak için gerekli olan solvent (çözücü) ya da antifungal ilaç tozunun miktarını hesaplamada kullanılabilir. Bütün antifungal ilaç tartımları hassas terazide yapılmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{[\text{Hacim (ml)} \times \text{Hedef Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})]}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{[\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/mg})]}{\text{Hedef Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

Amfoterisin B (sigma,U.S.A)

Potens %100 (250 mg' da 250 mg; 1 mg'da 1000 µg;
potensi 1000 µg/ml)

Stok solüsyon konsantrasyonu 1600 µg/ml

Hacim 10 ml DMSO

Ağırlık=(10 x 1600) / 1000 = 16 mg = 0.0016 g

Itraconazol (Neuland Laboratories Ltd.,India)

Potens %100 (100 mg'da 100 mg, 1 mg'da 1000 µg;
potensi 1000 µg/ ml)

Stok solüsyon konsantrasyonu 1600 µg/ml

Hacim 10 ml DMSO

Ağırlık=(10 x 1600) / 1000 = 16 mg = 0.0016 g

Flukonazol (Pfizer, France)

Potens %100 (100 mg'da 100 mg, 1 mg'da 1000 µg;
potensi 1000 µg/ml)

Stok solüsyon konsantrasyonu 5120 µg/ml

Hacim 10 ml distile su

Ağırlık=(10 x 5120) / 1000 = 51.2 mg= 0.00512 g

Vorikonazol (Pfizer Inc, U.S.A)

Potens %100 (100 mg'da 100 mg, 1 mg'da 1000 µg;
potensi 1000 µg / ml)

Stok solüsyon konsantrasyonu 1600 µg/ml

Hacim 10 ml DMSO

Ağırlık= (10 x 1600) / 1000 = 16 mg = 0.0016 g

3. 6. 2. Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Farklı antifungaller için farklı çözücüler kullanılmaktadır. Bazı ilaçlar solventlerde bazılarında suda erimektedir. Dimetil sülfoksit, etil alkol, polietilen glikol ve distile su temelde kullanılan çözücülerdir. Farklı antifungalleri çözdürmekte kullanılan solventler Tablo-IV'de gösterilmiştir. FLU suda çözülebilen bir antifungal ilaçtır. Bu nedenle FLU'ün hem stok solüsyonları hemde çift kat sulandırılmaları steril distile su içinde gerçekleştirildi. FLU' ün farklı dilüsyonları için yedi tane steril falkon tüpü alındı, en yüksek dilüsyondan başlayarak sıra ile en düşük dilüsyon oranına doğru ayrı ayrı tüpler kodlandı. FLU'ün 5120 µg/ml konsantrasyonunda ki stok solüsyonu ve çift kat sulandırılmaları Tablo-V'e uygun olarak yapıldı ve 128-64-32-16-8-4-2 µg/ml'lık final konsantrasyonları elde edildi. FLU'ün final konsantrasyonun hazırlanmasında izlenen yol Şekil-3'te şematize edilmiştir.

Suda, stok solüsyonu hazırlanamayan AMB, ITR, VOR gibi antifungaller içinde çözücü olarak %100 dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, U.S.A) kullanıldı. DMSO içinde her bir antifungal ilacın 1600 µg/ml konsantrasyonlu stok

solüsyonları hazırlandı. AMB, ITR, VOR'ün çift kat sulandırılmaları da yine DMSO içinde gerçekleştirildi. 1600 µg/ml konsantrasyonunda ki stok solüsyonu ve çift kat sulandırılmaları Tablo-VI'e uygun olarak yapıldı. Her antifungal ilacın farklı dilüsyonları için yedi tane steril falkon tüpü alındı, en yüksek dilüsyondan başlayarak sıra ile en düşük dilüsyon oranına doğru bütün tüpler ayrı ayrı kodlandı. Daha sonra aşağıdaki şemalara uygun olarak seri dilüsyonlar ile önce ara konsantrasyonlar hazırlandı. Daha sonrada bu ara konsantrasyonların da herbiri RPMI 1640 Medium (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız) besiyeri içinde 1/50 oranında dilüe edilerek AMB, ITR, VOR için 8-4-2-1-0.5-0.25-0.125 µg/ml'lik final konsantrasyonlar elde edildi. Suda çözünmeyen antifungalların final konsantrasyonlarının hazırlanması Şekil-4'te şematize edilmiştir.

Tablo-IV: Stok solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan dilüentler ve solventler		
Antifungal ilaç	Solvent (Ara konsantrasyon)	Dilüent (Final konsantrasyon)
Amfoterisin B	DMSO*	Medium**
Ketakonazol	DMSO*	Medium**
Itrakonazol	DMSO*	Medium**
Posakonazol	DMSO*	Medium**
Vorikonazol	DMSO*	Medium**
Flukonazol	Distile su	Medium**
Flucytosin	Distile su	Medium**

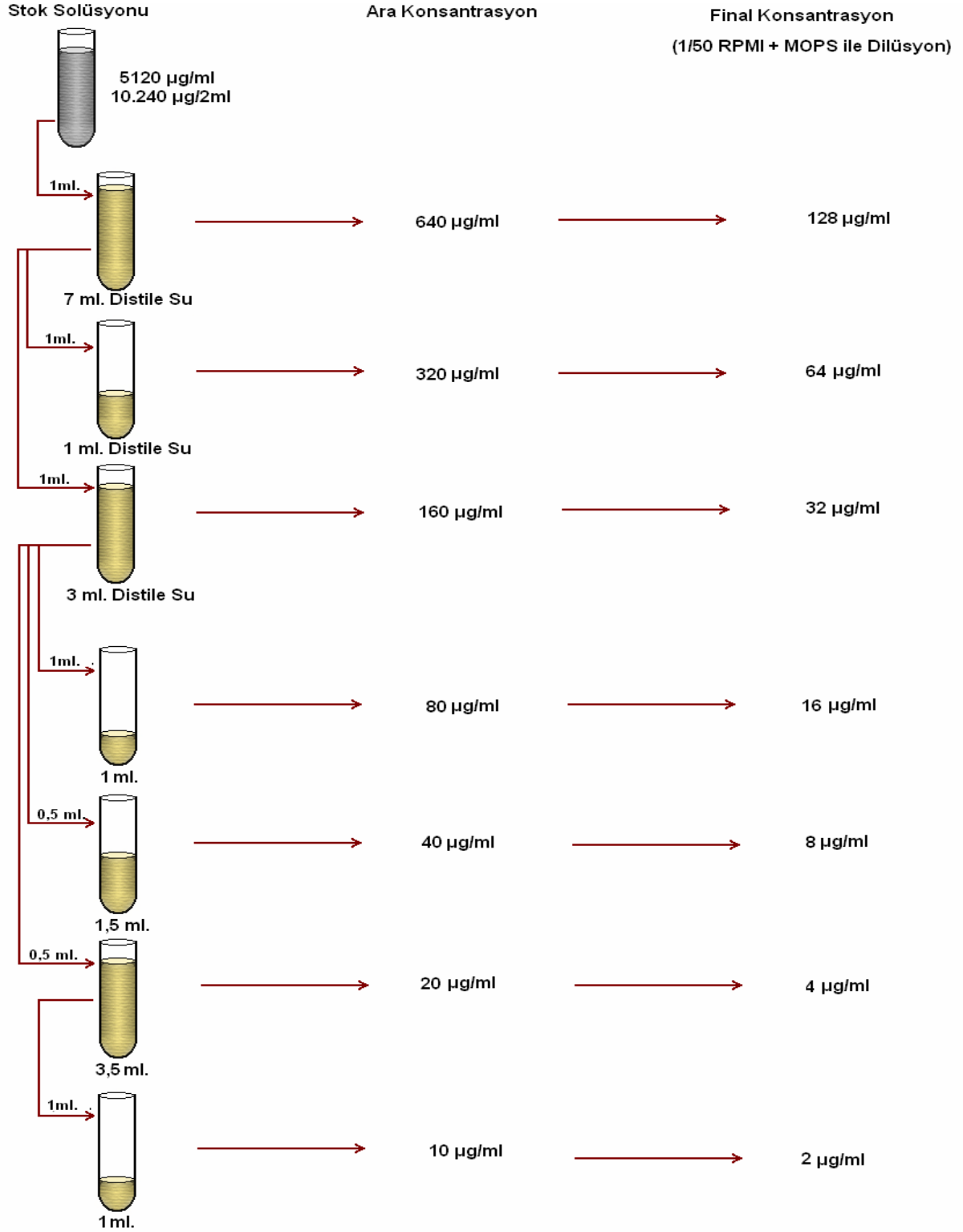
*Dimetil sülfoksit, **RPMI 1640

Tablo-V: Suda çözünebilen antifungal ilaçların dilüsyonlarının hazırlaması							
Aşama	Hedef konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Hacim (ml) + Medium (ml)		Ara Konsantrasyon (µg/ml)	Son konsantrasyon 1/50 dilüsyon (µg/ml)	Log ₂
1	5120	Stok	1ml	7	640 µg / ml	128	6
2	640	Aşama 1	1.0	1.0	320	64	5
3	640	Aşama 1	1.0	3.0	160	32	4
4	160	Aşama 3	1.0	1.0	80	16	3
5	160	Aşama 3	0.5	1.5	40	8	2
6	160	Aşama 3	0.5	3.5	20	4	1
7	20	Aşama 6	1.0	1.0	10	2	0
8	20	Aşama 6	0.5	1.5	5	1.0	-1
9	20	Aşama 6	0.5	3.5	2.5	0.5	-2
10	2.5	Aşama 9	1.0	1.0	1.25	0.25	-3
11	2.5	Aşama 9	0.5	1.5	0.625	0.12	-4
12	2.5	Aşama 9	0.5	3.5	0.3125	0.0625	-5

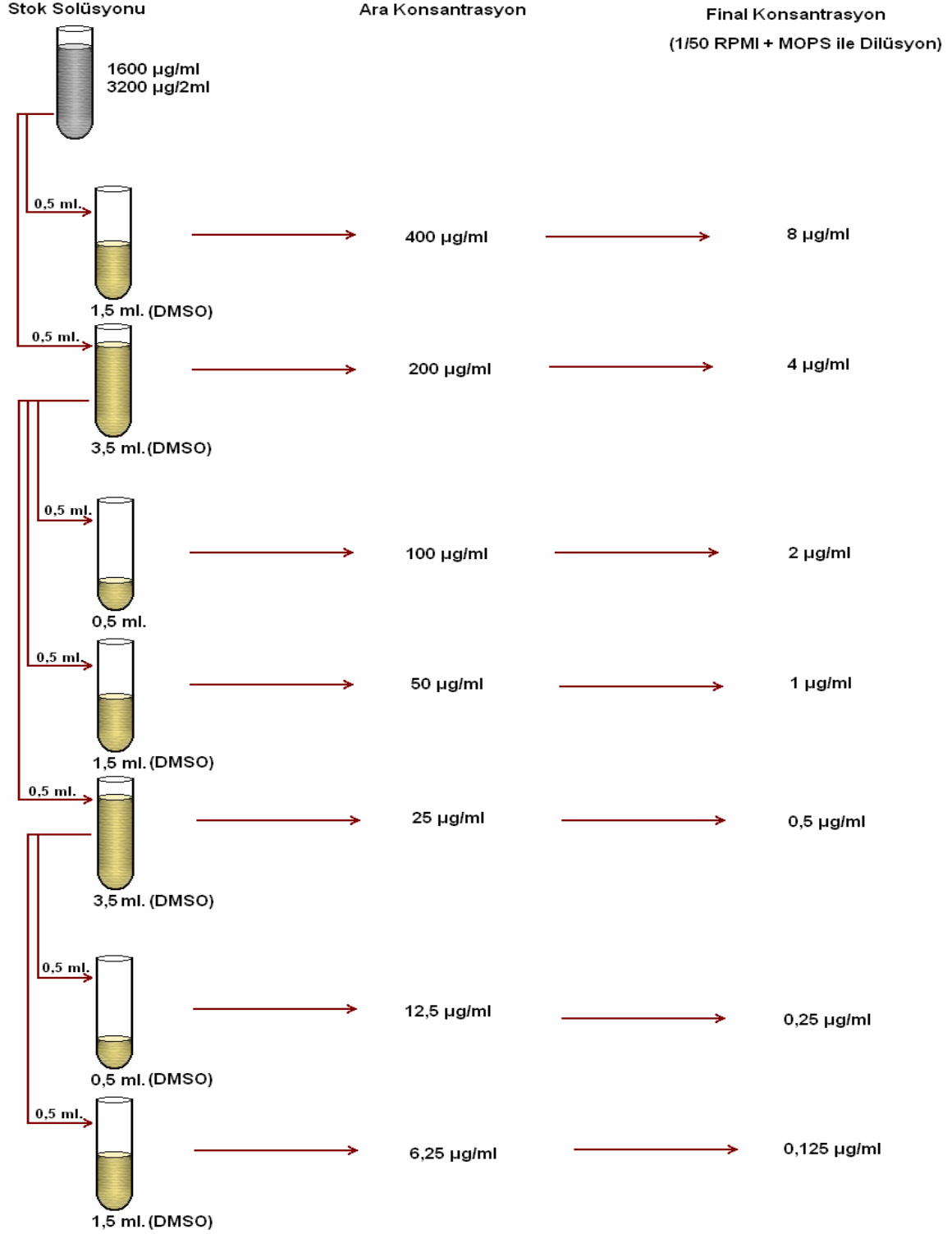
Tablo-VI: Suda çözünemeyen antifungal ilaçların dilüsyonlarını hazırlanması							
Aşama	Hedef konsantrasyon (µg / ml)	Kaynak	Hacim (ml) + Solvent (ml)		Ara Konsantrasyon (µg / ml)	Son konsantrasyon 1/50 dilüsyon (µg / ml)	Log ₂
1	1600	Stok			1600 µg / ml	32	4
2	1600	Stok	0.5	0.5	800	16	3
3	1600	Stok	0.5	1.5	400	8.0	2
4	1600	Stok	0.5	3.5	200	4.0	1
5	200	Aşama 4	0.5	0.5	100	2.0	0
6	200	Aşama 4	0.5	1.5	50	1.0	-1
7	200	Aşama 4	0.5	3.5	25	0.5	-2
8	25	Aşama 7	0.5	0.5	12.5	0.25	-3
9	25	Aşama 7	0.5	1.5	6.25	0.125	-4
10	25	Aşama 7	0.5	3.5	3.13	0.0625	-5

Şekil-3: FLU'ün final konsantrasyonlarının hazırlanması

FLUKONAZOL
(Çözücü: Distile Su)



Şekil-4: AMB, ITR ve VOR'ün final konsantrasyonlarının hazırlanması
AMFOTRİSİN- B / ITRAKONAZOL / VORİKONAZOL
(Çözücü: DMSO)



3. 6. 3. RPMI 1640'ın Hazırlanması

Filamentöz fungusları çoğaltmak ve test etmek için L-glutamin'li bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren sentetik medium RPMI 1640 tercih edilmektedir. Bizde çalışmamızda; hem *Aspergillus*'ları çoğaltmak hemde antifungal ilaçların dilüe edilerek final konsantrasyonlarının hazırlanmasında L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 Medium kullanıldı. Bu sentetik besiyerinin içeriği Tablo-VII'de gösterildiği gibidir.

Tablo-VII: RPMI-1640 Medium içeriği

Bileşen	g/L su	Bileşen	g/L su
L-arjinin	0.200	Biyotin	0.0002
L-asparaji	0.050	D-pantotenik	0.00025
L-aspartik asit	0.020	Kolin klorid	0.003
L-sistin. 2HCL	0.0652	Folik asit	0.001
L-glutamik asit	0.020	Miyo-inositol	0.035
L-glutamin	0.300	Nikotinamid	0.001
Glisin	0.010	PABA	0.001
L-histidin	0.015	Pridoksin HCL	0.001
L-hidroksiprolin	0.020	Riboflavin	0.0002
L-izölösün	0.050		0.00005
L-lösin	0.050	Tiyamin HCL	0.001
L-lizin.HCL	0.040	Vitamin B ₁₂	0.000005
L-metiyonin	0.015	Kalsiyum nitrat.H ₂ O	0.100
L-fenilalanin	0.015	Potasyum klorid	0.400
L-prolin	0.020	Magnezyum sülfat	0.04884
L serin	0.030	Sodyum klorid	6.000
L treonin	0.020	Sodyum fosfat;dibazik	0.800
L triptofan	0.005	D-glukoz	2.000
L tirozin.2Na	0.02883	Redükte glutatyon	0.001
L valin	0.020	Fenol red, Na	0.0053

Bir litre RPMI 1640 sıvı besiyeri hazırlandı. Bunun için temiz bir beher içerisinde 10.7g RPMI 1640 tozu ve tampon olarak ta 34.53 gr MOPS (3-[n-morpholino] propanesulphonic acid) (Merck, Germany) ilave edildi. Bu karışımın üzerine 1litre steril distile su ilave ederek tozların çözünmesi sağlandı. Homojenizasyonu sağlamak için aralıklı olarak vorteksle çalkalama yapıldı. Hazırlanan besiyerinin kullanılmadan önce pH'nın 6.9-7.0 olmasına dikkat edildi. Bunun için 10 N sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Germany) ile pH ayarlaması yapıldı. Yukarıda tariflendiği gibi hazırlanan sıvı besiyerinin 1 litresi için yaklaşık 5 ml NaOH gerekmektedir. Bunun için 1 litrelik balon jöje içerisinde 100 ml distile su ve içerisinde de 40g NaOH eklenerek çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon kontrollü bir şekilde besiyerine ilave edildi. pH metre ile besiyerinin pH'sı 6.9-7.0' a ayarlandı.

Kontaminasyon olasılığını ortadan kaldırmak için tüm işlemler Klass II laminer kabin içerisinde gerçekleştirildi. Hazırlanan besiyerinin kullanılmadan önce sterilize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hazırlanan çözelti, 0.22 µ çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek 20cc'lik steril enjektörlere aspire edildi. Daha sonra bu enjektörler kullanılıncaya kadar aseptik koşullarda + 4°C'de muhafaza edildi.

3. 6. 4. İnokülümünün Hazırlanması

Aspergillus'larda; nongerminative (çimlenme fazında olmayan) konidiyal yada sporangiospor süspansiyonlarının spektrofotometrik ölçümlerde kullanılmasının daha güvenilir olduğu bildirilmektedir. Konidium ve sporangiospor yapıları, *Aspergillus*'lar da PDA besiyerinin nemli ortamda ve 35°C'de 7 gün inkübasyonu ile oluşmaktadır. İnokülüm hazırlamak için önce stokta bulunan bütün *Aspergillus* türleri, Klass II laminer kabin içinde, PDA besiyeri içeren plaklara inoküle edildi ve 35°C'de 7 gün inkübasyona bırakılarak subkültürleri hazırlandı. Yeterli sporulasyon sağlandıktan sonra antifungal duyarlılık çalışmasına alınacak 119 *Aspergillus* türünün test inokülümleri hazırlandı. Test inokülüm konsantrasyonları, yaklaşık 0.4×10^4 ile 5×10^4 cfu/ml

olacak şekilde ayarlandı. Bunun için önce PDA besiyerinde üreyen ve sporulasyonunu tamamlayan *Aspergillus* kolonisinin üzerine petrinin üst kapağı kaldırılarak steril %0.9 NaCl'den 1ml ve bir damla da Tween 20 eklendi. Petrinin kapağı kapatılarak hafif dairesel hareketlerle sıvının koloni üzerinden geçmesi sağlandı. Bu şekilde fungal konidiya, sporangiyospor ve hifal yapıları içeren bir süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyon steril pastör pipeti yardımıyla kapaklı steril bir cam tüpe aktarıldı. 15sn. vortekslendikten sonra partiküler yapıların dibe çökmesi için 5 dakika beklendi. Daha sonra bu süspansiyon, optik dansitesi 0.09 ile 0.11 aralığına ayarlanmış spektrofotometre ile yoğunluk ayarlaması yapıldı. Hazırlanan bu süspansiyonlar standart medium RPMI 1640 ile 1/50 oranında dilue edilerek, ihtiyaç duyulan 0.4×10^4 - 5×10^4 cfu/ml. dansiteye uygun 2x dilüsyonu elde edildi. İnokülümün kantitasyonu; mililitredeki colony forming ünit'i saptamak için SDA besiyeri üzerine test inokülümünün 1:100 dilüsyonununun 0.01 ml'si ilave edilerek yapıldı. Bu plaklar 26 °C'de inkübasyona bırakıldı. Gözle koloni oluşumlarının varlığı ve sayısı izlendi.

3. 6. 5. Mikrodilüsyon

Steril, polistren boş 96'lık mikropleytlerinin uzun kenarı suşları, kısa kenarında yukardan aşağıya doğru antifungal ilacın en yüksek final konsantrasyonundan başlayarak en küçük konsantrasyonları gösterecek şekilde kodlandı. Bu şekilde 119 suş ve her antifungal için 9 steril mikroplate hazırlandı. Öncelikle her antifungalın farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış final konsantrasyonları yüksek konsantrasyondan başlayarak en düşük konsantrasyona doğru, kendilerine uyan sıradan başlayarak bütün kuyucuklara 0.1ml olarak dağıtıldı.

Her suş için hazırladığımız inokülüm süspansiyonundan, aynı suş için ayrılan yedi kuyucuğa yüzer mikrolitre pipetlendi. İnokülüm süspansiyonunun ilavesi ile antifungal ilaç yoğunluğu 1/2 dilüe olmuş oldu. Bu basamakta, inokülüm yoğunluğu ve solvent seyreltilmesi ile arzu edilen final konsantrasyona ulaşılmış olmaktadır. Sekizinci, son kuyucukta üreme kontrol kuyucuğu olarak

ayrılmıştır. Üreme kontrol kuyucuğu, dilüe edilmiş inokülüm süspansiyonunun 0.1ml'si ile antifungal ilaç içermeyen ilaç çözücüsünün 0.1ml'sini içermektedir. Tüm mikrodilüsyon plakları çalkalayıcısız olarak 35°C'de 46-54 saat (ortalama 50 saat) inkübe edildi. Sonuçların okunması; görsel olarak çift gözle yapıldı. Organizma üremesinin inhibe olduğu, antifungal ilacın en düşük konsantrasyonu Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edildi. Üremenin olmadığı kuyucuklardan yapılan kültür ekimleriyle de bulunan MİK değerleri doğrulandı. Yanlış pozitif ve negatif okumalara engel olmak için her bir MİK kuyucuğu, üreme kontrol kuyucuğu ile karşılaştırılarak okumalar yapıldı. Her bir mikrodilüsyon kuyucuğunu değerlendirirken aşağıdaki skorlama kullanıldı.

0) Görsel ve kültür ekimlerinde üremenin olmaması

1) Zayıf üreme veya üreme kuyucuğunun yaklaşık %25'i yoğunluğu

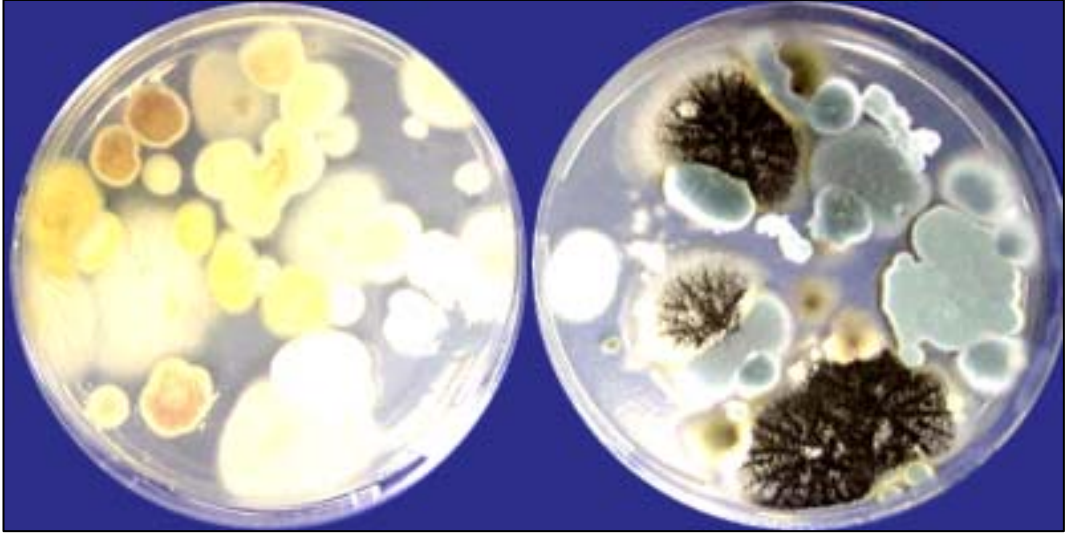
2) Üremede belirgin azalma veya üreme kontrol kuyucuğunun yaklaşık %50'si yoğunluğu

3) Üremede hafif azalma veya üreme kontrol kuyucuğunun yaklaşık %75'i yoğunluğu

4) Üremede azalmanın hiç olmaması.

IV. BULGULAR

Bir yıllık sürede 3 aylık periyodlar halinde Afyonkarahisar bölgesindeki 4 büyük hastaneden hava toplama cihazı ile toplanan hava örneklerinin inoküle edildiği PDA besiyerleri hastanemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.'na bağlı mikoloji laboratuvarında 1 hafta süreyle 26°C'de inkübasyona bırakıldı. Kültürler gün aşırı kontrol edilerek üremeler izlendi. Hızlı üreyen küf kolonilerinin gelişmekte olan diğer kolonilerin üzerini örterek tanıya yanılgılara yol açmasına meydan vermemek için yavaş üreyen kolonilerden ilave yeni pasajlar yapıldı.



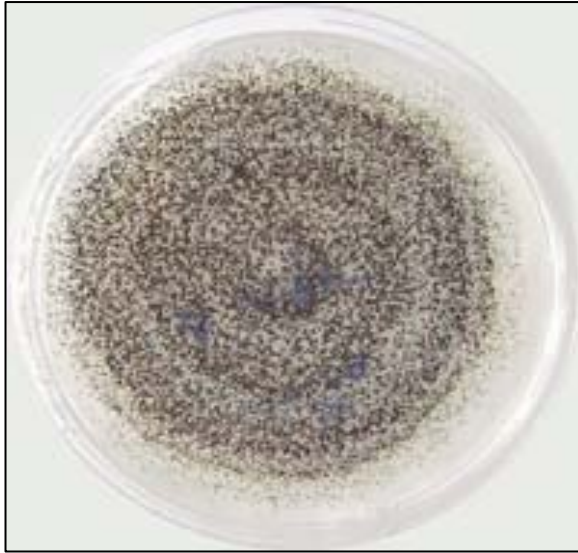
Fotoğraf-1: PDA besiyeri (alttan ve üstten görünüm)

Bir haftalık inkübasyon sonrasında plakların tümü değerlendirmeye alındı. Ayrıca her koloniden yeni örnekler alınarak içerisinde steril, 2 ml distile su bulunan siyah kapaklı tüplerde mantar stoğu oluşturuldu. İnkübasyon sonrası hava örneklerinin ilk inoküle edildiği plakların üstten ve alttan görünümü Fotoğraf-1'de gösterilmiştir. Tür identifikasyonu için ekimlerin yapıldığı besiyerleri, bir haftalık inkübasyondan sonra değerlendirmeye alındı. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler ile *Aspergillus* tür identifikasyonu yapıldı. Tez çalışması boyunca on bir farklı türde toplam 118 *Aspergillus* suşu identifiye edilmiştir.



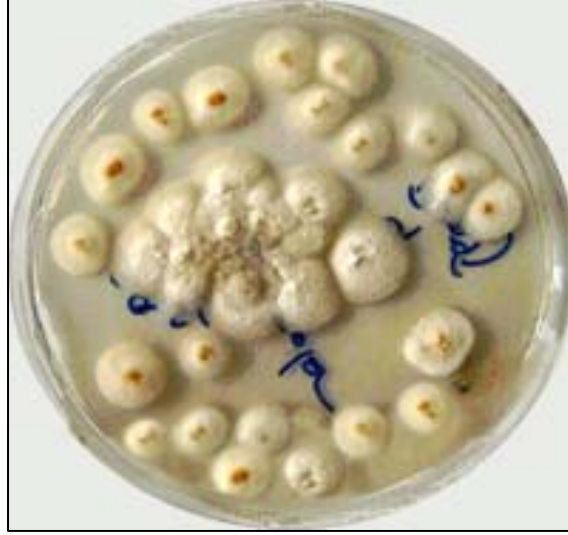
Fotoğraf-2: *A. fumigatus*' un PDA besiyerindeki görüntüsü. AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.© 2007

Toplam 70 *A. fumigatus* identifiye edildi. *A. fumigatus*'ların total *Aspergillus* içerisindeki oranı %59 olarak bulunmuştur. Fotoğraf-2'de identifiye edilen *A. fumigatus* türünün PDA besiyerindeki üstten görüntüsü verilmiştir.



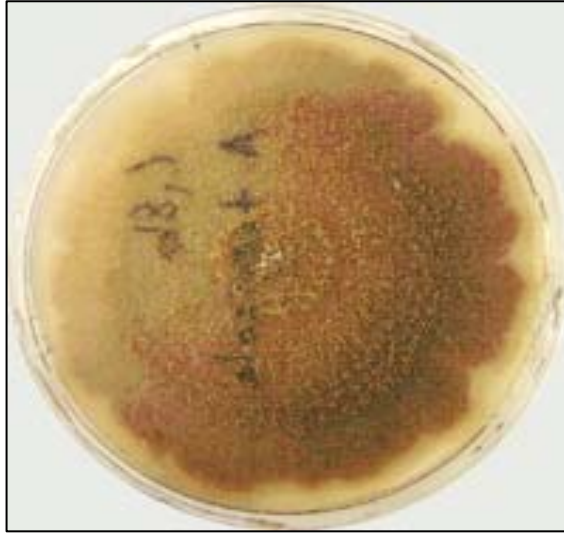
Fotoğraf-3: *A. niger*' in PDA besiyerindeki görüntüsü. AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobivoloii AD.© 2007

On dört *A. niger* türü identifiye edildi. *A. niger*'in total *Aspergillus* içerisindeki oranı %12 olarak hesaplanmıştır. Fotoğraf-3'de identifiye edilen *A. niger* türünün, PDA besiyerindeki üstten görüntüsü görülmektedir.



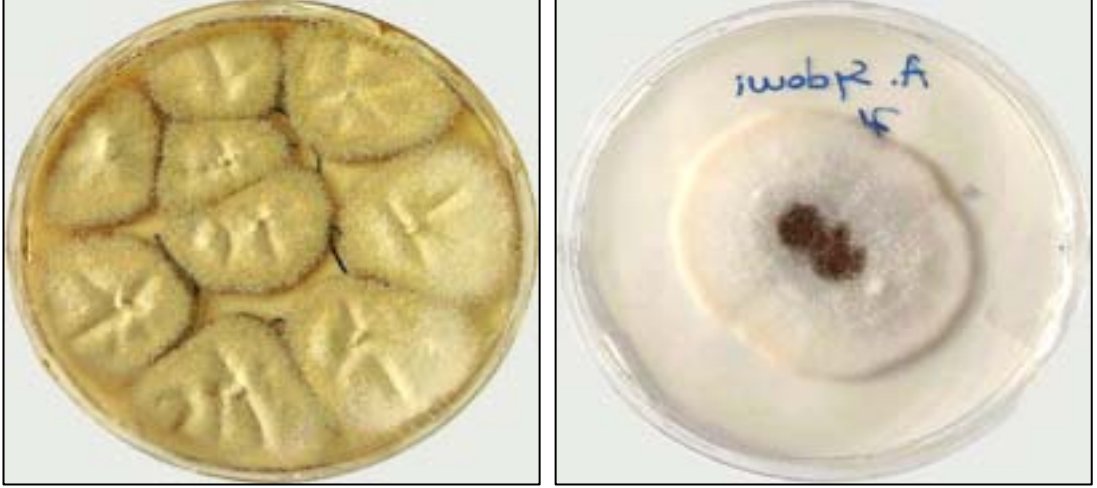
Fotoğraf-4: *A. versicolor*, Cezapek agardaki görüntüsü. AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. © 2007

On dokuz tane *A. versicolor* türü tanımlendi. *A. versicolor*'un tüm *Aspergillus* 'lar içerisindeki oranı %16'dır. Fotoğraf-4'de *A. versicolor* kolonisinin Cezapek agarda ki üstten görüntüsü verilmiştir.



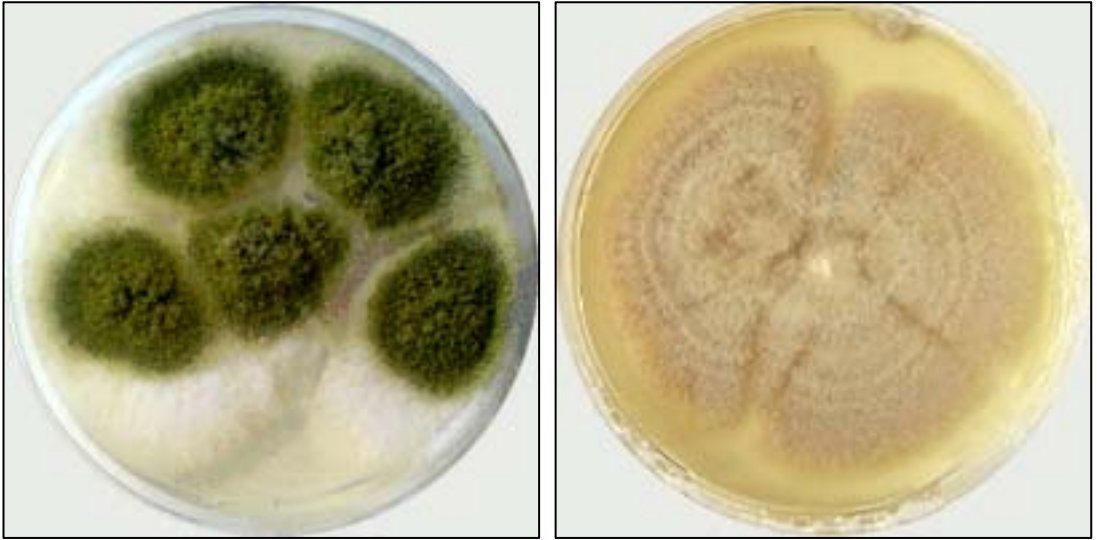
Fotoğraf-5: *A. terricola*, Cezapek agardaki görüntüsü. AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. © 2007

A. terricola türünden beş tane tanımlendi. Total *Aspergillus* sayısı içerisindeki oranı %4'dür. *A. terricola* kolonisinin Cezapek agarda ki üstten görüntüsü Fotoğraf-5'de verilmiştir.



Fotoğraf-6: *A. fischeri* Cezapek agar görüntüsü. *A. sydowi* Cezapek agar görüntüsü. AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.© 2007

Sadece bir *A. fischeri* ve bir tanede *A. sydowi* tanımlendi. *A. fischeri* ve *A. sydowi*'nin total *Aspergillus* içerisindeki oranları her biri için %1'dir. Fotoğraf-6'da tanımlenen *A. fischeri* ve *A. sydowi* kolonilerinin Cezapek agardaki üstten görüntüleri verilmiştir.



Fotoğraf-7: PDA besiyeri *A. flavus* Cezapek agar; *A. carneus*
AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.© 2007

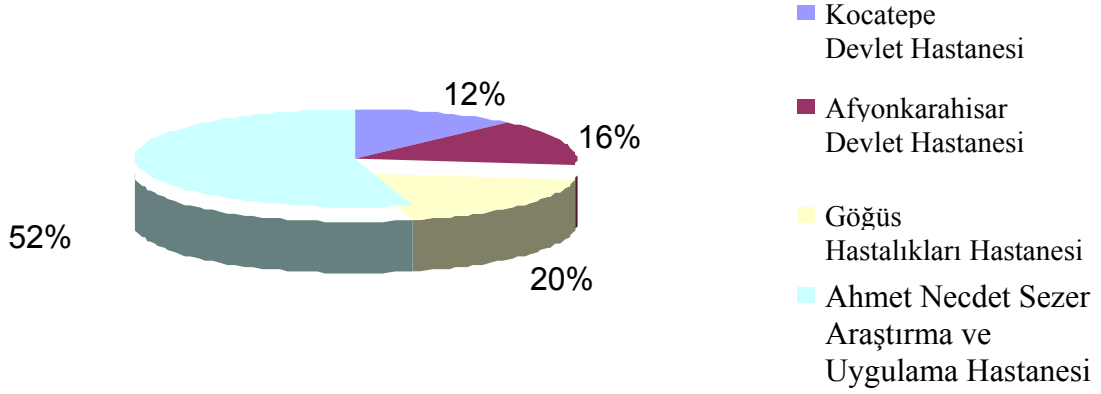
Çalışmamızda bir *A. flavus* ve iki tane de *A. carneus* tanımlendi. *A. flavus* ve *A. carneus*'un 118 *Aspergillus* içerisindeki oranları *A. flavus* için %1, *A. carneus* için ise %2'dir. *A. flavus*'un PDA'daki ve *A. carneus*'un Cezapek agarda ki üstten görüntüsü Fotoğraf-7'de verilmiştir.

İdentifiye edilen *Aspergillus* 'ların 70'i (%59) *A. fumigatus*, 14'ü (%12) *A. niger*, 19'u (%16) *A. versicolor*, 5'i (%4) *A. terricola*, biri (%1) *A. flavus*, biri (%1) *A. parvulus*, biri (%1) *A. ochraceus*, biri (%1) *A. sydowi*, biri (%1) *A. fischeri*, 3'ü (%2) *A. aureolatus*, 2'si (%2) *A. carneus* 'tur. Çalışmalarımız süresince identifiye edilen *Aspergillus* tür ve sayıları ile her türün toplam suş içerisindeki yüzde oranları Tablo-VIII'de gösterilmiştir.

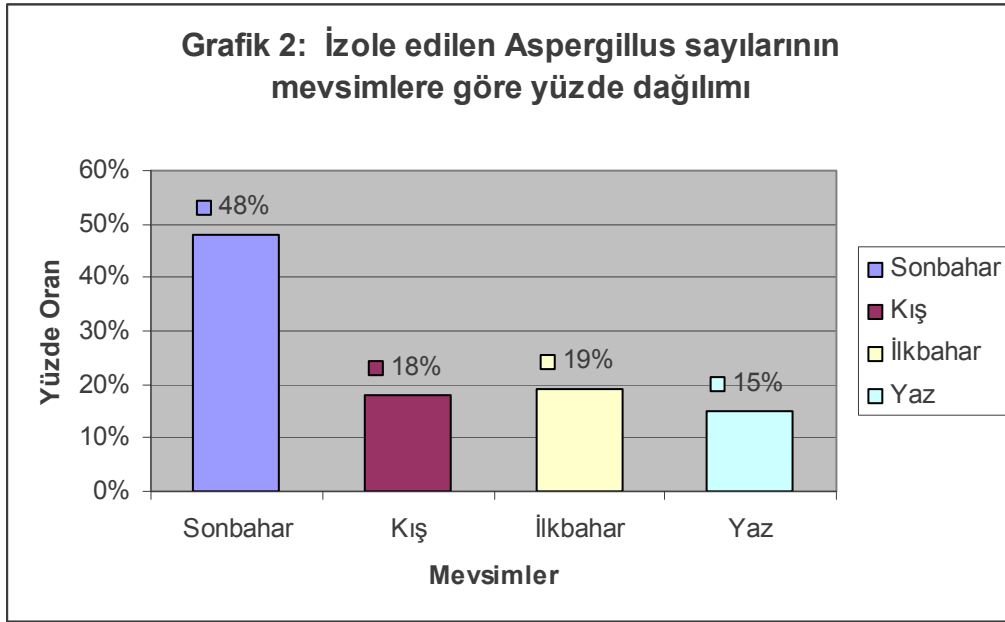
Tablo-VIII: İzole edilen <i>Aspergillus</i> türleri ve yüzde oranları											
Türler	<i>A.fumigatus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terricola</i>	<i>A. aureolatus</i>	<i>A. carneus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fischeri</i>	<i>A. parvulus</i>	<i>A. sydowi</i>
n (118)	70	19	14	5	3	2	1	1	1	1	1
Oran (%)	59	16	12	4	2	2	1	1	1	1	1

Tüm *Aspergillus* 'ların 14'ü (%12) KDH, 19'u (%16) ADH, 24'ü (%20) GHH, 61'i (%52) ANS hastanesinden elde edilen hava örneklerinden izole edilmiştir. Hastanelere göre izole edilen *Aspergillus* 'ların sayı ve yüzde dağılımı Grafik-1'de verilmiştir.

Grafik-1: İzole edilen *Aspergillus*' ların hastanelere göre dağılımı



İzole edilen *Aspergillus* suşlarının 21'i (%18) kış, 57'si (%48) sonbahar, 22'si (%19) ilkbahar, 18'de (%15) yaz döneminde yapılan çalışmada saptanmıştır. Mevsim ortalamasına göre *Aspergillus* sayıları ve yüzde dağılımları Grafik-2'de verilmiştir.



Yaptığımız çalışma sırasında her hastanenin hastane dışı, hastane içi ve mevcut yoğun bakımlarından higrogram yardımı ile ortam nemi de ölçüldü. Her mevsim için, örneklerin toplandığı hastanelere ait nem oranları ve en sık izole edilen *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. versicolor* ile daha nadir izole edilen diğer *Aspergillus*'ların sayıları ve total *Aspergillus* içerisindeki oranları Tablo-IX'da verilmiştir.

4.1. İLKBAHAR DÖNEMİ

İlkbahar döneminde 4 hastaneden 3 farklı türde olmak üzere toplam 22 *Aspergillus* suşu izole edilirken, izolatların %14'ü KDH, %45'i ADH, %27'si GHH, %14'ü ANS hastanesinden izole edilmiştir. Bunlarında 14'ü (%63) *A. fumigatus*, 7'si (%32) *A. versicolor*, biride (%5) *A. aureulotus*'dur. *A. niger* bu dönemde izole edilememiştir. *A. fumigatus* ve *A. versicolor* ile daha nadir izole edilen diğer *Aspergillus*'ların sayıları ve total *Aspergillus* içerisindeki oranları Tablo-IX'da verilmiştir.

4.2. YAZ DÖNEMİ

Yaz döneminde ise tüm hastanelerden 4 farklı türde toplam 18 *Aspergillus* suşu izole edilmiş olup, izolatların %17'si KDH, %50'si GHH, %33'de ANS hastanesinden izole edilmiştir. Bu dönemde ADH'den herhangi bir *Aspergillus* izole edilememiştir. İzole edilen suşların 3'ü (%17) *A. fumigatus*, 3'ü (%17) *A. niger*, 11'i (%61) *A. versicolor*, biride (%5) *A. aureulotus*'tur. En sık izole edilen *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. versicolor* ile daha nadir izole edilen diğer *Aspergillus*'ların sayıları ve total *Aspergillus* içerisindeki oranları Tablo-IX'da verilmiştir.

4.3. KIŞ DÖNEMİ

Kış döneminde yaptığımız çalışmada ise; tüm hastanelerden 6 farklı türde toplam 21 *Aspergillus* suşu izole edildi. Suşların %19'u KDH, %19'u ADH, %33'ü GHH, %29'u ANS hastanesinden izole edilmiştir. Bunların 8'i (%38) *A. fumigatus*, 7'si (%33) *A. niger*, biri (%5) *A. versicolor*, 2'si (%9) *A. carneus*, 1'i (%5) *A. ochraceus*, 2'si (%10) *A. terricola*'dır. En sık izole edilen *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. versicolor* ile daha nadir izole edilen diğer *Aspergillus*'ların sayıları ve total *Aspergillus* içerisindeki oranları Tablo-IX'da verilmiştir.

4. 4. SONBAHAR DÖNEMİ

Sonbahar döneminde yapılan çalışmada, 8 türde toplam 57 *Aspergillus* suşu izole edilmiş olup suşların %7'si KDH, %9'u ADH, %3'ü GHH, %81'de ANS hastanesinden izole edilmiştir. Bunlarında 45'i (%79) *A. fumigatus*, 4'ü (%6) *A. niger*, 3'ü (%5) *A. terricola*, 1'i (%2) *A. flavus*, 1'i (%2) *A. aureulotus*, 1'i (%2) *A. sydowi*, 1'i (%2) *A. parvulus*, 1'de (%2) *A. fischeri*'dir. İzole edilen *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. versicolor* ile daha nadir izole edilen diğer *Aspergillus*'ların sayıları ve total *Aspergillus* içerisindeki oranları Tablo-IX'da verilmiştir.

Tablo-IX: En Sık İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türlerinin Hastanelere ve Mevsimlere Göre Dağılımı, Total <i>Aspergillus</i> İçindeki Yüzde Oranları ile Nem Değerleri										
Sağlık Kurumu	Tür	İLKBAHAR		YAZ		SONBAHAR		KIŞ		
		n (sayı)	%	n (sayı)	%	n (sayı)	%	n (sayı)	%	
KDH	<i>A.fumigatus</i>	2	1.6	2	1.6	3	2.5	1	0.8	
	<i>A. niger</i>							2	1.6	
	<i>A.versicolor</i>	1	0.8	1	0.8			1	0.8	
	Diğer Türler					1	0.8			
	Toplam	3	2.5	3	2.5	4	3	4	3	
	Nem (%)	Hastane İçi	40 (n=2)		22 (n=1)		38 (n=3)		40	
		Hastane Dışı	42		24 (n=2)		48		38	
Yoğun Bakım		38 (n=1)		24		50 (n=1)		43 (n=4)		
ADH	<i>A.fumigatus</i>	7	5.9			2	1.6	2	1.6	
	<i>A. niger</i>					1	0.8	2	1.6	
	<i>A.versicolor</i>	3	2.5							
	Diğer Türler					2	1.6			
	Toplam	10	8			5	4	4	3	
	Nem (%)	Hastane İçi	34 (n=4)		23		40 (n=2)		40 (n=1)	
		Hastane Dışı	32 (n=3)		24		46 (n=3)		44	
Yoğun Bakım		33 (n=3)		24		34		38 (n=3)		
GHH	<i>A.fumigatus</i>	5	4.2			1	0.8	3	2.5	
	<i>A. niger</i>					1	0.8	3	2.5	
	<i>A.versicolor</i>	1	0.8	9	7.6					
	Diğer Türler							1	0.8	
	Toplam	6	5	9	7.6	2	1.6	7	6	
	Nem (%)	Hastane İçi	36 (n=4)		27 (n=9)		48		45(n=4)	
		Hastane Dışı	36 (n=2)		25		48 (n=2)		42(n=3)	
Yoğun Bakım		35		26		42		46		
ANS hastanesi	<i>A.fumigatus</i>	2	1.6	1	0.8	40	33.8	2	1.6	
	<i>A. niger</i>			3	2.5	2	1.6			
	<i>A.versicolor</i>			1	0.8					
	Diğer Türler	1	0.8	1	0.8	4	3	4	3	
	Toplam	3	2	6	5	46	38	6	5	
	Nem (%)	Hastane İçi	30 (n=1)		23 (n=5)		38 (n=26)		39 (n=6)	
		Hastane Dışı	38		25		56 (n=12)		43	
Yoğun Bakım		34 (n=2)		26 (n=1)		47 (n=8)		42		
	Genel Toplam	22	%19	18	%15	57	%48	21	%18	

4. 5. HASTANE BÖLÜMLERİ

İzole edilen *Aspergillus* suşlarının hastane bölümlerine göre dağılımları şu şekilde saptanmıştır; hesaplamalar yapılırken hastane girişi, hastane içi, acil servis, göğüs hastalıkları hasta odası, poliklinikler koridoru, ameliyathane koridoru ve diyaliz ünitesi hastane içi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca yenidoğan yoğun bakım, dahiliye yoğun bakım ve kardiyovasküler cerrahi yoğun bakımları

da hesaplamalar sırasında, yoğun bakımlar ana başlığında değerlendirilmiştir. Buna göre;

Toplam 4 hastanenin, hastane dışından 12 (%17), hastane içinden 26 (%37), göğüs servisi hasta odasından 11 (%16), yoğun bakımlardan 19 (%27), diyaliz ünitelerinden 2 (%3) *A. fumigatus* üretildi. On dört *A. niger* suşunun; 5'i (%36) hastane dışından, 4'ü (%29) hastane içinden, geriye kalan 5'i (%35) diğer bölümlerden izole edilirken, 19 *A. versicolor* suşunun; 12'si (%63) hastane içinden, 6'sı (%32) yoğun bakımlardan, 1'i (%5) göğüs hastalıkları servisi hasta odasından saptanmıştır. Beş *A. terricola* suşunun; 2'si (%40) hastane dışından, 2'si (%40) diyaliz ünitesinden, 1 tanesinde yoğun bakımlardan, toplam 3 *A. aureolatus* suşunun; 1'si (%33) hastane içinden, 1 tanesi (%33) göğüs hastalıkları servivinden, 1 tanesinde (%33) yoğun bakımlardan, 2 *A. carneus* suşunun 1'i (%50) hastane içinden, 1 tanesinde (%50) göğüs hastalıkları servisi hasta odasından izole edildi.

Hastane dışından bir *A. flavus* ve bir tanede *A. parvulus*, diyaliz ünitesinden birer tane *A. fischeri* ve *A. ochraceus*, hastane içinden de bir tane *A. sydowi* izole edilmiştir. Hastane dışından toplam 21 *Aspergillus* izole edildi, total *Aspergillus* sayısı içerisindeki oranı ise %18 olarak bulundu. Hastane içi ortam havasından 45 (%38), göğüs hastalıkları servisi hasta odasından 17 (%14), yoğun bakımlardan 28 (%24), diyaliz ünitelerinden ise toplam 7 (%6) *Aspergillus* suşu izole edildi. Tablo-X'da izole edilen *Aspergillus* türlerinin hastane bölümlerine göre sayı ve izole edilen toplam tür içindeki yüzde oranları verilmiştir.

Tablo-X: İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türlerinin Hastane Bölümlerine Göre Dağılımı ve Oranları						
Tür	(n=sayı) (%)	Hastane Bölümleri				
		Hastane Dışı	Hastane İçi	Göğüs servisi	Yoğun Bakımlar	Diyaliz
<i>A.fumigatus</i>	(70)	12	26	11	19	2
	(%)	17	37	16	27	3
<i>A. niger</i>	(14)	5	4	3	1	1
	(%)	36	29	21	7	7
<i>A.versicolor</i>	(19)		12	1	6	
	(%)		63	5	32	
<i>A.flavus</i>	(1)	1				
	(%)	100				
<i>A.fischeri</i>	(1)					1
	(%)					100
<i>A.ochraceus</i>	(1)					1
	(%)					100
<i>A.carneus</i>	(2)		1	1		
	(%)		50	50		
<i>A.terricola</i>	(5)	2			1	2
	(%)	40			20	40
<i>A.parvulus</i>	(1)	1				
	(%)	100				
<i>A.sydowi</i>	(1)		1			
	(%)		100			
<i>A.aureolatus</i>	(3)		1	1	1	
	(%)		33	33	33	
Toplam sayı		21	45	17	28	7
(%)		18	38	14	24	6

4. 6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARI

Yapılan antifungal duyarlılık çalışmasında *Aspergillus* suşlarının tümü test edildi. Çalışmamızda 4 farklı antifungal ilaç kullanıldı. Bunlar poliyen grubundan; amfoterisin B, azol grubundan; itrakonazol, vorikonazol ve flukonazol antifungalleridir. Tüm suşlarda AMB, ITR, VOR için en yüksek ilaç konsantrasyonu 8 µg/ml en düşük ilaç konsantrasyonu da 0.125 µg/ml olacak şekilde FLU içinde en yüksek 128 µg/ml en düşük ilaç konsantarsyonu da 2 µg/ml olacak şekilde test edildi. Tüm suşlarda, üremenin %90'nının inhibe olduğu en düşük antifungal ilaç konsantrasyonuna göre MİK aralıkları saptandı. İdentifiye edilen tüm *Aspergillus* suşları, FLU ≥64 µg/ml ilaç konsantrasyonlarında dirençli

olarak saptanmıştır. *Aspergillus* türlerinde antifungal ilaçlara karşı saptanan MİK aralıkları ve yüzde oranları aşağıda sırası ile verilmiştir. Tüm türlerde, çalışılan antifungallere göre saptanan MİK aralıkları Tablo-XI’da toplu olarak verilmiştir.

Tablo-XI: Antifungal ilaçlar için saptanan MİK (µg/ml) aralıkları				
Türler	AMB	ITR	VOR	FLU
<i>A. fumigatus</i>	4-0.5	0.5-0.125	2-0.125	≥64
<i>A. niger</i>	2-0.5	4-0.25	4-0.5	≥64
<i>A. versicolor</i>	4 - 0.062	1-0.062	2-0.125	≥64
<i>A. carneus</i>	2 - 0.062	0.25-0.062	1	≥64
<i>A. terricola</i>	4	1-0.25	4-0.5	≥64
<i>A. aureolatus</i>	4 - 2	0.25	0.5-0.125	≥64
<i>A. flavus</i>	2	0.25	0.5	≥64
<i>A. fischeri</i>	2	0.25	1	≥64
<i>A. ochraceus</i>	4	0.5	0.5	≥64
<i>A. parvulus</i>	0.5	0.062	0.125	≥64
<i>A. sydowi</i>	4	1	2	≥64

4. 6. 1. Amfoterisin B

Saptanan MİK (µg/ml) aralıklar; *A. fumigatus* için 4-0.5 µg/ml, *A. niger* suşlarında 2-0.5 µg/ml, *A. versicolor*’da 4-0.062 µg/ml, *A. carneus*’ ta 2-0.062 µg/ml, *A. terricola* 4 µg/ml, *A. aureolatus*’ ta ise 4-2 µg/ml olarak saptandı. Tek suş olarak izole edilenlerden *A. flavus* ve *A. fischeri*’de 2 µg/ml, *A. ochraceus*’ ta 4 µg/ml, *A. parvulus*’ta 0.5 µg/ml, *A. sydowi*’de ise 4 µg/ml olarak saptanmıştır. Tablo-XI’da AMB’ye karşı tüm suşlarda saptanan MİK değerleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

MİK (µg/ml) değerlerinin yüzde dağılımları; *A. fumigatus*’ ta 70 suşun 2’sinde (%3) 4 µg/ml, 68’inde (%97) MİK 2 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. niger* de ise 14 suşun 1’de (%7) 2 µg/ml, 13’de (%93) ise 1 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. versicolor* için 19 suşun 2’de (%11) 4 µg/ml, 17’de (%89) 2 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. aureolatus*’da ise toplam 3 suşun 2’sinde (%67) 4 µg/ml, 1’de ise (%33) 2 µg/ml, *A. carneus*’ da 2 suşun %50’si 2 µg/ml,

%50'de 0.06 µg/ml, *A. terricola*' da ise 5 suşun tamamı (%100) 4 µg/ml olarak saptanmıştır. Tek suş olarak izole edilen *A. flavus* ve *A. fischeri*'de 2 µg/ml, *A. ochraceus*'da 4 µg/ml, *A. parvulus*'da 0.5 µg/ml, *A. sydowi* 'de 4 µg/ml, Standart suşta ise 0.06 µg/ml olarak saptanmıştır. Türlerine göre AMB, MİK' lerinin dağılımı Tablo-XII'de verilmiştir.

4. 6. 2. İtrakonazol

Saptanan MİK (µg/ml) aralıkları; *A. fumigatus*' ta 0.5-0.125 µg/ml, *A. niger*' de 4-0.25 µg/ml, *A. versicolor*'da 1-0.062 µg/ml, *A. carneus*'ta 0.25- 0.062 µg/ml, *A. terricola* 1-0.25 µg/ml, *A. aureolatus*' da ise 0.25 µg/ml, *A. flavus* ve *A. fischeri*'de 0.25 µg/ml, *A. ochraceus*'ta 0.5 µg/ml, *A. parvulus*'ta 0.062 µg/ml, *A. sydowi*'de ise 1 µg/ml olarak saptanmıştır. Tablo-XI'da ITR'ye karşı tüm suşlarda saptanan MİK değerleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

MİK (µg/ml) değerlerinin yüzde dağılımları; *A. fumigatus*'da toplam 70 suşun tamamında (%100) MİK 0.5 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. niger*'de 14 suşun 1'de (%7) 4 µg/ml, 13'de ise (%93) 1 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. versicolor* suşlarının MİK'leri ise 19 suşun 3'de (%16) 1 µg/ml, 16'da (%84) ise 1 µg/ml altında saptanmıştır. *A. flavus* ve *A. fischeri*; izole edilen her bir suş için 0.25 µg/ml, *A. carneus*'ta 2 suşun tamamında 0.25 µg/ml ve altında, *A. terricola*'da 5 suşun tamamı (%100) 1 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. ochraceus*; tek suş 0.5 µg/ml, *A. parvulus* tek suş 0.06 µg/ml, *A. sydowi* tek suş 1 µg/ml, *A. aureolatus*'da ise toplam 3 suşun tümünde (%100) MİK 0.25 µg/ml, standart suşta ise 0.06 µg/ml olarak saptanmıştır. Türlerine göre ITR, MİK'lerinin dağılımı Tablo-XII'de verilmiştir.

4. 6. 3. Vorikonazol

Saptanan MİK (µg/ml) aralıkları; *A. fumigatus*' ta 2-0.125 µg/ml, *A. niger*' de 4-0.5 µg/ml, *A. versicolor*'da 2-0.125 µg/ml, *A. carneus*' ta 1 µg/ml, *A. terricola* 4-0.5 µg/ml, *A. aureolatus*'ta ise 0.5-0.125 µg/ml, *A. flavus* 0.5 µg/ml, *A. fischeri*'de 1 µg/ml, *A. ochraceus*' ta 0.5 µg/ml, *A. parvulus*' ta 0.125 µg/ml, *A. sydowi*'de ise 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Tablo-XI'da VOR'e karşı tüm suşlarda saptanan MİK değerleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

MİK (µg/ml) değerlerinin yüzde dağılımları; *A. fumigatus*'ta 70 suşun 2'sinde (%3) MİK 2 µg/ml, 68'de ise (%97) 1 µg/ml ve altında saptandı. *A. niger*' de toplam 14 suşun 1'i (%7) 4 µg/ml, 1'i (%7) de 2 µg/ml, 12'de (%86) 1 µg/ml ve altında saptandı. *A.versicolor*; 19 suşun 4'de (%21) 2 µg/ml, 15'de (%79) 1 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. terricola*'da ise 5 suşun 1'inde (%20) 4 µg/ml, 4'de (%80) 1 µg/ml ve altında saptanmıştır. *A. flavus*; izole edilen tek suş 0.5 µg/ml, *A. fischeri*; tek suş 1 µg/ml, *A. ochraceus*; tek suş 0.5 µg/ml, *A. carneus*; 2 suşun %100'ü 1 µg/ml, *A. parvulus* tek suş olarak 0.125 µg/ml, *A. sydowi* tek suş 2 µg/ml, *A. aureolatus*; 3 suşun tümü (%100) 0.5 µg/ml ve altında saptanmıştır. Standart suş; tek suş 0.06 µg/ml olarak saptanmıştır. Türlerle göre VOR, MİK'lerinin dağılımı Tablo-XII'de verilmiştir.

4. 6. 4. Flukonazol

Bütün *Aspergillus* türleri ≥ 64 µg/ml'de flukonazole dirençli olarak bulunmuştur. Türlerle göre FLU, MİK'lerinin dağılımı Tablo-XII'de verilmiştir. Amfoterisin B itrakonazol, vorikonazol ve flukonazol'e Karşı 118 *Aspergillus* suşunda saptanan duyarlılıkların dağılımı. Tablo-XIII'de toplu halde sunulmuştur.

Tablo-XII: Amfoterisin B, İtrakonazol, Vorikonazol ve Flukonazol için *Aspergillus* Türlerinde Saptanan MİK Değerlerinin Dağılımı

Antifungal	Dilüsyonlar (µg/ml)	Türler (n=sayı)											
		<i>A.fumigatus</i> (n=70)	<i>A. niger</i> (n=14)	<i>A.versicolor</i> (n=19)	<i>A.flavus</i> (n=1)	<i>A.fischeri</i> (n=1)	<i>A.ochraceus</i> (n=1)	<i>A.carneus</i> (n=2)	<i>A.terricola</i> (n=5)	<i>A.parvulus</i> (n=1)	<i>A.sydowi</i> (n=1)	<i>A.aureolatus</i> (n=3)	Standart suş (n=1)
AMFOTERİSİN B	8												
	4	2		2			1		5		1	2	
	2	62	1	9	1	1		1				1	
	1	5	12	2									
	0,5	1	1	1						1			
	0,25			1									
	0,125			1									
	0,06			3				1					1
İTRAKONAZOL	8												
	4		1										
	2												
	1		3	3					1		1		
	0,5	7	5	8			1		1				
	0,25	62	5	2	1	1		1	3			3	
	0,125	1		1									
	0,06			5				1		1			1
VORİKONAZOL	8												
	4		1						1				
	2	2	1	4							1		
	1	28	7	9		1		2	1				
	0,5	26	5	4	1		1		3			1	
	0,25	13		1						1		1	
	0,125	1		1								1	
	0,06												1
FLUKONAZOL	64	70	14	19	1	1	1	2	5	1	1	3	1
	32												
	16												
	8												
	4												
	2												
	1												

Tablo-XIII: Amfoterisin B, İtrakonazol, Vorikonazol ve Flukonazol' e Karşı 118 <i>Aspergillus</i> Suşunda Saptanan Duyarlılıkların Dağılımı.			
Tür (n=sayı)	Saptanan MİK Aralığı (µg/ml)	Kümeleşmenin Olduğu MİK Aralığı (µg/ml)/ (%)	MİK ≥1 µg/ml olan suşların Oran (%)
<i>A. fumigatus</i> (70)			
Amfoterisin B	2 - 1	2 (%89)	99
İtrakonazol	0.5 - 0.25	0.25 (%89)	0
Vorikonazol	1- 0.25	1-0.5 (%77)	43
<i>A. niger</i> (14)			
Amfoterisin B	2 - 0.5	1(%86)	93
İtrakonazol	1 - 0.5	0.5-0.25(%72)	28
Vorikonazol	1 - 0.5	1-0.5(%86)	85
<i>A. versicolor</i> (19)			
Amfoterisin B	4 - 0.062	2(%46)	69
İtrakonazol	1- 0.062	0.5(%42)	16
Vorikonazol	2 - 0.5	1-2(%68)	68
<i>A. terricola</i> (5)			
Amfoterisin B	4	4	100
İtrakonazol	1 - 0.25	0.25(%60)	20
Vorikonazol	2 - 0.5	0.5(%60)	40
<i>A. aureolatus</i> (3)			
Amfoterisin B	4 - 2	4(%67)	100
İtrakonazol	0.25	0.25	100
Vorikonazol	0.5 - 0.125	0.5-0.125	100
<i>A. carneus</i> (2)			
Amfoterisin B	2 - 0.062	2-0.06 (%100)	50
İtrakonazol	0.25 - 0.062	0.25-0.06(100)	0
Vorikonazol	1	1	100
<i>A. flavus</i> (1)			
Amfoterisin B	2	2	100
İtrakonazol	0.25	0.25	100
Vorikonazol	0.5	0.5	0
<i>A. parvulus</i> (1)			
Amfoterisin B	0.5	0.5	100
İtrakonazol	0.062	0.06	100
Vorikonazol	0.125	0.125	0
<i>A. sydowi</i> (1)			
Amfoterisin B	4	4	100
İtrakonazol	1	1	100
Vorikonazol	2	2	100
<i>A. ochraceus</i> (1)			
Amfoterisin B	4	4	100
İtrakonazol	0.5	0.5	100
Vorikonazol	0.5	0.5	0
<i>A. fischeri</i> (1)			
Amfoterisin B	2	2	100
İtrakonazol	0.25	0.25	100
Vorikonazol	1	1	100
Standart suş (1)			
Amfoterisin B	0.062	0.06	100
İtrakonazol	0.062	0.06	100
Vorikonazol	0.062	0.06	100

Bütün *Aspergillus* türleri ≥64 µg/ml konsantrasyonda flukonazol'e dirençli olarak bulunmuştur.

V-TARTIŞMA

Aspergillus'lar yaşadığımız doğal çevrede yaygın olarak bulunan mantarlardır. Toprak, çürüyen bitkiler ve organik maddeler, doğal yaşam alanlarını oluşturmaktadır (104,105). Bazı kaynaklarda çürümüş bitki örtüsünün, insanlarda en sık aspergilloz hastalığına yol açan *A. fumigatus* için kaynak oluşturduğu da belirtilmektedir (21,106).

İmmün sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak yoğun bakım, transplant ve yanık ünitelerinde yatan hastalarda, invazif aspergilloz insidansının arttığı bildirilmektedir (107,108). *Aspergillus*'lar immün düşkün hastalarda, primer kutanöz aspergilloz, rinosinüzit, trakeobronşit, pulmoner aspergilloz, serebral aspergilloz ve disemine aspergilloz gibi geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilmektedirler (109). Klinik semptomlar, infeksiyonun lokalizasyonuna, konakçının bağışıklık yanıtına göre değişmekle birlikte genellikle nonspesifiktir ve progressif bir seyir izlemektedir (104).

Hastalığın erken tanısı, çoğu zaman şüphelenilmediği için gecikmeli olarak yapılmaktadır. Bu durum ise hastaların prognozunu olumsuz yönde etkilemekte ve %80'leri aşan mortaliteyle sonuçlanmaktadır (110). *Aspergillus* türlerinin neden olduğu invazif hastalıkların tedavisinde amfoterisin B altın standarttır (111). Vorikonazol, itrakonazol ve kaspofungin gibi antifungal ilaçlarda tedavide kullanılan diğer ajanlardır (112). *Aspergillus* konidiyalarının ortama yayılmasında ve invazif hastalıkların oluşmasında çevrenin rolü büyüktür (113). *Aspergillus* konidiyalarının çevreye yayılmasında ve insanlara bulaşmasında hava ve su önemli rol oynamaktadır (104).

Aspergillus türleri, uygun ısı ve nem koşullarında organik maddeler üzerinde çoğalarak miçeliyal yapılar oluştururlar. Geliştirdikleri konidiyoforlar aracılığı ile havaya bol miktarda konidiya salınmasına neden olurlar. Sporlar, ortamdaki hava hareketlerine bağlı olarak buldukları yerlerden havaya karışarak uzak bölgelere taşınabilmektedirler (114). Hem tanısı hemde tedavisinde zorluklar

yaşanan *Aspergillus* türlerinin çevremizdeki kaynaklarının anlaşılması ve hangi yollarla hastalara bulaştığının bilinmesi önem taşımaktadır (104).

Bu çalışmada hastane içi (acil servis, hastane girişi, poliklinikler koridoru, ameliyathane giriş koridoru) ve hastane dışı başta olmak üzere yoğun bakımlar (Yenidoğan yoğun bakım, Kardiyovasküler Cerrahi yoğun bakım, Dahiliye yoğun bakım), göğüs hastalıkları servisi ve diyaliz ünitelerinden hava örnekleri toplayarak, ortamdaki *Aspergillus* türlerini ve bu türlere ait birim alandaki ortalama spor sayılarını saptamaya çalışıldı. Bunun için, bir yıllık süreyi kapsayan üçer aylık periyodlar (sonbahar-kış-ilkbahar-yaz dönemi) halinde bir çalışma planlandı. Çalışma için Afyonkarahisar ilindeki merkeze bağlı dört büyük hastane seçildi.

Ortamdaki *Aspergillus* türlerinin saptanmasında; sıvı içinde yakalama, katı yüzeye çarpma tuzakları, sedimentasyon, filtrasyon, sentrifügasyon, elektrostatik presipitasyon, termal presipitasyon olmak üzere 7 farklı grupta mikrobiyolojik hava örnekleme yöntemleri kullanılmaktadır (115,116). Yaygın olarak başlıca plak açma yöntemi ve kısa sürede yüksek hacimde hava toplayabilen hava örnekleme cihazları kullanılmaktadır (117). Çalışmamızda, 30 saniye içinde 50 litre havayı aspire ederek, delikli filtre aparatından 5 µm'den küçük partiküllerin geçişine izin veren, Air/IDEAL 90 mm biocollector (bioMerieux, Fransa) cihazı kullanılmıştır. Hava örnekleme cihazı ile toplanan örneklerden, 11 farklı türde toplam 118 *Aspergillus* suşu izole edilmiştir. *A. fumigatus*, %59 oranı ile en fazla izole edilen tür olmuştur. *A. versicolor* ve *A. niger* ise sırası ile %16 ve %12'lik oranlar ile izole edilen diğer türlerdir. İnternet tabanlı <http://www.bioline.org.br/request?oc00173> Web sitesinde, *A. fumigatus*'un, diğer türlere oranla doğada daha yaygın bulunduğu ve en sık aspergilloz hastalığına neden olan tür olduğu belirtilmektedir (104,105).

Tavora ve arkadaşları, hastane ortam havasında mikoflora araştırması yapmışlardır. Hava örnekleri, doğal yöntemlerle havalandırması yapılan, renal transplant ünitesi, karaciğer transplant odası, hematoloji servisi, dahiliye servisi, idari birimler koridoru gibi bölümlerden toplanmıştır. Mikolojik incelemelerde

Penicillium türlerinden sonra *Aspergillus* türlerinin ikinci sırada en yüksek hifli mantar türü olduğu saptanmıştır (118). Latge JP'nin; yaptığı bir reviuve çalışmasında da, *A. fumigatus*' un havadaki saprofitik mantarların başında geldiği belirtilmektedir (89). Yapılan birçok klinik çalışmada da, klinik materyallerden en fazla bu türün saptandığı görülmektedir (119,120). Yapılan çalışmada başta *A. fumigatus* olmak üzere, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. terricola* en sık izole edilen türler olmuştur. Çalışmamızda en fazla *A. fumigatus* türünün saptanması, çevre ve klinik örneklerle yapılan birçok çalışma ile paralellik göstermiştir (121).

Bir yıllık çalışmamız sırasında, Devlet Meteoroloji Genel Müdürlüğünden alınan üçer aylık ortalama ısı ve bağıl nem değerleri sırasıyla, sonbahar dönemi için; 12.3 °C ve % 70 nem, kış dönemi için; 1.0°C ve %73 nem, ilkbahar dönemi için; 11 °C ve %54 nem, yaz dönemi için; 25 °C ve %41 nem şeklindedir. Tüm *Aspergillus*'ın %48'i sonbaharda, %18'i kış aylarında, %19'u ilkbaharda, %15'de yaz aylarında yapılan çalışmalarda izole edilmiştir. En sık izole edilen *A. fumigatus* türünün %64'ü sonbahar, %4'de yaz aylarında saptanmıştır. *A. versicolor*'un %53'ü yaz aylarında izole edilirken, sonbahar aylarında saptanmamıştır. *A. niger*'in %50'si de kış aylarında izole edilirken, ilkbahar döneminde saptanmamıştır. İzole edilen suşların %13'nü de diğer *Aspergillus* türleri oluşturmaktadır. Bunların da %53'ü sonbahar aylarında, %7'si yaz, %7'si de ilkbahar aylarında saptanmıştır.

Mantarlar, genel olarak 0-60°C ısı aralığında üreyebilme yeteneklerinde olup üremeleri için nemli ortamlara gereksinim duyarlar. Küf türü mantarlar ise çoğunlukla oda ısısında 20-25°C üreyebilmektedirler. *Aspergillus*'lar için oksijenli ve %90-100 nem oranları en uygun ortam olup, 12-45°C gibi geniş bir ısı aralıklarında üreyebilmektedirler (122,123). Patojen türlere ait sporların uygun nem ve sıcaklıkta 4-8 kat şişerek hif formuna döndükleri ve 36-48 saat içinde sporulasyon fazına geçtikleri belirtilmektedir (21). Guinea ve arkadaşlarının İspanya'da yaptıkları bir çalışmada; ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış aylarında olmak üzere, kırsal ve kentsel bölgelerden 332 hava ve 148 su örneği toplamışlardır. Bu çalışmada 200 tanesi *A. fumigatus* olmak üzere toplam 369 *Aspergillus* türü izole edilmiştir. Ayrıca sonbahar aylarında, diğer mevsimlere

oranla daha fazla *Aspergillus* izole edildiği bildirilmektedir (121). Türkiye’de çevredeki *Aspergillus* türü mantar sporları ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmaların büyük kısmı çevreden küf türü mantar aranması tarzındadır. Şimşekli ve arkadaşlarının, 1995-1996 tarihleri arasında Isparta ilinde yaptıkları bir çalışmada, bölgenin alerjen fungus türleri saptanmaya çalışılmış ve %2.2 oranında *Aspergillus* türleri saptanmıştır (124). Otken ve arkadaşlarının, 2002 yılında Edirne’de yaptıkları çevresel fungus sporları araştırmasında ise %6 oranında *Aspergillus* türü izole edilmiştir (125).

Vural ve arkadaşlarının Diyarbakır’daki baharatçılardan topladıkları, karabiber, kimyon, yenibahar, toz biber, kırmızı ve siyah pul biber örneklerindeki küf mantarı kontaminasyonu çalışmasında sırası ile %70, %80, %90, %90, %60, %30 oranında küf kontaminasyonu saptamışlardır. Tüm baharatlarda *A. flavus*, *A. fumigatus* ve *A. niger* türü küfler izole edildiğini bildirmişlerdir (126). Aziz ve Youssef, et ürünlerinde kullanılan çeşitli baharatlarda yaptıkları çalışmada ise *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin yaygın olarak saptadıklarını bildirmişlerdir (126).

Çetinkaya ve arkadaşları, 2001-2002 yılları arasında Afyon bölgesinde yaptıkları ev içi küf mantarı sporları araştırmasında, %18 oranında *Aspergillus* türü saptamışlardır. Bu çalışmada uygun çevre sıcaklığının ve yüksek nem oranlarının bölge havasındaki fungal spor sayısını ve çeşitliliğini arttırdığı vurgulanmıştır (127). Çalışmamızda, *Aspergillus* spor yoğunluğunun, ortamın nemi ve ısısına bağlı olarak sonbahar ve ilkbahar aylarında arttığı, yaz aylarında ise en düşük seviyeye indiği görülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda sonbahar mevsiminde elde ettiğimiz *Aspergillus* sayısındaki artışlar literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur.

Bir yıllık sürede izole edilen 118 *Aspergillus* suşunun 61’i (%52) ANS hastanesinden saptanmıştır. Sonbahar dönemindeki 57 *Aspergillus* türünün 46’sı (%81) da ANS hastanesinden, 2’si (%3) GHH’den izole edilmiştir. ANS hastanesinden izole edilen *Aspergillus* türlerinin 8’i (%17) YB’dan, 11’i (%24) hastane dışından, 22’de (%48) hastane içinden izole edilmiştir. Yaz döneminde

izole edilen 18 *Aspergillus* suşunun 9'u (%50) GHH'si, 6'sı (%33) ANS hastanesinden alınan hava örneklerinde saptanmıştır. Sonbahar ve yaz aylarında heriki hastanede yapılan çalışmalarda toplam 63 (%53) suş izole edilmiştir. İzole edilen tüm suşların 61'i (%52) ANS hastanesi, 24 tanesinde (%20) GHH'den saptanmıştır. Bu bulgulara göre izole edilen tüm suşların 85'i (%72) ANS hastanesi ve GHH hastanelerinden saptanması dikkat çekici olmuştur. Hem mevsimsel oranların yüksekliği hemde bir yıllık çalışmada, bu iki hastaneden yüksek oranda *Aspergillus* saptanması havadaki *Aspergillus* spor yoğunluğunu arttıran diğer risk faktörlerini akla getirmiştir.

Çalışmalarımız süresince ANS hastanesi ve GHH de, gerek hastane içinde ve gerekse hastane çevresinde restorasyon ve rekonstrüksiyon gibi inşaat aktiviteleri yapılmaktaydı. Söz konusu hastanelerdeki ek bina ihtiyacı nedeniyle sürdürülen inşaat çalışmalarının hastanemiz ve GHH ki *Aspergillus* spor yoğunluğunu arttırdığı tahmin edilmektedir. Literatür taramalarında hastane içi ve dışındaki inşaat çalışmalarının, ortamdaki spor yoğunluğunu arttırdığına ilişkin çok sayıda yayın bulunmaktadır (1,36,102).

Warris ve arkadaşları; bina içerisindeki restorasyon çalışmaları ve bina etrafındaki çevre düzenlemeleri sırasında toz toprak veya çürümüş organik maddelerin karıştırılmasının, ortam havasındaki *Aspergillus* spor yoğunluğunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca rutin temizlik sırasında birikmiş tozların çevreye yayılması, su sızıntıları ve nem birikimi gibi çevresel risk faktörleri de, spor yoğunluğunu arttıran diğer nedenler arasında sıralanmıştır (104). Wanke ve arkadaşları; benzer şekilde hastane içi ve dışındaki inşaat aktiviteleri ile hastane kaynaklı invazif aspergilloz salgınları arasında yakın ilişkiler olduğunu vurgulamaktadırlar (105,114). Nozokomiyal salgınların oluşmasında, hastanelerdeki havalandırma sistemlerinin yetersiz olması, vakumlu temizlik sistemleri ve pencere tipi klima, nemli ahşap malzeme kullanımı, asma tavan ve süs bitkilerinin de kolaylaştırıcı rol oynadığı bildirilmektedir (128-130).

Faure ve arkadaşları; Fransa'daki bir hastanenin 17 farklı biriminden, 8 yıl boyunca toplam 3822 yüzey örneği toplayarak mikolojik araştırma yapmışlardır.

Örneklerin mikrobiyolojik incelemelerinde, 42 (%4) *A. fumigatus* ve 83'de (%8) diğer *Aspergillus* türleri izole edilmiştir. Yapılan istatistiki analizler sonucunda, doğal yollarla ortam havalandırılması yapılan pediatrik hematoloji servisinin *A. fumigatus* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Bu kontaminasyonun daha önce hastane içinde yapılan inşaat çalışmalarından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (131).

Lee ve arkadaşları; Kore'de, yüksek risk taşıyan binalarda oturan apartman sakinlerinin bioaerosollere maruziyetini araştırılmışlardır. Bu çalışmada, bina içi döşemelerin, mevsimsel değişikliklerin ve yağış durumunun bioaerosol oluşumunu etkiledikleri vurgulanmıştır. Oda içi ve oda dışı bioaerosol konsantrasyonlarının yaz mevsimine oranla kış mevsiminde, yağışlı dönemlerde yağışsız döneme kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu dönemlerde oturma ve yatak odasında yapılan ölçümlerde *Aspergillus* türleri hakim mantarlar olarak saptanmıştır (132).

Aktif hava örnekleyici cihazlar, belli bir miktar havayı toplayarak, uygun besiyeri üzerine püskürtürler. Sonuçlar belli bir hacimdeki koloni oluşturan ünit (cfu/m^3) olarak verilmektedir. İzolasyon odaları ve ameliyathanelerde kabul edilebilir sınır; $< 5 \text{ cfu}/\text{m}^3$, ideal sınır ise; $0.01 \text{ cfu}/\text{m}^3$, filtre edilmemiş havada; $1-15 \text{ cfu}/\text{m}^3$, filtre edilmiş hastane havasında ise $0.01 \text{ cfu}/\text{m}^3$ olarak belirtilmektedir (117).

Sonbahar döneminde ANS hastanesinin yoğun bakımlarından toplam $160 \text{ cfu}/\text{m}^3$ hastane dışından $220 \text{ cfu}/\text{m}^3$, hastane içindeki bölümlerden de $440 \text{ cfu}/\text{m}^3$ *Aspergillus* suşu izole edilmiştir. Yaz döneminde *Aspergillus* spor yoğunluğunun artış gösterdiği GHH' nin, hastane içerisinden ise $180 \text{ cfu}/\text{m}^3$ *Aspergillus* suşu izole edilmiştir. Bu değerler üç aylık ölçümlerin toplamını yansıtmaktadır. Bu değerlerin 3 aylık ortalaması göz önüne alındığında elde edilen değerlerin, filtre edilmemiş havanın m^3 'de bulunması gereken azami spor sayısı olan $1-15 \text{ cfu}/\text{m}^3$ 'ün çok üzerinde olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara göre her iki hastanenin de yapılan inşaat çalışmaları sırasında *Aspergillus* sporları ile yoğun bir şekilde kontamine olduğunu göstermektedir.

Spor yoğunluğu ile ilgili olarak Durmaz ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları bir çalışmada; hastane yoğun bakımlarından alınan 77 hava örneğinin %18.2 de *Aspergillus* saptanmıştır. Genel cerrahi hasta odasında 20 cfu/m³ *A. flavus*, aynı servisin yoğun bakım ünitesinde ise 60 cfu/m³ *A. niger*, anestezi yoğun bakımında 20 cfu/m³ *Aspergillus spp.* ve 20 cfu/m³ *A. niger* saptamışlardır (133).

Bina içi ve dışındaki mevcut yapı, onarım, kazı gibi inşaat aktivitelerinin, ortamda atıl olarak bulunan *Aspergillus* sporlarını hareketlendirerek ANS hastanesi ve GHH'ki spor yoğunluğunu arttırdığı söylenebilir. Söz konusu hastanelerin ısıtma yada soğutma yapan merkezi havalandırma sistemleri de bulunmamaktadır. Hastane bölümlerinin havalandırılması genellikle açık kapı-pencere gibi doğal yöntemlerle sağlanmaktaydı. Bu faktörlerinde dış ortam havası ile direkt ilişki sağlayarak, hastane içindeki spor yoğunluğunun artmasına katkıda bulunduğunu tahmin edilmektedir. Bu öngörümüz, benzer birçok makaledeki bilgilerle de uyumluluk göstermektedir (1,36,102).

İnvazif aspergilloz, ampirik yada profilaktik AMB ve azollerin kullanımına rağmen yine de oluşabilmektedir. Tedavi edilmeyen invazif aspergillozlu bazı hasta gruplarında mortalite %100'ken, AMB'le tedavi edilen hastalarda bu oran %34 olarak bildirilmektedir (134) . Ağır komplikasyon ve mortalite gelişmesinde, *Aspergillus*'larda ki antifungal ilaçlara karşı direnç artışının sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Daha önce ampirik yada profilaktik antifungal kullanımı, *Aspergillus* türlerinde direnç sıklığını arttırdığına dair görüşlerde bulunmaktadır. Özellikle FLU kullanımının AMB direncini arttırdığını savunan raporlar yayınlanmıştır (135). Son yıllarda *Aspergillus* türleri arasında azoller ve AMB'nin duyarlılık paternlerin de değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Özellikle *A. terreus*'un AMB'ye karşı çoğunlukla dirençli olduğunu bildiren çok sayıda yayınlanmış raporlar vardır (136). Doğal antifungal direnci bulunan türlerin sebep olduğu invazif aspergilloz'lar, ağır komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle izole edilen *Aspergillus*'ın tür seviyesinde identifiye edilerek antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerektiği görüşü ağır basmaktadır (119,137).

Bu çalışmada izole ettiğimiz tüm *Aspergillus* suşlarında, CLSI'ın filamantöz mantarlar için önerdiği M38-A prosedürünü kullanarak FLU, AMB, VOR ve ITR antifungalleri ile duyarlılık çalışması yapılmıştır. *Aspergillus* türü mantarların mikrodilüsyonla antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasında CLSI tarafından önerilen M27-A, M38-P, M38-A gibi metodlar kullanılabilir (112). Antifungal duyarlılık çalışmalarının yapıldığı ideal metodun; kolay uygulanabilir olması, üreticiliğinin iyi olması, kesin sonuç vermesi ve maliyetinin düşük olması tercih nedeni olmaktadır. Filamantöz fungusların antifungal duyarlılık testi için CLSI M38-A metodunu altın standart prosedür olarak bildirilmektedir. CLSI tarafından geliştirilen M38-A protokolü, çok fazla örneğin çalışıldığı laboratuvarlar için uygun bir yöntem olmakla birlikte oldukça zaman alıcı ve prosedürü uzun bir metod olarak bilinmektedir (138).

Yapılan literatür taramalarında, hastane içi ve hastane dışından hava örnekleri toplayarak izole edilen *Aspergillus*'ların antifungal duyarlılık testlerinin çalışıldığı benzer bir çalışmaya ulaşamadık. Yapılan antifungal duyarlılık çalışmalarının çoğunda ya klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus*'lar ya da hem klinik hem de çevresel örneklerden izole edilen *Aspergillus* türleri kullanılmıştır. Çevremizdeki *Aspergillus* türlerinin duyarlılık paterneleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada, izole edilen 11 farklı türde 118 *Aspergillus* suşuna, CLSI'nin *Aspergillus* türü küf mantarları için önerdiği M 38A prosedürü kullanılarak amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve flukonazol'e karşı duyarlılıkları araştırıldı (103). Antifungallerdeki duyarlılık ve dirençlilik sınırının ne olduğu konusunda henüz tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Ancak bu konuda çalışma yapan birçok yazar, genellikle kendi deneyimlerine dayanarak antifungal MİK değerinin 1 µg/ml'nin altında olmasını, duyarlılık sınırı olarak kabul etmektedirler (107).

Araujo ve arkadaşları; M38-A metodunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, *A. niger* ATCC kontrol suşunda AMB, ITR, VOR antifungallerine karşı MİK değerini 1 µg/ml'nin altında bulmuşlardır (107). Yaptığımız duyarlılık

çalışmasında ise *A. niger* ATCC 9142 kalite kontrol suşunun; AMB, VOR ve ITR antifungallerine karşı MİK değeri 0.06 µg/ml olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuç makalede belirtilen duyarlılık sınırının altında çıkarak literatürle uyumlu bulunmuştur. Yaptığımız antifungal duyarlılık çalışmasında;

İtrakonazol için; tüm suşların %99'da MİK ≤ 1 µg/ml sadece tek bir *A. niger* izolatında MİK 4 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. fumigatus* suşlarının %100'nün MİK'i ≤ 1 µg/ml olarak saptanmıştır.

Vorikonazol için; tüm suşların sadece %2'de MİK 4 µg/ml, %7'de MİK 2 µg/ml, %92'de ise MİK değeri ≤ 1 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. fumigatus* suşlarının %3'de MİK 2 µg/ml, %97'de ise MİK ≤ 1 µg/ml olarak saptanmıştır. *Aspergillus* türlerinde azol direnci nadir görülen bir durumdur. Ancak son yıllarda bazı *Aspergillus* türlerinde, antifungallere karşı direncin arttığına dair raporlar yayınlanmaktadır. *A. fumigatus*'ta ITR direnci ilk kez 1997 yılında Denning ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (139).

Howard ve arkadaşları; yaptıkları bir klinik çalışmada, uzun süre ITR ve VOR ile tedavi edilen kronik kaviter Aspergilloz ve aspergillomalı hastalarda, *A. fumigatus* izolatlarında ITR ve VOR'le karşı eşzamanlı direnç saptadıklarını bildirmişlerdir (140). Denning ve arkadaşları; *A. fumigatus*'un etken olduğu ve tedavisinde başarısızlık yaşanan üç klinik izolatın, yapılan hayvan deneylerinde klinik direncinin olduğu ve ITR; MİK değerinin >8 µg/ml üzerinde olduğu bildirilmiştir (141). Dannaoui ve arkadaşları; ITR tedavisine yanıt alınamayan dört *A. fumigatus* klinik izolatında MİK>16 µg/ml olarak saptamışlardır (142).

Veweij ve arkadaşları; 130 klinik 20 çevresel toplam 150 *A. fumigatus* suşunda AMB, ITR, VOR için agar dilüsyon yöntemi ile duyarlılık çalışması yapılmışlardır. Bütün suşlarda ITR MİK' i 0.25-0.5 µg/ml arasında bulunmuştur. Klinik ve çevresel suşların duyarlılıklarında önemli farklılıklar saptanamamıştır (143). Guinea ve arkadaşları; 175'i hastane dışından, 135' de hastane içinden ve 286 klinik *Aspergillus* suşu ile birlikte toplam 596 *Aspergillus* suşuyla, M38-A prosedürüne uygun olarak antifungal duyarlılık çalışmaları yapmışlardır. Bu

çalışmada VOR, en aktif ilaç olarak bulunmuştur. Tüm suşlarda azollerin MİK'i ≤ 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çevresel ve klinik izolatların antifungal duyarlılıkları arasında önemli farklar bulunmamıştır (144).

Meneau ve arkadaşları; klinik ve çevre kökenli 400 *A. fumigatus* suşunda azollere direnç araştırması yapmışlardır. 10'u klinik, 36'da çevre kökenli toplam 46 *A. fumigatus* suşunda azollere karşı yüksek MİK saptadıklarını bildirmişlerdir (145). Verweij ve arkadaşları; 23 farklı tıp merkezinde 53 yıl süresince izole edilen 170 *A. fumigatus* klinik izolatında in vitro antifungal duyarlılık çalışması yapmışlardır. Sadece üç *A. fumigatus* suşunda yüksek ITR direnci saptadıklarını, tüm suşlarda ise VOR MİK'lerinin duyarlı bulunduğunu bildirilmişlerdir (146). Lionakis ve arkadaşları; standart test metodu M38-A prosedürünü kullanarak 105 klinik *Aspergillus* izolatında antifungal duyarlılık çalışması yapmışlardır. İzolatların %50'de VOR MİK'i 0.5 µg/ml, ITR MİK'i 1 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. niger*'in %83'de, *A. fumigatus*'ın %28'de, *A. flavus*'un %11'de ITR direnci saptadıklarını bildirmişlerdir (135). Chandrasekar ve arkadaşları; 593 klinik izolat üzerinden yaptıkları duyarlılık çalışmasında en fazla izole edilen tür olarak *A. fumigatus*'ta AMB için; 0.5 µg/ml, ITR için; 1 µg/ml, VOR için; 0.5 µg/ml MİK değerlerini bulmuşlardır. *A. fumigatus* ve diğer türlerin antifungal duyarlılıklarında önemli bir fark bulmamışlardır (147).

Duyarlılık sınırı ≤ 1 µg/ml olarak kabul edildiğinde, çalışmamızda ITR için; suşların %99'da, VOR için; suşların %92'de, AMB içinde; suşların %25'in de MİK değeri ≤ 1 µg/ml olarak saptanmıştır. İnvazif aspergilloz hastalığına yol açan en önemli tür olan *A. fumigatus* suşlarının %100'de ITR MİK'i ≤ 1 µg/ml saptanırken, suşların %97'de ise hem VOR hemde ITR MİK'i ≤ 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu haliyle bulgularımız azol grubu antifungaller için yukarıda yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumlu çıkmıştır.

Amfoterisin B için; tüm *Aspergillus* suşlarının %75'de MİK ≥ 2 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. fumigatus* suşlarının %91'nin AMB MİK'i > 1 µg/ml olarak saptanırken, *A. fumigatus* dışındaki tüm suşların %52'de ise MİK ≥ 2 µg/ml olarak bulunmuştur.

Lass-Flörl ve arkadaşları; *A. terreus* infeksiyonlarının artış gösterdiği ve in vitro olarak AMB'ye dirençli *A. terreus* soyları saptadıklarını rapor etmişlerdir (135,148). Torres ve arkadaşları; *A. fumigatus* ve diğer türlerin etken olduğu invazif aspergillozun klinik seyri ile AMB ve ITR'nin in vitro korelasyonlarını karşılaştırdıkları bir çalışmada *A. fumigatus*'a oranla diğer türlerde AMB'ye daha yüksek MİK oranları saptadıklarını bildirmişlerdir (137). Çevresel ve klinik 596 *Aspergillus* suşuyla yapılan çalışmada suşların 9'da (%1.5) AMB MİK'i $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ saptanmıştır (144).

Lass-Flörl ve arkadaşları; *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus*'un etken olduğu bir klinik çalışmada amfoterisin B'nin MİK değerinin $2 \mu\text{g/ml}$ 'den yüksek olduğu ve tedavideki başarısızlığın nedeni olarak yüksek MİK değerlerini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar *A. fumigatus* veya *A. flavus* infeksiyonlu nötropenik hastalarda hayatta kalım süresi ile AMB MİK'nin $<2 \mu\text{g/ml}$ olması arasında pozitif koroleasyon olduğunu, AMB direncinin tedavide başarısızlıklara yol açtığını bildirmişlerdir (149).

Yapılan antifungal duyarlılık çalışmasında; çevre kökenli *A. fumigatus*'larda AMB MİK'i $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ olanların oranı %91, *A. fumigatus* dışı türlerin %52'de ise MİK $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Klinik çalışmalarda elde edilen yüksek AMB MİK' i, bizim çevre kaynaklı *A. fumigatus* suşlarında saptadığımız yüksek AMB MİK' leri ile paralellik göstermesi, literatüre ile uyumlu bulunmuştur (137).

Ingroff-Espinel ve arkadaşları; sekiz laboratuardaki *A. fumigatus* ATCC suşlarında, M38-A prosedürü kullanılarak yapılan antifungal duyarlılık sonuçlarını derledikleri çalışmalarında, *A. fumigatus*' ta AMB için; $1-4 \mu\text{g/ml}$, ITR için; $0.06- 0.5 \mu\text{g/ml}$, VOR için; $0.0015- 0.12 \mu\text{g/ml}$ MİK aralığı kullanılmıştır. *A. fumigatus*' un dirençli ATCC suşunda AMB MİK' i suşların %98.7 ' de $0.5-4 \mu\text{g/ml}$, ITR MİK'i suşların %95.7'de $0.25-2 \mu\text{g/ml}$, VOR %100'de $0.25-1 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (150).

Yapılan antifungal duyarlılık deneylerinde; AMB, ITR ve VOR için daha geniş MİK aralığı olarak, $8-0.125 \mu\text{g/ml}$ sınırları kullanılmıştır. Çevresel

Aspergillus izolatlarındaki olası en yüksek MİK aralığını saptayabilmek amacıyla bu sınırlar tercih edilmiştir. Bu çalışmada, *A. fumigatus*'ta; AMB için 4-0.5 µg/ml, ITR için 0.5-0.125 µg/ml, VOR içinde 2-0.125 MİK aralıkları saptanmıştır. *A. fumigatus*'ın %100'de AMB için 0.5- 4 µg/ml, ITR için %100'de 0.125- 0.5 µg/ml, VOR için % 100'de 0.125- 2 µg/ml MİK aralığı bulunmuştur. Yukardaki makale baz alındığında *A. fumigatus* için saptadığımız MİK aralıkları literatürle uyumlu bulunmuştur.

Flukonazol için; identifiye edilen tüm *Aspergillus* suşları, FLU \geq 64 µg/ml ilaç konsantrasyonlarında dirençli olarak saptanmıştır. *Aspergillus* türü mantarlarda flukonazol'e intrensek bir direnç söz konusudur. Flukonazol ve ketokonazol'ün, *Aspergillus*'lara karşı etkisiz olduğu bildirilmektedir (149,151). Bizim çalışmamızda kullanılan 118 *Aspergillus* suşunun tamamının yüksek doz FLU'e dirençli çıkması literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Balajee ve arkadaşları; immün yetmezliği bulunan hastalardan izole edilen 128 *A. fumigatus*'ta ITR, VOR ve AMB karşı duyarlılık çalışması yapmışlardır. Sadece on izolatta ITR MİK'i \geq 1 µg/ml, yedi suşta VOR MİK'i \geq 2 µg/ml olarak saptanmıştır (152). Araujo ve arkadaşları; yoğun bakım üniteleri ve 17 farklı birimlerinden 4 yıl boyunca toplanan hava ve su örneklerinden 307 çevresel ve hastalardan izole edilen 139 klinik *Aspergillus* suşunda antifungal duyarlılık çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada çevresel kaynaklı bir *A. niger* ITR MİK \geq 4 µg/ml ve *A. nidulans* suşunda ITR MİK \geq 2 µg/ml, üç *A. terreus* suşunda AMB MİK'i \geq 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Çevresel ve klinik suşlar mukayese edildiğinde, *A. fumigatus* dışı klinik soylarda ITR ve AMB MİK değerlerinde önemli yükseklikler saptanmıştır (107).

Yapılan duyarlılık çalışmasında, çevre kaynaklı bir *A. niger* suşunda ITR MİK \geq 4 µg/ml, bir *A. flavus* suşunda AMB MİK'i \geq 2 µg/ml olması ve *A. fumigatus*'ın % 100'nün ITR'ye, %97'nin VOR'e duyarlı çıkması literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Guinea ve arkadaşlarının, 279 klinik *A. fumigatus* izolatu ile yaptıkları bir çalışmada ise, sırası ile VOR, ITR ve AMB en etkili antifungallar olarak

bulunmuştur. 273 suşta AMB MİK'i; 2 µg/ml, ITR; 1 µg/ml, VOR; 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır (153).

Yapılan antifungal duyarlılık deneylerinde ise sadece çevresel kaynaklı yetmiş *A. fumigatus* suşu kullanılmıştır. *A. fumigatus* suşlarında saptanan MİK değerleri şu şekildedir; AMB için suşların %97'de ≤ 2 µg/ml, ITR için suşların %100'de ≤ 0.5 µg/ml, VOR içinde izolatların %97'de ≤ 1 µg/ml dır. Çevresel *A. fumigatus* ve *A. flavus* suşlarında ITR direnci saptanmamıştır. Klinik izolatların antifungallere daha dirençli olduklarını ve ITR ve VOR için MİK oranlarını yüksek saptayan çalışmalarda vardır (152). Klinik izolatlardaki bu direnç yüksekliği göz önünde bulundurulduğunda elde edilen bu bulgular, yukardaki makalelerle uyumlu çıkmıştır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir yıllık sürede, Afyonkarahisar Devlet Hastanesi, Afyon Kocatepe Devlet Hastanesi ve Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Araştırma ve Uygulama Hastanesine ait on farklı bölümünden, sonbahar-kış-ilkbahar ve yaz aylarında olmak üzere periyodik olarak hava örnekleri toplandı. Çalışma sonucunda 11 farklı türde toplam 118 *Aspergillus* suşu izole edildi. Tüm suşlardan, altın standart M38-A mikrodilüsyon metodu ile antifungal duyarlılık çalışması yapıldı.

Tüm *Aspergillus*'ların 14'ü (%12) KDH, 19'u (%16) ADH, 24'ü (%20) GHH, 61'i de (%52) ANS hastanesinden elde edilen hava örneklerinden izole edilmiştir. Tüm suşların 85'i (%72) Kocatepe üniversitesi araştırma ve uygulama hastanesinden ve göğüs hastalıkları hastanesinden izole edilmiştir. Mekan genişletme ve ek bina ihtiyacı için inşaat çalışmalarının yapılması, bu hastanelerdeki *Aspergillus* spor yoğunluğunun artmasına sebep olmuştur.

İzole edilen *Aspergillus*'ın 21 (%18) kış, 57'si (%48) sonbahar, 22'si (%19) ilkbahar, 18 (%15) yaz döneminde yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Sonbahar aylarında ölçülen ortalama hava sıcaklığı ve nem oranı sırası ile, 12.3 °C ve %70'dir. Ayrıca *A. fumigatus*'ın %64'ü, diğer *Aspergillus* türlerinin de %53'ü sonbahar aylarında saptanmıştır. Bu bulgular, uygun ortam sıcaklığı ve yüksek nem oranının *Aspergillus*'ın üremesine katkı da bulunduğunu göstermektedir.

Yapılan antifungal duyarlılık çalışmasında *Aspergillus* suşlarının tümü test edildi. *A. fumigatus*'ın tamamında ITR MİK'i ≤ 0.5 µg/ml, VOR MİK'i ≤ 2 µg/ml, 68'de (%97) ise AMB MİK'i ≤ 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Tek bir *A. niger* suşunda ITR MİK'i 4 µg/ml saptanırken, *A. fumigatus* dışı 2 suşta (*A. niger* ve *A. terricola*) VOR MİK'i 4 µg/ml, 9 suşta ise AMB MİK'i 4 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu da bize, çevre kaynaklı *A. fumigatus* dışı türlerde AMB'ye dirençli suşların olduklarını göstermektedir. Tüm suşlarda FLU dirençli olarak saptanmıştır.

Hastane içi ve çevresindeki yıkım, onarım, bakım gibi inşaat işlerinin varlığı, yüzeylerde birikmiş olan tozların etrafa yayılmasını kolaylaştırmakta ve ortam havasındaki spor yoğunluğunu arttırmaktadır. Bu durum, yüksek riskli hastalarda, hastane kaynaklı invazif aspergilloz hastalığı gelişimine sebep olabilmektedir. Bu cinsin yeleri halen lösemi tedavi merkezlerinde ve solid organ transplantasyonu yapılan ünitelerde başta gelen ölüm sebebi olarak bildirilmektedir. Spesifik tanı metodlarının ve tedavi edici rejimlerin hala sınırlı olması nedeniyle invazif aspergillozis'te mortalite %30-90 oranında seyretmektedir.

Bu nedenle tarama çalışmalarında hastane havasındaki *Aspergillus* spor yoğunluğunu saptayabilmek için belirli aralıklarla hastane içi hava örneklerinin toplanması gerekmektedir. Hastane dışında ve hastane içinde ve özellikle yüksek risk taşıyan immün süprese hastaların bulunduğu servis ve odaların periodik olarak hava örneklerinin alınarak, mikolojik incelemelerinin yapılması gerekmektedir. Hastanelerdeki inşaat, onarım, yıkım çalışmaları gibi yüksek riskli durumlarda mantar spor yoğunluğu monitörize edilmelidir. Hava kaynaklı biyolojik partiküllerin dağılımını, yayılımını azaltmak için hava kontrol ölçümlerinin yapılması önemlidir. Yüksek riskli hastaların yatırıldığı hastane odalarının pozitif basınçli olması, odalarda yüksek derecede hava filtre edebilen HEPA ve LAF filtrelerinin kullanılması önerilmektedir.

Aspergillus cinsi mantarlarda özellikle de vre kökenli *A. fumigatus* dışı türlerde antifungal direnç artmaktadır. En iyi alternatif antifungal tedavinin seçilebilmesi ve mevcut laboratuvar metodlarını kullanarak antifungal direncin önceden tahmin edilmesi, hastalık prognozu açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle *Aspergillus*'ın tür düzeyinde tanımlanması ve standart metodlar kullanarak in vitro antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi zorunludur.

VII-ÖZET

Aspergillus'lar, dünyanın özellikle kuzey yarım küresinde, Antartika dahil olmak üzere dünyanın her tarafında yaygın olarak bulunan küf grubu filamantöz mantarlardır. Bu cins içinde patojen ve fırsatçı patojen olan türler bulunmaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, yüksek mortalite ile sonuçlanan invaziv hastalıklara yol açabilmektedirler. Çalışmamızda Afyonkarahisar bölgesinde, merkeze bağlı dört hastanenin on farklı ünitesinden hava örnekleri toplayarak, ortamda bulunan *Aspergillus* türleri ile ısı ve nem gibi çevre şartlarının *Aspergillus* spor yoğunluğu üzerine olan etkilerinin araştırılması, izole edilen *Aspergillus*'ların CLSI M38-A mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

Hava örnekleri, Air/IDEAL 90 mm biocollector (BioMerieux, Fransa) cihazı kullanılarak toplanmıştır. Bu örneklerin ilk kültürleri 40 mg Gentamisin ilaveli PDA ve subkültürleri ise Czapek-Dox agarda gerçekleştirilmiştir. Mikolojik yöntemler ile toplam 118 *Aspergillus* suşu [%59'u *A. fumigatus*, %12'si *A. niger*, %16'sı *A. versicolor*, %4'ü *A. terricola*, %1'i *A. flavus*, %1'i *A. parvulus*, %1'i *A. ochraceus*, %1'i *A. sydowi*, %1'i *A. fischeri*, %2'i *A. aureolatus*, %2'de *A. carneus*] izole ve tanımlanmıştır. Çalışmamızda *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. versicolor* en sık izole edilen türlerdir.

Tüm *Aspergillus* suşlarının %72'si ANS Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Göğüs Hastalıkları Hastanesinden izole edilmiştir. *Aspergillus*'ın %48'i sonbahar, %15'i de yaz döneminde izole edilirken, *A. fumigatus*'ların %64'ü sonbahar, *A. versicolor*'ların %53'ü de yaz dönemindeki çalışmalarda saptanmıştır. Sonbahar döneminde, 8 farklı türde, 57 *Aspergillus* suşu izole edilmiştir. Hastane bölümlerinde yapılan çalışmalarda, tüm izolatların %38'i hastane içinden, %14'ü göğüs hastalıkları servisi hasta odasından, %24'ü yoğun bakımlardan ve %6'da diyaliz ünitelerinden saptanmıştır.

İzole edilen tüm suşlarda, itrakonazol, vorikonazol, flukonazol ve amfoterisin B'ye karşı antifungal duyarlılık çalışması yapılmıştır. Duyarlılık sınırı ≤ 2 µg/ml kabul edildiğinde tüm suşların %100'ü flukonazol'e dirençli saptanmıştır. Sırasıyla itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B en etkili antifungaller olarak bulunmuştur.

VIII-SUMMARY

Aspergillus are mould group filamentous fungus that are found on every part of the earth including Antarctica and especially on Northern hemisphere. In this genus, there are pathogen and opportunistic pathogen species. Especially in immunocompromised patients, it can lead to invasive illnesses caused in high mortality. In this study air samples were collected from ten different units of four hospitals in Afyonkarahisar region. The aim of the study was investigation of *Aspergillus* species found in the environment, the effects of humidity and heat on the *Aspergillus* spor density and the detection of antifungal susceptibility of *Aspergillus* by CLSI M 38-A microdilution method.

Air samples were collected by using AIR/IDEAL 90 mm biocollector (BioMerieux, France). First cultures of these samples were inoculated in 40 mg Gentamicin added PDA and their subcultures were inoculated in Czapek-Dox agar. Totally 118 *Aspergillus* strain [%59 *A. fumigatus*, %12 *A. niger*, %16 *A. versicolor*, %4 *A. terricola*, %1 *A. flavus*, %1 *A. parvulus*, %1 *A. ochraceus*, %1 *A. sydowi*, %1 *A. fishcheri*, %2 *A. aureolatus*, %2 *A. carneus*] were isolated and identified by mycologic methods. In our study, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. versicolor* were the most isolated species.

Total of %72 *Aspergillus* strains were isolated from Afyon Kocatepe University hospital and Chest Diseases Hospital. While %48 of all *Aspergillus* were isolated in the autumn and %15 in the summer, %64 of *A. fumigatus* were detected in the autumn and %53 of *A. versicolor* were detected in the summer periods. In the autumn period, 57 *Aspergillus* strain in 8 different species were isolated. In the studies carried out in the hospital units, %38 of all isolates were detected inside the hospital, %14 of the isolates from chest diseases ward room, %24 from the intensive care unit and %6 from the dialysis units.

In all the strains which were isolated, itraconazol, voriconazol, fluconazol, amfoterisin B, antifungal susceptibility study were performed. In case of

susceptibility threshold accepted $\leq 2\mu\text{g/ml}$, %100 of all the strains were detected resistant to fluconazol. It was found that itraconazol, voriconazol and amfoterisin B are the most effective antifungals, respectively.

IX-KAYNAKLAR

1. 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, 2006:1174.
2. Denning D.W. Aspergillosis: diagnosis and treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1996;6:161-8.
3. İnci R. Aspergilloz. In: Ustaçelebi Ş. ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi;1999:1093-1097
4. Kantarcıoğlu A.S, Yücel A, *Aspergillus* species and invasive aspergillosis; Mycology, pathogenesis, laboratory diagnosis, resistance of antifungal agent and susceptibility tests. *Cerrahpaşa J Med*. 2003; 34: 140-157.
5. Huffnagle GB. Investigating Invasive Aspergillosis. *Am J Respir Critl Care Med*. 2002;166:1159-1160
6. Kauffman C. A. Fungal infections, *Proceedings Am Thorac Soc*. 2006;3:35-40
7. Fedorova N.D, Khaldi N, Joardar V.S et al. Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Plos Genetics*. 2008;4:4
8. Kuştimur S, *Aspergillus*, *Fusarium* ve diğer küf mantarları, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Kitabı, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2002: 1833-40.
9. Michail S. Lionakis, Russell E. Lewis, Increased frequency of non-fumigatus *Aspergillus* species in amphotericin B- or triazole-pre-exposed cancer patients with positive cultures for aspergilli. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*. 2005;52:15-20

10. Chiller, T. M., and D. A. Stevens. Treatment strategies for *Aspergillus* infections. *Drug Resist.* 2000; 3:89-97
11. Morris G, Kokki M.H. Anderson K, Richardson M.D. Sampling of *Aspergillus* Spores in Air. *J Hospital Infect.* 2000; 44: 81-92.
12. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, GA, 30333: 2003.
13. <http://www.answers.com/topic/aspergillus-1?cat=health> (Ulaşım: 20.04.2008)
14. Fennell D.I, Raper K.B. New Species and Varieties of *Aspergillus*. *Mycologia.* 1955;1:68-89
15. Denning D.W. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1998; 26:781-805.
16. Gams W, Niterink HA, Samson RA, Stalpers JA, CBS Course of Mycology. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1980:190.
17. Gams W, Samson R.A. 1985. Typification of *Aspergillus* and related telemorph genera. In: Samson R.A. and Pitt J.I.(eds), Advances in *Penicillium* nad *Aspergillus* systematics. Plenum Pres, New York, USA: 23-31.
18. Uzun Ö. Fungal pnömoniler. Solunum Sistemi Hastalıkları. Toraks Kitapları, 2001;3:265-82
19. Cheetham H.D, Subcutaneous Infection Due to *Aspergillus terreus*, *J Clin. Path.* 1964;17:251-253
20. Kirschstein R.L, Sidransky H. Mycotic Endocarditis of the Tricuspid Valve Due to *Aspergillus flavus*. *AMA Arch Pathol.* 1956;62:103-6

21. Ziskind J, Pizzolato P, Buff E.E. Aspergillosis of the Brain. *Am J Clin Pathol.* 1958;29:554-9.
22. Metin D.Y, Kiraz N. *Aspergillus* taksonomisinde yenilikler. In:Ener B. ed. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu:Bursa, 2006, 25-29.
23. Denning DW. *Aspergillus* species. In:Mandell GL. Bennett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2674-85.
24. Cole GT, Samson RA. Patterns of Development in Conidial Fungi. London San Francisco Melbourne: Pitman, 1979:190
25. Poyraz Ö. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. Cumhuriyet Üniversitesi yayınları, Sivas: No.101, S: 140, 2006.
26. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/FungusID.pdf>. (Ulaşım: 25.04.2008)
27. Diba K, Kordbacheh P, Mirhendi SH, et al. Identification of *Aspergillus* species using Morfological Characteristics. *Pak J Med Sci.* 2007; 6:867-872.
28. Gow N.A.R., Gadd G.M. The Growing Fungus. London. Chapman&Hall, 1995:41-99
29. Levery SB, Momany M, Lindsey R et al. Distribution of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc: ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle and hyphal growth. *FEBS Lett.* 2002;525:59-64.
30. Temel Mikrobiyoloji (Temel Mikrobiyoloji ; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda. Medisan Yayın Serisi no 46. 2000 yılı basımı 548 sayfa kitap.) <http://www.mikrobiyoloji.org> (Ulaşım:20.04.2008)

31. Rocus R, Klont, Monique A.S.H, Mennink-Kertsen et al. Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1467-74.
32. Zeichner-Ostrosky L, Alexander B.D, Kett D.H. et al. Multicenter Clinical Evaluation of the (1-3) β -D-Glukan Assay as an Aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. *Clin Infect Dis.* 2005;41:654-9.
33. Antifungal Tedavide Yenilikler. *ANKEM Derg.* 2006;20:27-37.
34. Tomee J.F.CH, Kauffman H.F. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exper Allergy.* 2000;30: 476-484.
35. Brookman JL and Denning DW. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3:468-74.
36. Warris A, Voss A, Veweij P. E. Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmission? *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:156-162.
37. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2003;71:3551,62.
38. Brakhage AA, Liebmann B. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Med Mycol.* 2005;43(suppl 1):75-82.
39. Rementeria A, Lopez- Molina N, Ludwig A et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:1-23.
40. Bennett J.W, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiology Rev.* 2003;497-516

41. Ghannoum MA. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 12:122-43.
42. Walmsley S, Devi S, King S, Schneider R, Richardson S, Ford-Jones L. Invasive *Aspergillus* infections in a pediatric hospital: a ten-year review. *Ped Infect Dis.* 1993;12:673-682.
43. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol.* 2004; 42:81-6.
44. Kelmenson V.A. Treatment of Pulmonary Aspergillosis. *Chest.* 1959;36:442-443.
45. Allam MF, Del Castillo AS, Diaz-Molina C, Navajas RF. Invasive pulmonary aspergillosis: Identification of risk factors. *Scand J Infect Dis.* 2002; 34: 819-822.
46. Latge JP, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbil Rev.* 1999;12:310-50.
47. Aran N. Mikotoksinler In: Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş, eds. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No 36. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1999: 43-7.
48. Aran N. Mikotoksin ile Kontamine Gıdaların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. In. Yeğenoğlu Y, Ertuna Z, eds. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No 46. İstanbul: Çatı Grafik, 2003:314-20.
49. Russell R, Paterson M. Aflatoxins contamination in chilli samples from Pakistan. *Food Control.* 2007; 18:817-820.

50. Cabanes F.J, Accensi F, Bragulat M.R, Abarca M.L. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? *Int J Food Microbiol.* 2002;79:213-215.
51. Fog Nielsen K. Mycotoxin Production by Indoor Molds. *Fungal Genet Biol.* 2003;39:103-17.
52. Fredj M.B.S, Chebil S, Lebrihi A. et al. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *Int J Food Microbiol.* 2007;113:245- 250.
53. Aktay G, Çoban S. Mikotoksikozis ve aflatoksinler. *Toksikol derg.* 2005;3:5-8.
54. Guarro J, Genr J, Stchigel A.M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiology Rev.* 1999; 12:454-500.
55. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. <http://www.aspergillus.org.uk/secure/articles/pdfs/16543029.pdf> (Ulaşım: 12.11.2007)
56. Fungal Biology. <http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology>. (Ulaşım: 20.04.2008)
57. Geiser DM, Timberlake WE, Arnold ML. Loss of Meiosis in *Aspergillus*. *Mol Biol Evol.* 1996;13:809-17.
58. Debuchy R, Turgeon BG. Mating- type structure, evolution and function in Euascomycetes. In: Kües U, Fischer R eds. The mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality. Berlin: Springer Verlag, 2006
59. Stevens D.A, Kan V.L, Judson M.A et al. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis*, 2000;30:696-709
60. Taşova Y. Sistemik Etkili Antifungallerin Rutin Dışı Uygulama Yolları, *ANKEM Derg.* 2006;20:33-35.

61. İnci R. *Aspergillus*, *Pseudallescheria* ve Mukormikoz Etkenleri, In: Hakkı Dündar İ.ed. Current İnfeksiyon Hastalıkları tanı ve tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri 2004;751-759.
62. Usta M, Ersoy A, Güllülü M, Ener B ve ark. Renal Transplant Alıcılarında *Aspergillus* Pnömonisi. *Archives Pulmonary*. 2001;1:25-28.
63. Yenel M.N, Kalayoğlu S, Sanwara İ, Tabak L, Sargın D, Yoğun Kemoterpi Ünitesinde Eş Zamanlı Ortaya Çıkan Dört İnvazif Pulmoner Aspergilloz Olgusu. *Toraks derg*. 2000; cilt 1, sayı 2.
64. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın H.E. İnfeksiyon ve Kulak Burun Boğaz Hastalıkları, Ankara: Güneş kitabevi,1996; 2389-2391,
65. Tümbay E. Pratik Tıp Mikolojisi. İzmir: Bilgehan Basımevi, 1983:120-3.
66. Bodur H, Ozoran K, Colpan A, Balaban N, Tabak Y, Kulacoglu S .(Bkz. Özel konakta infeksiyon) Arthritis and Osteomyelitis due to *Aspergillus fumigatus*: A 17 years old boy with chronic granulomatous disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2003.
67. Hope WW, Walsh TJ . Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:609-22.
68. Toscano C.M, Jarvis W.R. Epidemiology and Clinical Aspect of Unusual Fungal Nosocomial Infections. Clinical Updates In: *Fungal Infections*, Estados Unidos, 1999;2:1- 5.
69. İnci R, Hilmioğlu S. Nozokomiyal Fungal İnfeksiyonlara Yaklaşım. *Klimik Derg*. 2000;13:28-31.

70. Karacan Ö, Akçay Ş, Eyüboğlu F.Ö, Çelik N, ve ark. Solid Organ Transplant Alıcılarında İnvaziv Pulmoner Aspergillozis. *Tüberküloz Toraks Derg.* 2003;51:177-182.
71. Bilezikci B, Demirhan B, Haberal A.N, Arıkan Ü. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Solid-Organ Transplant Recipients: Postmortem Histopatologic Findings. *Turk J Med Sci.* 2002;32:31-34.
72. Bouza E, Guinea J. Workload due to *Aspergillus fumigatus* and significance the microbiology laboratory of a general hospital. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2075-9.
73. <http://www.aspergillus.org.uk/education/InvasAspergUpdate-Optimized.ppt>. (Ulaşım:18.04.2008)
74. Mycology Online.
<http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Oppportunistic/Aspergillosis/>
(Ulaşım:18.04.2008)
75. Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. İdentification of pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiol Immunol.* 2002;46:841-8.
76. Kami M, Fukui T, Ogawa S. Et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1504-12.
77. Buchheidt D, Baust C, Skladny H. et al. Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus species* in bronchoalveolar lavage samles of neutropenic patients. *British J Haemathol.* 2002;116: 803-811.
78. Durmaz R. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri. In: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Malatya, 2001; 35-43.

79. Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer but Still a Ways to Go. *Clin Infect Dis.* 2006;42:487-9.
80. Monique A S H Mennink-Kertsen, Rocus R Klont, Warris A. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. *The Lancet.* 2004;363.
81. Florl CL, Aigner J, Gunsilius E, et al. Screening for *Aspergillus spp.* using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *British J Haemathol.* 2001;113:180-4.
82. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology.* 2005;43 (Suppl 1):5125-5128.
83. Fenelon L.E. Hamilton A.J. Figueroa J. et al. Production of Specific Monoclonal Antibodies to *Aspergillus species* and Their Use in Immunohistochemical Identification of Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1999:1221-1223.
84. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, Pauw BE. Et al. Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay compare with Pastorex latex Agglutination test for Diagnosing Invasive Aspergillosis in Immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1912-1914.
85. Valerio R. Aquino, Luciano Z Goldani, Alessandro C. Pasqualotto. Update on the Contribution of Galactomannan for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Mycopathologia.* 2007;163:191-202.
86. Pfeiffer C.D. Fine J.P. Safdar N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1417-27

87. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:497-500.
88. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, et al. *Aspergillus* Galactomannan Antigen in the Cerebrospinal Fluid of Bone Marrow Transplant Recipients with Probable Cerebral Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002:1496-1499.
89. Singh N, Paterson D.L. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. *Clin Microbiol Reviews.* 2005: 44-69.
90. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E 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 Syndrom. *CIC.* 2004;39:199-205.
91. Jerry W.P, Sant H.W, Bowles C.A.P. Evaluation of a (1→3) -β-D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol.* 2005:5957-5962.
92. Dismukes W.E. Introduction to Antifungal Drugs. *Clin Infect Dis* 2000;30:653-7
93. Somer A. İnvazif Mantar İnfeksiyonlarının Tedavis. *Çocuk Enf Derg.* 2007;1: Özel sayı 1;29-32.
94. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;36(Suppl 1):31-41.
95. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:550-63.

96. Mutlu G, Yücesoy M. *Aspergillus* Türlerine Karşı Antifungaller Ve Direnç Mekanizmaları. In: Ener B. ed. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları Ve Klinik Mikoloji Simpozyumu. 15-18 Haziran 2006, Bursa:251-255.
97. Klich M.A. Biogeography of *Aspergillus* Species in Soil and Litter. *Mycologia*. 2002;94:21-27
98. Walsh T.J, Dixon D.M. Nosocomial Aspergillosis: Environmental Microbiology, Hospital Epidemiology, Diagnosis and Treatment. *Eur J Epidemiol*. 1989;5:131-142
99. Vonberg R-P. Gastmeier P., Nosocomial aspergillosis in outbreak settings, Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Medical School Hannover, Germany, *J Hospital Infec*. 2006; 63:246-254..
100. Tümbay E. Türkiye’de Aspergilloz. In: Ener B. ed. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları Ve Klinik Mikoloji Simpozyumu. 15-18 Haziran 2006, Bursa:10-20.
101. Brakhage, Axel A. Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Current Drug Targets*. 2005; 6: 875-886
102. Sixt N, Dalle F, Lafon I, Aho S, Couillault G et al. Reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair™ system(Airinspace). *J Hospital Infect*. 2007; 65:156-162.
103. NCCLS. 2004. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
104. Warris A, Verweij P.E. Clinical implication of environmental sources for *Aspergillus*. *Medical Mycology*. (Suppl I), 2005;43;559-565

105. Wanke B, Santos Lazéra MD, Nucci M. Fungal Infections in the Immunocompromised. *Host. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000;95:153-158
106. Vandenberg MFQ, Verweij PE, Voss A. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections: Invasive aspergillosis and the environment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;34:221-227.
107. Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues G.A. Susceptibility of Environmental Versus Clinical Strains of Pathogenic *Aspergillus*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 108-111
108. Steinbach W.J, Stevens D.A, Denning D.W, Moss R.B. Advances against Aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(Suppl 3):155-6.
109. Denning DW. Aspergillosis in “Nonimmunocompromised” Critically III patients. *Am J Resp Critical Care Med.* 2004;170:580-581.
110. Yapar N. *Aspergillus* ve Diğer Mantarlar. In: Eraksoy H ed. III. Ulusal Yoğun Bakım İnfeksiyonları Simpozyumu.2007;20:30-32.
111. Sutton D. A, Sanche S. E, Revankar S. G, Fothergill A.W, Rinaldi M. G. In vitro Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus terreus* with a Head-to-Head Comparison to Voriconazole. *J Clin Microbio.* 1999; 2343-2345.
112. Rex J.H, Pfaller M.A, Walsh T.J. et al. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clin Microbio Review.* 2000: 643-658.
113. Cornet M, Levy V, Fleury L et al. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999; 20:508-513.

114. Streifel AJ. Desing and maintenace of hospital ventilation systems and prevention of airborne nosocomial infection. In: Mayhall CG ed. Hospital epidemiology and infection control. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 1999:1211-21.
115. Tovey E.R, Gren B.J. Measuring environmental fungal exposure. *Medical Mycology*. 2005;43(Suppl I):567-570.
116. Gangneux JP, Gicquel G, Chevrier S, Guiguen C. Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers With 2 Culture Media. *Inf Control Hospital Epidemiol*. 2006;27:1-4.
117. Ergon C. Hastanelerde İnşaat ve Tesisat Sistemi Kaynaklı İnfeksiyon Etkenleri. In: Varlık N ed. VIII. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi/teskon 2007;217: 453-464.
118. Tavora L.G.F, Gambale W, Heins-Vaccari E.M et al. Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Brazilian J Med Biol Resarch*. 2003;36:613-616.
119. Xess I, Mohanty S, Jain N. et al. Prevalance of *Aspergillus species* in Clinical Samples İsolated in an Indian Tertiary Care Hospital. *Indian J Med Sciences*. 2004; 58:513-519
120. Yapar N, Şener A, Kuruüzüm Z, Yücesoy M, Yüce A. Bir Üniversite Hastanesinde Bir Yıllık Dönemde İzlenen İnvazif Fungal İnfeksiyonların Değerlendirilmesi. *Klimik Derg*. 2005;18:67-70.
121. Guinea J, Pelaez T, Alcalá L, Bouza E. Outdoor environmental levels of *Aspergillus spp.* conidia over a wide geographical area. *Medl Mycology*. 2006;44:349-356
122. İnci R. Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflanması, In:

Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 1020-1021.

123. Yuluğ N, Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Kitabı, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2002: 1777-1785.

124. Şimşekli Y, Akkaya A, Gücin F, Ünlü M, Yorgancıgil B. Isparta Şehrinin Havasında Bulunan Alerjen Fungus Sporları. *Akciğer Arşivi*. 2000;1: 9-12.

125. Otken S.S, Asan A, Tungan Y, Ture M. Sonbahar Mevsiminde İki Örnekleme Metodu Kullanarak Edirne İlinin Doğusunda Havayla Taşınan Fungal Konsantrasyonların Belirlenmesi. *Trakya Univ J Sci*. 2005; 6:97-106.

126. Vural A, Kaya N.B.A, Mete M. Bazı Öğütülmüş Baharatlarda Küf ve Maya Florasının İncelenmesi. *Dicle Tıp Derg*. 2004;31:15-19

127. Çetinkaya Z, Fidan F, Unlu M, Hasenekoglu et al. Assesment of Indoor Air Fungi in Western-Anatolia, Turkey. *Asian Pacific J Allergy Immun*. 2005:23-27

128. Arnow PM, Sadigh MC, Weil D, Chudy R. Endemic and epidemic aspergillosis associated with inhospital replication of *Aspergillus* organisms. *J Infect Dis*. 1991;164:998-1002.

129. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital setting. *J Clin Microbiol*. 1998;36: 1494- 1500.

130. Şardan YÇ. Hastanede *Aspergillus* İnfeksiyonlarının Kontrolü, *Aspergillus'* la Kontamine Havanın Temizlenmesi. Klinikte *Aspergillus* İnfeksiyonları Simpozyumu,2007;71-76.

131. Faure O, Fricker-Hidelo H, Lebeau B, Mallaret R.M, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *J Hosp Infect.* 2002;50:155-160.
132. Lee J-H, J W-K. Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols at Korean high-rise apartment buildings. *Environmental Research.* 2006;101:11-17.
133. Durmaz G, Kiremitci A, Akgün Y, Öz Y, Kaşifoğlu N, Aybey A, Kiraz N. Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen Nozokomiyal İnfeksiyonlar İle Hava Kaynaklı Kolonizasyon İlişkisi. *Mikrobiyol Bült.* 2005;39:465-471.
134. Steinbach W.J, Stevens D.A. Review of Newer Antifungal and Immunomodulatory Strategies for Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2003; 7:157-87
135. Lionakis MS, Lewis RE, Torres HA.et al. Increased frequency of *non-fumigatus Aspergillus species* in amphotercin B-or triazole-pre-exposed cancer patients with positive cultures for aspergilli. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;52:15-20.
136. Rogers T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents* 2006;27S: S7-S11.
137. Torres H.A, Rivero G.A, Lewis R.E et al. Aspergillosis Caused By *non-fumigatus Aspergillus species*: risk factors and in vitro susceptbility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diag Microbiol Inf Dis.* 2003;46:25-28.
138. Guinea J, Pelaez T, Alcalá L et al. Correlation Between the E test and the CLSI M-38A Microdilution Method to Determine the Activity of Amphotericin B, Voriconazole and Itraconazole Against Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56:53-55

139. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1364-8.
140. Howard SJ, Webster I, Moore CB, Gardiner RE. Et al Multi-azol resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:450-453.
141. D.W. Denning *et al.*, Correlation between in vitro susceptibility testing to itraconazole and in vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 40: 401–414
142. Dannaoui E, Borel E, France Monier M. et al. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47: 333- 340.
143. Veweij P.E, Mensink M, Rijs M.M.J.A, et al. In-vitro activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:389-392.
144. Guinea J, Pelaez T, Alcalá L. et al. Antifungal Susceptibility of 596 *A.fumigatus* Strains Isolated From Outdoor Air Hospital Air and Clinical Samples:analysis by site of isolation. *Atimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3495-3497
145. Meneau I, Sanglard D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol*. 2005; 43(suppl.1): S307-11.
146. Verweij PE, Debbie T.A, Dorsthorst T, Rijs A.J.M.M, et al. Nationwide Survey of In Vitro Activities of Itraconazole and Voriconazole Against Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates Cultured Between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2648-50.

147. Chandrasekar P.H, Cutright J.L, Manavathu E.K. *Aspergillus*: Rising frequency of clinical isolation and continued susceptibility to antifungal agents, 1994-1999. *Diag Microbiol Inf Dis*. 2001;41:211-214.
148. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *British J Haematol*. 2005;131:201-7.
149. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich .P.M, and Niederwieser D. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J. Antimicrob Chemother*. 1998 ;42:497-502.
150. Ingroff-Espinel A, Fothergill A, Ghannoum M, et al. Quality Control and Reference Guidelines for CLSI Broth Microdilution Susceptibility Method (M38-A Document) for Amphotericin B, Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;5243-5246.
151. Liao Robert S, Michael Dunne W. Current Concepts In Antifungal Susceptibility Testing, Part II. *Clin Microbiol News*. 2003;25(24).
152. Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 1197-1203
153. Guinea J, Pelaez T, Alcalá L, Bouza E. Comparison of Sensititre YeastOne with the CLSI M-38A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, Voriconazole and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Inf Dis*. 2006;56:53-55.