



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASPERGİLLOZ TANISINDA KULLANILAN
KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gonca YILMAZ

**Samsun
Temmuz-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASPERGİLLOZ TANISINDA KULLANILAN
KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gonca YILMAZ

**Danışman
Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ**

**Samsun
Temmuz-2017**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gonca YILMAZ tarafından Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ danışmanlığında hazırlanan “ASPERGİLLOZ TANISINDA KULLANILAN KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 25 /07/2017 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye: Yard. Doç. Dr. Yeliz Tanrıverdi ÇAYCI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ayşe Esin AKTAŞ

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.../.../2017

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisini ve deneyimini her zaman paylaşan, tez çalışmalarım süresince bilimsel desteğini esirgemeyen, sorularımı bıkmadan sabırla cevaplayan, her zaman yanımda hissettiğim çok değerli hocam tez danışmanım ve bölüm başkanım Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bölümünde, eğitimim boyunca bilimsel katkılarından dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a, beni hiçbir zaman geri çevirmeyen, yardımlarını esirgemeyen, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Kemal BİLGİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans süresince bana her konuda destek olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı asistan, doktora öğrencileri, yüksek lisans öğrencileri ve laboratuvarında birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tez süresince teknik konularda yardımını esirgemeyen Bio. Çağrı ÇAVDAR'a ve Mikoloji Laboratuvarı'nda çalışan arkadaşım Bio. Selvi SARITAŞ' a katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca yanımda olup beni destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili eşime, her zaman bana ilham veren biricik oğluma ve değerli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.15.022 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ASPERGİLLOZ TANISINDA KULLANILAN KONVANSİYONEL VE SEROLOJİK YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Amaç: Aspergillozun erken ve doğru tanısı, tedavinin zamanında başlaması ve gereksiz antifungal kullanımı açısından önemlidir. Çalışmada, konvansiyonel yöntemler ile *Aspergillus*'a özgü bir antijen olan galaktomannan (GM)'ın tanıdaki değerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metot: Temmuz 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi kliniklerinde yatmakta olan hastalardan alınan klinik örnekler Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışmaya dahil edildi. Konvansiyonel yöntemler için klinik örnekler direkt mikroskopi ve kültür ile değerlendirildi. Serum ve bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde galaktomannan antijeni (GA) Platelia *Aspergillus* (BioRad, France) kiti ile araştırıldı.

Bulgular: İnvaziv aspergilloz şüpheli hastalar "European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group" (EORTC/MSG) kriterlerine göre 21' i yüksek olasılıklı, 6' sı düşük olasılıklı olarak sınıflandırıldı. Kesin İA saptanmadı. İA olmadığı görülen 23 hasta da kontrol grubu olarak değerlendirildi. Hasta grubunun %63' ünün klinik örneklerinin direkt mikroskobik incelemelerinde *Aspergillus* ile uyumlu hif yapısı gözlemlendi. Kültür incelemelerinin de %77,8' inde *Aspergillus* türleri üredi. Kültürü pozitif hastalarda GA testi duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %52, %79 olarak belirlendi. Hastaların %81,8' inde GA testi pozitifliğinin kültür pozitifliğinden 5,1 gün öncesinde ortaya çıktığı saptandı.

Sonuç: Galaktomannan antijeni, İA şüpheli hastalarda klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgular saptanmadan önce, hastalığın erken döneminde pozitifleşebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus*; direkt mikroskobik inceleme; galaktomannan; invaziv aspergilloz; kültür

Gonca YILMAZ, Yüksek Lisans Tezi,

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Temmuz 2017

ABSTRACT

COMPARISON OF CONVENTIONAL AND SEROLOGICAL METHODS USED IN THE ASPERGILLOSIS DIAGNOSIS

Aim: Not to apply unnecessary treatments, also to cure Aspergillosis in-time and accurately, early and specific galactomannan antigen (GM) diagnosis seems to play a crucial role model. This study was performed to reveal this importance by comparison between conventional and GM testing methods for diagnose.

Material Method: In this study clinical samples were collected from inpatients of Ondokuz Mayıs University Health Care and Research Center Clinics from July-2016 upto May-2017; Study was performed in Medical Microbiology Laboratory, OMU, Samsun, Turkey. Direct microscopic examination and culturing were administrated as conventional techniques of screening while, serum and bronchoalveolar lavage sample's GA ELISA kit assay (Platelia Aspergillus, BioRad, France) examination were used as mid-tech qualitative method.

Results: Based on "European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group" (EORTC/MSG) criterias, patients with invasive aspergillus indication classified into two groups of 21 and 6 patients with high and low prevalence, respectively. Non were recorded as IA infected patients. 23 patients with no IA infection indication evaluated as control group. 63% of main study group were found to have aspergillus hypha structure in their clinical sample during direct microscopic examination. Meanwhile, sample cultures showed 77,8% positive aspergillus results with species variety of sample. For culture positive samples, GA ELISA test were found to be 52% and 79% sensitive and specificity, respectively. For 81,8% of patients, GA ELISA test positive results were recorded 5,1 days (average) earlier compared to culturing.

Conclusion: For patients with IA indication, GA ELISA test can be found positive earlier, even before clinical, laboratory and radiologic diagnostic procedures.

Keywords: *Aspergillus*; direct microscopic examination; galactomannan; invasive aspergillosis; culture

Gonca YILMAZ, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
α	: Alfa
β	: Beta
μm	: Mikrometre
ABPA	: Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz
AIDS	: Acquired İmmune Deficiency Syndrome
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BDG	: 1-3 β -D glukan
BHI	: Beyin kalp infüzyon agar
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CHSG	: Chitin synthase G
DHN	: Dihidroksinaftalin
dk	: Dakika
DMİ	: Direkt mikroskopik İnceleme
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EIA	: Enzyme immunoassay
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC	: European Organisation for Research on Treatment of Cancer
MSG	: Mycoses Study Group
FDA	: Food and Drug Administration
g/L	: Gram/litre
GHS	: Göğüs Hastalıkları Servisi
GM	: Galaktomannan
GMS	: Gomorinin methanamin gümüş boyası
HKHT	: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
IFAT	: İmmün floresan antikor testi

İA	: İnvaziv aspergilloz
İPA	: İnvaziv pulmoner aspergilloz
kDa	: Kilodalton
KİT	: Kemik iliği transplantasyon
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KOH	: Potasyum hidroksit
KT	: Kemoterapi
MB	: Mikobiyotik Agar
ng/ml	: Nanogram/mililitre
NHL	: Non hodgkin lenfoma
nm	: Nanometre
NNIS	: National Nosocomial Infection Surveillance
NPD	: Negatif prediktif değer
OD	: Optik Dansite
PAS	: Periodicacid-Schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroz agar
PPD	: Pozitif prediktif değer
RIA	: Radio immünassay
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonuclease
ROR	: Reaktif oksijen radikalleri
rpm	: Devir/dakika
RT	: Renal Transplantasyon
SDA	: Sabouraud-dekstroz agar
SSS	: Santral sinir sistemi
Tak	: Trakeal aspirat
TZP	: Piperasilin tazobactam
YRBT	: Yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri	3
2.3. Genel Özellikler	4
2.3.1. Hücre Yapısı	6
2.3.2. Antijenik Özellikler	8
2.3.3. Virulans Faktörler	8
2.4. Patogenez	11
2.5. Klinik Özellikler	11
2.6. Tanı Yöntemleri	15
2.6.1. Direkt Tanı Yöntemleri.....	18
2.6.2. İndirekt Tanı Yöntemleri	22
2.7. Radyolojik Tanı	25
2.8. Epidemiyoloji.....	25
2.9. Tedavi	26
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1. Hastalar ve Örnekler	28
3.2. MATERYAL	28
3.2.1. Besiyeri ve Boya Hazırlanması.....	28
3.3. METOT.....	30
3.3.1. Örneklerin Mikolojik İncelemesi.....	30
3.3.2. Serolojik Test	31
3.3.3. İstatiksel Analiz	33

4. BULGULAR.....	34
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri.....	34
4.2. Hasta Grubunun Direkt Mikroskopik İnceleme (DMİ) ve Kültür Sonuçları... 37	37
4.3. Antifungal Kullanımı.....	39
4.4. Radyolojik Bulgular.....	39
4.5. Galaktomannan Antijeni Test Sonuçları.....	39
4.6. Direkt Mikroskopik İnceleme ve Kültür Sonuçlarının Değerlendirmesi.....	40
4.7. Kültür ve Galaktomannan Antijeni Test Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	41
4.8. Galaktomannan ile Radyolojik Bulguların Karşılaştırılması.....	41
4.9. Galaktomannan ile Kültürün Tanı Koyma Süresi Açısından Karşılaştırılması42	42
4.10. Galaktomannan Pozitifliği ile Konvansiyonel Yöntemlerin Tanı Koyma Açısından Karşılaştırılması.....	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	63
Ek 1. Etik Kurul Raporu.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

1. GİRİŞ

Yeryüzünde farklı iklim ve doğal koşullarda yaşamını sürdüren *Aspergillus* cinsi yaklaşık olarak 300 türden oluşan hifli mantarlardır. İlk kez İtalyan rahip ve botanist Pietro Antonio Micheli tarafından 1729 yılında tanımlanmıştır. Bu mantarların mikroskoptaki konidioforlarının görünüşleri, hristiyan ayinlerinde kutsal su serpmeye yarayan aspergillumun şekline benzemesinden dolayı bu cinse *Aspergillus* adı verilmiştir (Denning, 1998). Doğada toprak, çürümüş bitki örtüsü ve organik maddelerde saprofit olarak yaşayarak, ürettikleri enzimler sayesinde organik maddelerin ayrıştırılmasını sağlarlar (Washington ve ark., 2006; Denning, 1996). Bu hifli mantarların farklı türleri tanımlanmışsa da sadece 20 türünün insanlarda hastalık yaptığı bilinmektedir (Latge, 1999).

Aspergillus sporları hava yoluyla yayılarak insanlar tarafından gerek solunum gerekse bozulmuş deri dokusundan alınabilmektedir. Bağışıklık sistemi normal olan kişilerde solunum yolu ile alınan sporlar, makrofajlar tarafından yok edilirken, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde invaziv hiflere dönüşerek bronş ve damarlara invazyon yapmaktadır (Thompson ve ark., 1995; Won ve ark., 1998). Böylece *Aspergillus* konidyalı kolonizasyondan invaziv pulmoner aspergilloza (İPA) kadar değişen klinik durumlara neden olabilmektedirler (Patterson, 2005).

Son yıllarda solid organ tümörü ve hematolojik malignensili gibi hastalara uygulanan immünsüpresif tedavi protokolleri, immün sistemi baskılanmış hasta sayısında artışa neden olduğu için, fırsatçı patojen olan *Aspergillus* türlerine ait enfeksiyonların arttığı gözlemlenmektedir (Huffnagle, 2002). İnvaziv aspergilloz gelişiminde en önemli risk faktörleri arasında derin ve uzamış nötropeni olguları yer alırken, sitotoksik kemoterapiye bağlı mukozal savunma bariyerlerinin bozulması, proflaktik ve geniş spekturumlu antibiyotik tedavilerinin uygulanması sonucu mikrobiyal floranın bozulması da risk faktörleri arasında yer almaktadır (Brakhage, 2005). Olgu fatalite hızının yüksekliği sadece risk faktörü taşıyan hasta sayısındaki artış ile değil, tanıdaki yetersizliklerle de ilişkilendirilmektedir (Kantarcioglu ve Yücel, 2005).

İnvaziv aspergillozun erken ve doğru tanısı hastaların yaşamlarını etkileyecek önemli bir faktördür. Ancak klinik bulgular özgül olmamakla beraber başka hastalıklar ile karışabilir. Bu nedenle özellikle nötropenisi olan hastalara uygulanan yaklaşım

genellikle uzunca bir süre amprik antifungal tedavi uygulanması yönündedir (Walsh ve ark., 2008). İA' un klinik tanısında altın standart; biyopsi veya iğne aspirasyon ile alınan örneğin, kültüründe etkenin üretilmesidir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2005). Ancak son yıllarda, hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması, çeşitli nedenlerle invaziv yöntemlerin uygulanamaması ve kültür sonuçlarının geç çıkmasının tedavi sürecini etkilemesi, serolojik ve moleküler yöntemlerle mantar antijenlerinin saptanması yönünde gelişmelere neden olmuştur (Arda, 2009).

Bu çalışmanın amacı invaziv aspergilloz enfeksiyonu düşünülen hastaların klinik örneklerinde direkt mikroskopik inceleme, kültür ve serolojik belirteçlerin (Galaktomannan) tanıdaki değerini karşılaştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Mikolojinin kurucusu sayılan İtalyan botanist Pietro Antonio Micheli 1729'da Nova Plantarum Genera'da mantarla ilgili araştırmalarını yayınlamış ve ilk defa *Aspergillus* cinsi mantarlardan bahsetmiştir. *Aspergillus* cinsi ilk defa 1926'da 69 tür 11 grupta toplanmıştır. 1945 yılında Thom ve Raper adlı araştırmacılar bu tarihe kadar tanımlanmış olan *Aspergillus* tür ve alt türlerini “*Aspergillus*’ların el kitabı” isimli bir kitapta toplamışlardır (Denning, 1998; Patterson, 2010). Daha önceki sınıflamaların yerini alan 1965 yılında yapılan sınıflamada, Raper ve Fennell *Aspergillus*’ları 18 grup, 132 tür ve 18 varyet olarak tanımlamışlardır. Samson 1979 yılında bu taksonomik cetvele 42 tür ilavesinde bulunmuştur. Gams ve Samson 1985’ te *Aspergillus* türlerini tiplendirerek, *Aspergillus* teleomorfları oluşturmuşlardır. Bugün bu cinsin kabul edilmiş 200’den fazla türü ve 70 teleomorfı bulunmaktadır. Genustaki türlerin çok azı insanda enfeksiyon etkeni iken büyük bölümü doğada, toprakta ve çürümüş bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunan saprofit etkenlerdir (Gams ve Samson,1985).

İnsanda ilk aspergilloz olgusu, 1842 yılında tüberküloz kavitesinde aspergillomu olan bir hastanın balgamında bildirilmiştir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda görülen İA ise ilk defa 1953 yılında tanımlanmıştır. Gairdner 1853’te plevra enfeksiyonu, Virchow 1856’da bronsial ve pulmoner aspergilloz, Henrici 1939 yılında *Aspergillus*’ların ürettikleri toksinler ile apse ve nekroz, Kirschstein ve ark 1945’ de ilk mantar endokarditini, Matthews ve Grcevic 1959’ da *Aspergillus*’lara bağlı deri lezyonu, Katzenstein ve ark.’da 1983 yılında alerjik fungal sinüzit olgularını bildirmişlerdir (Denning, 1998).

2.2. *Aspergillus* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

Gerçek mantarlar, *Eumycota* filumunda yer alırlar. Bu bölümde dört grup (*Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota*) yer alsa da moleküler, morfolojik ve fenotipik veriler, mantarlar aleminin *Chytridiomycota*’dan köken alan monofiletik soyağacına sahip olduğunu göstermiştir. *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota* eşeyli üreme yapılarına göre adlandırılmışlardır. Eşeysiz mantarlar ise *Fungi imperfecti* veya *Deuteromycetes* olarak adlandırılan yapay bir sınıf içinde toplanmıştır (Mitchell, 2005).

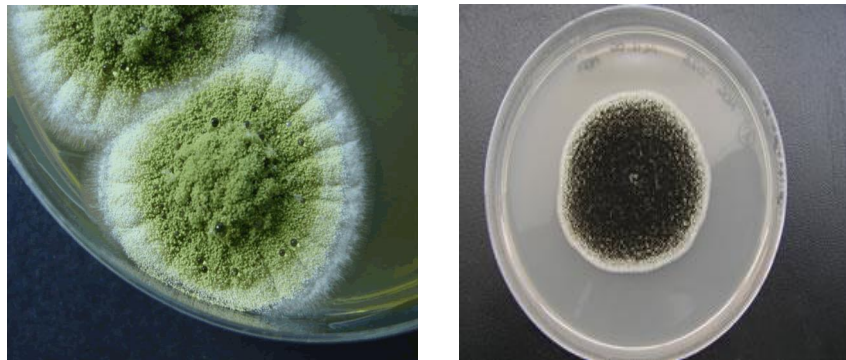
Aspergillus türleri; *Ascomycota* filumunda, *Euascomycetes* sınıfında, *Eurotiales* takımında, *Trichocomaceae* ailesinde *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartoria* gibi teleomorfik (eşeyli üreme) cinsler içinde yer alır. *Aspergillus*'ların çoğu türünün, teleomorfik şekli tanımlanmadığı için, *Fungi imperfecti* veya *Deuteromycetes* sınıfında anamorfik (eşeysiz üreme) formları olarak yer almaktadır (Metin ve Kiraz, 2006).

2.3. Genel Özellikler

Makroskobik Morfoloji

Aspergillus cinsine ait türlerin tanımlanmasında genel olarak makroskobik ve mikroskobik özelliklerinden yararlanılmakta olup, tür tanımlamasında makroskobik özellikler oldukça önemlidir (Denning, 1996; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Aspergillus'lar rutin mikolojik besiyerlerinde kolayca üremektedirler (Patterson, 2010). Besiyerinde oluşturdukları kolonilerin rengi, büyüklüğü ve termotoleransı *Aspergillus* identifikasyonu ve tür tanımlamasında yol göstericidir (Richardson ve Kokki, 2003). Koloniler hızlı gelişirler; renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak yeşil beyaz, sarı, kahverengi, siyaha yakın kahverengi veya kırmızı olabilmektedir. Koloni renkleri daima mikroskobik komponentlerin (vejetatif hif, konidial baş) ve diğer yapılarının rengine bağlı oluşur. Ayrıca koloni renkleri besiyeri yüzeyinde ve tabanında farklı olabilir ve görünümleri pudramsıdır (Raper ve Fennell, 1965; Samson ve ark., 1995). Standart şartlarda belirli sürede oluşan koloni boyutu, türlerin tanımlanmasında önemli bir özelliktir. Koloni kenarları ince ve diffüz, kalın ve keskin sınırlı, yüzeysel veya batık, düz veya düzensiz lobüler olabilir. Bununla birlikte sporlanma genellikle 38-48 saat içinde gerçekleşirken, bazı türlerin sporlanması daha uzun sürede gerçekleşmektedir (Murray ve ark., 2009; Patterson, 2010).



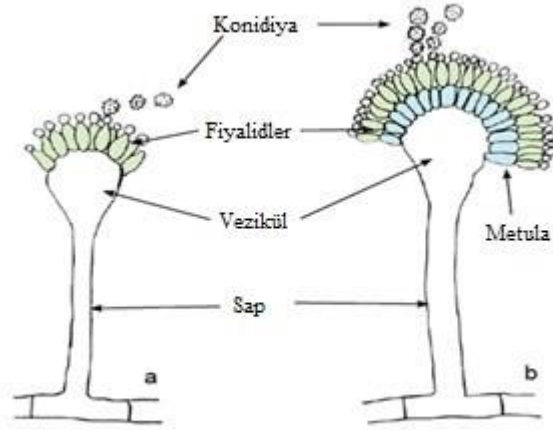
Şekil 1. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* koloni görünümü (URL 1; URL 2)

Mikroskopik Morfoloji

Aspergillus' ların tür düzeyinde tanımlanmasında mikroskopik morfoloji anahtar rol oynamaktadır. Hifler (filamentöz uzantılar) ve sporlar (aseksüel sporlar; konidiya, klamidospore vb; seksüel sporlar; askospor, basidiospor vb) yardımıyla *Aspergillus*' lar aseksüel ve seksüel olarak üreyebilir. Seksüel üreme fazını (teleomorf) laboratuvar ortamında göstermek kolay olmadığından, besiyerlerinde üretildikten sonra aseksüel üreme fazındaki anamorfik yapılarının (hif ve konidiya) özelliklerine göre tanımlama yapılmaktadır (Samson ve ark, 1995).

Aspergillus türlerinde aseksüel tanımlamada (anamorfik yapı) ilk değerlendirme konidiyanın (spor) oluşumuna göre yapılmaktadır. Tek hücreli, bölmesiz, düzgün ya da desenli, şekilli (tüylü, dikensi, pürtüklü vb.), şeffaf veya renkli, üremeyi sağlayan yapıya konidiya denir. Bir konidiyajen hücre sistemi ve onu taşıyan hiften (gövde/sap) oluşan yapıya konidiyofor (fertil hif) denilmektedir. Rengi ve yüzeyinin düz, tırtıklı olması türden türe farklılıklar göstermektedir. Konidiyoforun tepe kısmındaki şişkin kısma vezikül adı verilip *Aspergillus* cinsi için tipik bir yapıdır. Vezikül üzerinde konidiya doğuran yapılara fiyalid denir. Terminolojide fiyalid yerine 'sterigma' adı da kullanılmaktadır. Fiyalidler direk vezikül üzerinde bulunabildikleri gibi (tek sıralı/ uniseriat) metula (fiyalid taşıyan hücre) denen yapılar üzerinde de bulunabilirler (çift sıralı/ biseriata). Mikroskopik özelliklerin tanımlanmasında veziküllerin boyutu ve şekli yanında, fiyalid ve metulaların dizilimi de önem taşımaktadır. Bu yapılar duruş şekillerine göre kolumnar/sütunsu ya da radyal/yarım daire görünüşlü dizilim olarak isimlendirilmiştir (Özyaral, 2006, Kaştımur 2010) (Şekil 2).

Aspergillus' larda bazı değişik oluşumlara da rastlanabilmektedir. Bunlardan bir tanesi *A. nidulans*' da görülen hülle hücreleri olup, kalın ve düzgün kenarlı özelleşmiş bir konidyaya sahiptir. Hülle hücrelerinin dışında siklerotya ve ask keseleri gibi özel yapılara da rastlanmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2006; Richardson ve Kokki, 2003).



Şekil 2. *Aspergillus* konidial görünüm a: tek sıra dizilim b: çift sıra dizilim (Samson ve ark., 1995)

2.3.1. Hücre Yapısı

Hücre Duvarı

Aspergillus türlerinde çevresel etmenlere karşı korunmadan, *in vitro* koşullarda ve konak dokusunda çoğalmasından, konakta enfeksiyon ve alerjik tabloların oluşumundan sorumlu yapı hücre duvarıdır. Hücre duvarı oldukça sert bir katman olup, hücrenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı şekil ve bütünlüğünü korumasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, hücrenin çevresi ile tüm alışverişi sürecinde bir elek ve konak hücreleri ile temas sürecinde rol alan enzimler, antijenler açısından da bir kaynak olarak davranmaktadır (Latge, 1999).

Aspergillus hücresinin yüzeyindeki adezin, lektin ve hidrofobin gibi biyomoleküller çeşitli yüzeylere bağlanmayı sağlamaktadır. Bu enzimlerin bir kısmı, konak hücre ve doku yapılarını parçalayıcı etki göstererek, mantarın invazyonunda rol oynamaktadır (Sentandreu ve ark., 2004).

Mantar hücre duvarı büyük oranda polisakkaritlerden (yaklaşık %80) oluşmaktadır. Daha az oranda bulunan proteinleri, miktar olarak lipidler, pigmentler ve inorganik tuzlar gibi diğer minör bileşenler izlemektedir (Bernard ve Latge, 2001). Başlıca polisakkaritler; α -glukanlar (esas olarak α -(1,3) glukan ve az miktarda α -(1,4) glukan), β -glukanlar (β -(1,3) glukan ve β -(1,6) glukan), kitin ve galaktomannandır. Bazı

mantarlar kendilerini ekstraselüler membran ile donatmışlardır (Fontaine ve ark., 2000; Latge, 2010; Gastebois ve ark., 2009).

Hücre duvarının fibriler özelliğini kitin oluşturur. Bunlar, N-asetilglikozamin ve glikoz polimerlerinin β -(1,4) tarzında birleşmesinden meydana gelmiştir. 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 (Levery ve ark., 2002).

Septum: Septum formasyonu genetik bir karakter olup hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzanarak karşı cidara kadar devam eder. Yapısı, hücre duvarının yapısı ile aynı kimyasal özelliği gösterir. *Oomycetes* ve *Zygomycetes* sınıfı mantarlar hariç olmak üzere, diğer filamentli mantarlarda rastlanmaktadır (Arda, 2000).

Sitoplazma Membranı

Elektron mikroskopla yapılan ince kesitlerin muayenelerinde, hücre duvarının altında 3 tabakadan yapılmış ve ünit membran özelliği gösteren bir sitoplazmik membran bulunur. Hücre ve çevresi arasında iletişimi sağlayan, aynı zamanda biyosentezde de rol oynayan komponenttir. İntrensik membran proteinleri olan proteaz, fosfolipaz C, protein G veya fosfoinositol sinyal iletimi reseptörleridir. Membran yapısında fosfolipidler, proteinler ve steroller (ergosterol) bulunmaktadır (Çerikçioğlu, 2006).

Sitoplazma

Ökaryotik hücrelere benzer sitoplazma kompozisyonuna sahiptir. Bakterilerden farklı olarak mantar hücrelerinin sitoplazmasında endoplazmikretikulum bulunur. Etrafı, çift kat unitmembranla çevrilidir ve üzerinde ribozomlar bulunur. Yapıları daha çok lipoprotein karakterde olup, protein sentezi ve madde taşınmasında görevlidirler. Sitoplazmada nücleus ve nücleolus bulunmaktadır. Nücleus 2-3 μ m boyutlarında olup, etrafı çift katlı ve delikli bir membran ile çevrilidir. Çekirdek içinde bulunan kromozom DNA yapısında olup, türe göre G+C oranı % 35-65 farklılık gösterebilir. Çekirdekçik içerisinde %80 RNA ve protein bulunmaktadır (Arda, 2000).

3.3.2. Antijenik Özellikler

Aspergillus türlerinde galaktomannan ve beta glukan olmak üzere iki önemli antijen bulunmaktadır.

Galaktomannan Antijeni

Aspergillus türlerinin de içinde bulunduğu *Hyalohyphomycetes* grubu küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan spesifik bir polisakkarittir. Galaktomannan antijeni bir eksoantijendir; *in vitro* ve *in vivo* gelişme sırasında ortama salınmaktadır (Klont ve ark., 2004). Bir çekirdek (manan polimerleri) ve yan zincirden (galaktofuran polimerleri) oluşmuştur. Yan zincir yapısında β -(1,5) galaktofuranoz ve β -(1,4) galaktopiranozdan oluşan bir düz yapı ile β -(1,5) ve β -(1,6) galaktofuranozdan oluşan bir dallanmış yapı ünitesi bulunmaktadır (Latge, 1994). GM antijeni arama testlerinde β -(1,5) galaktofuranoz epitopuna bağlanan monoklonal antikorlar kullanılmaktadır (Stynen ve ark., 1995).

GM antijeni daha çok serumda saptanabilirken, BAL sıvısı, beyin omurilik sıvısı (BOS), periton sıvısı, idrar ve perikard sıvısı gibi vücut sıvılarında da saptanabilmektedir (Klont ve ark., 2004).

β - (1-3)- D-Glukan (BDG)

(1,3)- β -D-glukan *Cryptococcus neoformans* ve *Zygomycetes* sınıfı mantarlar hariç birçok maya ve küf mantarının hücre duvar yapısında bulunan bir komponenttir. BDG antijeni, Kuzey Amerika Atlantik sahilindeki bir artropod olan 'horseshoecrab'dan pürifiye edilen faktör G ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon verir. BDG antijenini saptamaya yönelik testler bu temele dayanmakta olup İA ve sistemik fungal enfeksiyon sırasında bu polisakkaridin varlığını göstermek için kullanılabilir (Zeichner-Ostrosky ve ark., 2005)

3.3.3. Virulans Faktörler

Aspergillus' lar konak dokusuna girebilmek için insanın solunum yolları epitellerine yapışabilmeli ve penetre olabilmeli; etrafındaki hücreleri özellikle konak savunmasında rol alan fagositoz yapıcı hücreleri etkisiz hale getirmeli ve konak dokusundaki koşullara uyum sağlayıp gelişebilmelidir. Bunlar için birçok virulans faktörlerine ihtiyaç vardır (Alp, 2006).

Virulans faktörleri şunlardır:

Sıcaklık Toleransı (Termotolerans)

Patojen bir tür olan *A. fumigatus* 37°C' de hızlı üremekte ve 50°C' ye kadar olan sıcaklığı tölere edebilmektedir. Bu özellik patojen olan ile olmayanı ayırt etmede önemli bir faktördür (Brookman ve Denning, 2000).

Gelişme Hızı

Aspergillus' un gelişme hızı hastalık oluşturma ve patojenite ile ilişkili görülmektedir. En hızlı gelişen tür *A. fumigatus*' tur. Çimlenme hızı besiyerine bağlı olarak 37°C' de 5 ila 12 saattir. Hücre duvarının majör bileşenlerinden biri olan N-asetilglukozamin'in polimerizasyonunu katalizleyen kitin sentetaz enzimi ile ilgili bir gen olan kitin sentaz G (CHSG)'den yoksun olan bir mutantın radyal gelişme hızının ve virulansının azaldığı gösterilmiştir (Denning, 1998).

Konidyum Boyutu

A. fumigatus' un diğer türlere oranla daha patojen olmasının nedenlerinden birisi de konidyum boyutunun, akciğerdeki alveollere ulaşabilecek kadar küçük olmasıdır (2-3.5 µm çapında). *A. flavus*' un konidyumları 3-6 µm, *A. niger*' in konidyumları ise 4-5 µm çapındadır (Alp, 2006).

Adeziner

Aspergillus'un konak hücrede epitel yüzeylere yapışması kolonizasyonun başlangıcında ilk ve önemli bir adımdır (Bromley ve Donaldson, 1996). Konidiyumlar; özellikle fibrinojen, laminin, komplement proteinleri, fibronektin, albumin, immunglobulinler, kollojen ve surfaktan proteinler gibi kanda dolaşan veya konak membranı ile ilgili olan konak proteinlerine bağlanırlar (Latge, 1999).

A. fumigatus 'un yapışmasını sağlayan ilk protein konidial hidrofobin RodA'dır (Aimanianda, 2009). Bu protein yüzeyi hidrofobik hale getirmek ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından BDG'in tanınmasını önlemek için, konidyanın yüzeyi üzerinde düzenli bir rodlet dizisi içinde toplanır. RodA'yı kodlayan gen çıkarılarak oluşturulan mutantların hidrofilik olduğu, albumin ve kollajene daha az oranda bağlandığı, bununla birlikte laminin ve fibrinojene bağlanma yeteneğinde azalma olmadığı saptanmıştır (Beauvais ve ark., 2007).

A. fumigatus adezinlerinin *in vitro* aderens çalışmalarında, mantarın konidyumlarının akciğer hücrelerine özgül olarak bağlandığı gösterilmiştir (Latge, 1999).

Pigmentler

Melaninler, hidrofobik yapıda makromoleküller olup, bugüne kadar birçok farklı melanin tipi tanımlanmıştır. En önemlileri dihidroksinaftalin (DHN)-melanin ve DOPA-melanindir. *A. fumigatus* konidyası DHN-melanin yolağını kullanarak mavimsi-yeşil renkte pigment oluşturmaktadır. Çeşitli çalışmalarda pigmentsiz konidya oluşturan mutant suşlarda virulansın azaldığı görülmüştür (Tsai ve ark., 1999).

Toksik Moleküller

Aspergillus türleri hifal üremeleri sırasında değişik toksik moleküller oluştururlar. Epipolytiodioksopiperazin (ETP) sınıfı toksini olan gliotoksin üzerinde en çok çalışılan metabolittir (Sutton ve ark., 1994). Gliotoksinin insanlarda bağışıklığı baskılayıcı özelliğinden dolayı kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda tedavi amaçlı kullanılabilir (Brookman ve Denning, 2000). Ayrıca gliotoksin *in vitro* koşullarda makrofaj fagositozunu, sitotoksik T lenfosit aktivasyonunu inhibe ettiği için, *Aspergillus*' un immün sistemden kaçışına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Bennett ve Klich, 2003)

A. fumigatus 'un toksik sekonder metaboliti Asp f1 veya restriktoksin olarak bilinen 18-kDa'luk RNase'dir. Konidyumların hücre duvarında bulunduğu ve İA' lu hastaların idrarında ve dokularında salgılanmakta olduğu, ayrıca dokuda fungusun etrafını çevreleyen nekrozlu bölgelerde de bulunduğu belirlenmiş ve son derecede güçlü toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Hogan, 1996).

Enzimler

Aspergillus türlerinde, hücre membran yapısındaki fosfolipid ve proteinlerin yıkımında rol alan ve hücre işleyişini bozan 'ekstraselüler enzimler' bulunmaktadır. Küfler konak hücrenin bariyerlerini aşabilmek için bu enzimleri kullanmaktadırlar.

Yapılan çalışmalarda daha çok *A. fumigatus* üzerine yoğunlaşmış ve bu türe ait elastinolitik alkalin proteazlar, aspartik (asit) proteazlar ve metallo proteazlar gibi ekstraselüler proteazlar çalışmalarda öne çıkmıştır. Birinci ve ark. (2014)' ları 30 *A. fumigatus*, 9 *A. flavus* ve 4 *A. niger* izolatında asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitelerinin araştırmışlar ve *A. fumigatus* izolatlarının %76.7'sinde asit proteinaz; %93.3'ünde ise fosfolipaz aktivitesi ve *A. niger* izolatlarının da %25' inde fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Alkalin proteazlar hayvan modeli deneylerinde araştırılmış ve İA'da

önemleri gösterilememiştir fakat akciğer dokusuna invazyonunda önem taşıdığı kabul edilmiştir (Chris ve ark., 1997, Alp, 2006, Çerikçioğlu 2012).

2.4. Patogenez

Aspergillus türleri doğada, özellikle toprakta ve çürümekte olan organik artıklarda yaşayabilen saprofit mantarlardır. *Aspergillus* türlerinin enfeksiyöz partikülü, konidyumdur. Havada yayılan konidyalar, herhangi bir özel mekanizma olmaksızın atmosferde kolayca dağılır ve havada asılı kalır. Bunun sebebi konidyumların küçük (2-3 µm) olmasıdır (Yıldırım, 1999). Fungal organizmalarda olumsuz çevresel koşullarda fungal genomun korunması ve çevreye dağılması konidyumlar aracılığı ile olmaktadır (Osheroev ve May, 2001).

İnhalasyon sonucu alınan konidyumlar, bağışıklık sistemi sağlam kişilerde mukosilyer temizleme ve fagositik savunma mekanizmalarıyla elemine edilir (Brokhage, 2005). Alveolar makrofajlar ve nötrofiller *A. fumigatus*' un fagositozunda rol alan hücre gruplarıdır. Makrofajlar, reaktif oksijen radikalleri (ROR) oluşturarak konidyaları öldürürlerken, makrofajlardan kaçabilen konidyalar ise hif yapısı oluşturmaya başlayıp, nötrofiller tarafından yakalanırlar. Nötrofiller kendisinden büyük olan hifal yapıların yüzeylerine yapışır ve ortama ROR salınarak vakuolde granülasyonu tetiklenmiş olur.

Bağışıklığı baskılanmış olan hastalarda ise bu mekanizmalar etkili olarak çalışmayacağından, *Aspergillus* konidyaları germinasyona uğrayarak septalı hifler oluşturmakta, kan damarlarını invaze ederek enfarkt, tromboz ve nekroza neden olmaktadır (Allam ve ark., 2002).

2.5. Klinik Özellikler

Aspergillus türleri çok çeşitli klinik tablolara sebep olabilen fırsatçı mantarlardır. Olguların %90'ından sorumlu olan ve en sık izole edilen türleri, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. terreus* türleridir (Toscano ve Jarvis, 1999; Hope ve ark., 2005).

Genel olarak allerjik hastalıklar, oportunistik kolonizasyon ve yüzeysel enfeksiyonlar ile invaziv enfeksiyonlar olmak üzere üç farklı klinik durumun oluşmasında rol oynamaktadırlar (Al-Alawi ve ark., 2005). *Aspergillus* türlerinin neden oldukları hastalıklar Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1 *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar (Richardson ve Kokki, 2003)

<p>1) Sağlıklı konakta hastalık</p> <p>a. Toksikoz veya mikotoksikozlar</p> <p>b. Alerjik tablolar (alerjik astım, rinit, sinüzit; ekstresek alerjik alveolit; aşırı duyarlılık pnömoniti; ABPA)</p> <p>c. Yüzeysel enfeksiyonlar (deri enfeksiyonu, otomikoz, sinüzit, saprofitik bronkopulmoner aspergilloz, trakeobronşit)</p> <p>d. İnvaziv enfeksiyon (tek organ, çoklu organ/yayılım gösteren)</p> <p>2) Doku hasarı veya yabancı cisim ile ilişkili enfeksiyon</p> <p>a. Keratit ve endoftalmit</p> <p>b. Yanık yarası enfeksiyonu</p> <p>c. Osteomyelit</p> <p>d. Protetik kapak endokarditi</p> <p>e. Damar greft enfeksiyonu</p> <p>f. Aspergilloma (mantar topu)</p> <p>g. Ampiyem veya plevra aspergillozu</p> <p>h. Peritonit</p> <p>3) Bağışıklık sistemi bozulmuş konakta enfeksiyon</p> <p>a. Primer deri aspergillozu</p> <p>b. Sino-orbital enfeksiyon</p> <p>c. Akciğer aspergillozu</p> <p> i. İnvaziv trakeobronşit</p> <p> ii. Kronik nekrotizan akciğer aspergillozu</p> <p> iii. Akut invaziv akciğer aspergillozu</p> <p>d. Santral sinir sistemi aspergillozu</p> <p>e. İnvaziv (yayılım gösteren) aspergilloz</p> <p>f. Gastrointestinal infarkt (nadir)</p>

Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)

Aspergillus türleri, özellikle de *A. fumigatus*, doku invazyonu olmaksızın solunum yollarını kolonize ederek akut veya kronik akciğer hastalıklarına yol açabilirler. ABPA solunum yolları mukozasına yerleşen spora karşı oluşan hipersensitivite reaksiyonudur. Sporların inhale edilmesi tek başına hastalık oluşturmamakla beraber, konakçının immün sistemi ve predispoze faktörler ABPA oluşumunda risk faktörleridir (Zander, 2005; Tillie-Leblond ve Tonnel, 2005).

Aspergilloma (Mantar Topu)

Aspergilloma ya da mantar topu nadiren *Candida* ve *Mucor* tipi mantarlar ile oluşabilse de en sık etkeni *Aspergillus* türleridir (Chatzimichalis ve ark., 1998). Önceden var olan akciğer lezyonlarının sekonder olarak enfekte olması sonucu oluşmaktadır. Lezyonlarda, *Aspergillus* konidya ve hifleri yanında, fibrin ve mukustan oluşan miçel topu görülmektedir (Patterson, 2005).

İnvaziv Aspergilloz (İA)

İmmün sistemi baskılanmış ya da bozuk kişilerde ortaya çıkan fırsatçı bir enfeksiyondur. En sık tutulum akciğer olmakla beraber, hematogen yayım ile kalp, beyin ve böbreklerde tutulum olabilir. İA tanı konulup tedaviye başlanılsa bile sıklıkla ölümcül olarak seyretmektedir (Richardson ve ark., 2003). İnvaziv aspergilloz riski altındaki hastalar Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo.2. İnvaziv aspergilloz riski altındaki hastalar (Mutlu, 1999)

Risk derecesi	Risk yaratan Primer Hastalıklar
Yüksek	Allojenik kemik iliği transplantı
	Allojenik periferik kan kök hücre transplantı
	Akut lösemi
	Konik granülatöz hastalıklar
	Karaciğer transplantı
	Akciğer transplantı
	Singenik kemik iliği transplantı
	Otolog kemik iliği transplantı
Orta	Uzun süreli nötropeni
	Akciğer transplantı
	Singenik kemik iliği veya Periferik kan kök hücre transplantı (PKKH)
	Otolog kemik iliği transplantı
Düşük	Uzun süreli nötropeni
	AIDS, Renal transplant
	Otolog periferik kan kök hücre nakli
	Solid tümör veya miyeloma
	Otoimmün hastalıklar, İntravenöz ilaç bağımlılığı
	Yanıklar, Kortikosteroid kullanımı
Diyabet, Prematürite	

İnvaziv Pulmoner Aspergilloz (İPA)

İnvaziv aspergillozun en sık görülen tipidir (Patterson, 2005). Genellikle İPA *Aspergillus* konidyalarının inhalasyon sonucu alınmasıyla gelişirse de bazen gastrointestinal veya cilt kökenli *Aspergillus*' ların hematogen yayılımı ile de gelişebilir. Özellikle akut lenfoid ve myeloid lösemilerde tedavi sonrası uzamış nötropenik dönemde gelişmektedir. Yüksek doz kortikosteroid kullanımı ve uzamış nötropeni en önemli risk faktörleridir (Doffman ve ark., 2005). Semptomları nonspesifik olmakla beraber progresif kuru öksürük, balgam, dispne, plöritik göğüs ağrısı, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına rağmen devam eden ateştir. Hemoptizi, plevral efüzyon ve pnömotoraks diğer klinik bulgulardır (Soubani ve Chandrasekar, 2002).

Son yıllarda İA 'anjioinvaziv' ve 'hava yolu invaziv aspergillozu' olmak üzere ikiye ayrılmakta, ancak bu iki formu anatomik yakınlıklarından dolayı birbirinden ayırmak pek mümkün olmamaktadır (Buckingham ve Hansell, 2003).

Aspergillus hifleri pulmoner damarları tutar, tromboz oluşur, pulmoner kanama ve infarkt gelişir. Bu gelişmeye anjioinvaziv aspergillozis denir ve invaziv aspergillozisin % 80'ni oluşturur. Hava yollarındaki *Aspergillus* hava yolu lümenini ve bronşiolerin bazal membranı invaze eder. Bu duruma havayolu invaziv aspergillozisi veya *Aspergillus* bronkopnömoni denir. Bazen *Aspergillus* trakeaya invazyon yapabilmekte ve psödomembranöz nekrotizan trakeobronşial aspergilloza neden olabilmektedir (Franquet ve ark., 2001).

Santral Sinir Sistemi Aspergillozu

Santral sinir sisteminin (SSS) *Aspergillus* enfeksiyonları, hematogen, orbital ve paranazal sinüslerden yakın komşuluk yolu ile sekonder olarak gerçekleşir. Etken çoğunlukla akciğerden hematogen olarak yayılabilmekte veya sinüslerden direkt olarak subaraknoid alana geçebilmektedir. Klinik semptomlar spesifik olmadığı için çoğunlukla hemoraji veya serebralinfarkt düşünülmektedir. Ateş, bulantı, kusma, baş ağrısı, mental değişiklikler gibi bulgular görülebilmektedir (Sundaram ve ark., 2006).

Rinosinüzit (Paranasal sinüs aspergillozu)

Aspergillus'ların mantar sinüzitlerinin en sık karşılaşılan etkeni olduğu bildirilmektedir. Alerjiye bağlı olmaksızın *Aspergillus*'ların kanserlilerde, kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastalarda, edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS)

olan kişilerde ve diğer vücut direnci düşük kişilerde invaziv mantar sinüzitlerine yol açtığı olgular bulunmaktadır. En sık izole edilen türü *Aspergillus flavus*' tur (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2006).

Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz (KNPA)

Hastalığın oluşmasına altta yatan bir akciğer hastalığı ve eşlik eden immünsuprese durum neden olabilmektedir. Geçirilmiş bir akciğer tüberkülozu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer rezeksiyonu veya bronşektazi gibi strüktüel bir akciğer bozukluğu vardır. Klinikte kronik öksürük, ateş, balgam gibi pulmoner semptomlar görülebilir Aspergillomaya benzeyen bir enfeksiyondur Aspergilloma'dan ayrılan özelliği akciğer dokusuna lokal invazyon yapması ve önceden akciğer dokusunda gelişmiş bir kaviteye gereksinim göstermemesi iken, invaziv aspergillozisten farkı aylar ve yıllar içerisinde gelişerek, vasküler yapılara invazyon göstermeyip, diğer organlara da ilerlememesidir. Hastalığın tanısı akciğer dokusunda hiflerin gösterilmesi ve balgam ve/veya BAL kültüründe *Aspergillus* üremesidir (Usta ve ark., 2001; Lakadamyalı ve ark., 2007).

2.6. Tanı Yöntemleri

İmmünsistemi baskılanmış hastalarda invaziv fungal enfeksiyonlar, özellikle de İA' lar önemli bir mortalite nedenidir. Hematolojik maligniteli hastalar başta olmak üzere tüm kanser hastaları, kemik iliği ve organ nakli olan hastalar, kistik fibröz, otoimmün ve kronik granülomatöz hastalığı olanlar İA açısından risk altında olan hastalardır (Patterson, 2010). İA'un erken ve doğru tanısı hastaların yaşamlarını etkileyecek önemli bir faktördür ve tanı genellikle klinik bulgularla, radyolojik ve laboratuvar verilerinin birleştirilmesine dayanmaktadır. Ancak klinik belirtiler çoğunlukla spesifik değildir ve başka hastalıklarla karışabilmektedir. (Chamilos ve Kontoyiannis, 2006).

İA etkeninin kesin laboratuvar tanısı klinik örnekte direkt mikroskopi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde tanımlanması ile konulmaktadır. Ancak mikrobiyolojik örnekler, invaziv işlemlerle temin edilebileceğinden çoğu zaman hastaların kritik durumlarından dolayı yapılamamaktadır. Bu nedenle erken tanı nadiren konulabilmektedir (Chandrasekar, 2009).

İnvaziv fungal enfeksiyonlarla ilgili çok sayıda çalışma ve yayın olmasına karşın, bunların karşılaştırılması farklı tanımlar, farklı hasta seçim kriterleri ve farklı

değerlendirme yaklaşımları nedeni ile güç olmaktadır. Bu sıkıntıyı gidermek amacı ile 2002 yılında dünyanın çeşitli bölgelerinden gelen araştırmacıların kurduğu iki organizasyon; Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC) ve Mikoz Çalışma Grubu (MSG) bir araya gelerek ortak bir dil kullanılmasını sağlayacak EORTC/MSG fungal enfeksiyon tanım kriterlerini ortaya koymuştur. Buna göre invaziv fungal enfeksiyonlar;

- şüpheli (possible), olası (probable) ve kanıtlanmış (proven) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (Tablo 3).

Bu tanımların gerçekleştirilmesi için üç grup faktör kullanılmaktadır (Tablo 4).

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

Kılavuz 2008 yılında, belirlenmiş olan üç grup değişimsiz güncellenmiştir. Bu tanımlar sadece klinik ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmakta ve günlük tıp pratiğinde kullanılmamaktadır (Akan, 2009).

Tablo 3. Kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı hasta gruplarının sınıflaması (Pauw ve ark 2008)

Kesin (kanıtlanmış/proven)	Dokuda histopatolojik, sitolojik ya da direkt mikroskopik olarak hiflerin gösterilmesi veya dokuda veya normalde steril olan bir alandan (idrar ve sinüs aspirasyonu, BAL hariç) üremenin olması
Yüksek olasılık (Olası/ probable)	En az bir adet konak faktörün yanında bir adet mikrobiyoloji ve bir adet klinik kriter
Düşük olasılık (Şüpheli/possible)	Bir konak ve bir klinik kriter ya da mikrobiyolojik kriter

Tablo 4. EORTC-MSG invaziv fungal enfeksiyon kriterleri (Pauw ve ark., 2008)

<p>1) Konak faktörleri</p> <p>Nötropeni: 10 günden uzun süreyle ($0,5 \times 10^9$ nötrofil/L)</p> <p>Allojenik kök hücre alıcısı olma</p> <p>Kalıtımsal ağır immün yetmezlik sendromları (Kronik granülatoz hastalık veya ağır kombine immün yetmezlik)</p> <p>Son 90 gün içinde T hücre immünsüpresör tedavi almış olmak (Siklosporin, TNF alfa blokörü, spesifik monoklonal antikorlar, nükleozid analogları)</p> <p>Uzun süreli (>3 hafta 0,3mg/kg/gün prednizolon eşdeğeri kortikosteroid kullanma, ABPA hastaları hariç)</p> <p>2) Klinik kriterler</p> <p>A) Alt hava yolları fungal hastalıkları</p> <p>Aşağıdaki BT bulgularından en az birinin olması</p> <p>Nodül ve/veya halo belirtisi</p> <p>Hava hilal belirtisi (air crescent), kavite</p> <p>B) Trakeobronşit</p> <p>Bronkoskopik analiz sırasında izlenen ülser, nodül, psödomembran, plak/kрут</p> <p>C) Sinozal enfeksiyon</p> <p>Görüntüleme sinüzit izlenmesi, aşağıdaki bulgulardan en az birinin varlığı</p> <p>Akut lokalize ağrı (göze doğru yayılan)</p> <p>Üzeri siyah krutlu nazal ülser</p> <p>Paranasal sinüslerden orbitayı da içine alan, kemiksi bariyerleri aşan orbitaya genişleme</p> <p>D) Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu</p> <p>Görüntüleme fokal lezyon ve/veya MR/BT’de meningeal kalınlaşma</p> <p>E) Dissemine kandidiyazis</p> <p>2 hafta içinde kandidemi epizodu ve ardından en azından 2 bulgudan biri</p> <p>Oftalmolojik değerlendirmede progresif retinal eksuda</p> <p>Karaciğer veya dalakta küçük hedef benzeri apseler (boğa gözü lezyonu)</p> <p>3) Mikolojik kriterler</p> <p>1)Direkt testler (sitoloji, direk mikroskopi, kültür)</p> <p>Balgam, BAL, bronş fırça ve sinüs aspirat örneklerinde mantar görülmesi</p> <p>Küf mantarını destekleyecek fungal elemanların bulunması</p> <p>Kültürde pozitiflik (<i>Aspergillus</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Zygomycetes</i> veya <i>Scedosporium</i> türleri)</p> <p>2)İndirekt testler</p> <p>Aspergillozis (Plazma, serum, BAL veya BOS’da galaktomannan antijeni saptanması)</p> <p>Kriptokokkoz / Zygomikoz hariç serumda β glukun saptanması</p>

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Aspergillozun tanısında klinik örneklerin enfeksiyon odağına bağlı olarak değişik bölgelerden alınması gerekir. Solunum sistemi ile ilgili balgam, BAL, trakeal aspirat, akciğer biyopsisi, bunların dışında farklı enfeksiyonlar için BOS, plevra, periton, sinüs ponksiyon aspiratı, idrar ve nadiren kan gibi klinik örnekler kullanılmaktadır (Murray ve ark., 2009).

İnvaziv aspergilloz tanısında en anlamlı örnek akciğer doku biyopsisidir. Fakat örnek alınmasının zorluğu, hastanın kritik durumu nedeniyle ender olarak yapılabilmektedir. Tanıda daha çok kullanılan, örneğin alınması daha kolay olduğu için sinüs biyopsisidir. Örnek almak için en uygun zaman antifungal tedavi öncesidir. Balgam örneği mümkünse sabah aç karnına alınmalı ve şüpheli her durumda kültür için üç gün arka arkaya alınmış üç balgam örneği gönderilmesi sağlanmalıdır. Kan kültürleri mümkünse hastanın ateşlenmeye başladığı erken bir dönemde ve eğer antifungal alıyorsa ilk dozu vermeden önce istenmelidir (Murray ve ark., 2009). Klinik örnekler alındıktan sonra en uygun ve en hızlı şekilde laboratuara ulaştırılmalıdır. İdeal olanı örneklerin iki saat içerisinde gönderilmesidir. SSS örnekleri hemen kültür yapılmayacaksa oda sıcaklığında, diğer örnekler +4°C' de kısa bir süre saklanabilir. Serolojik ve moleküler yöntemler için kullanılacak örnekler 72 saat içinde çalışılacaksa + 4°C' de, uzun süre saklanacaksa -20° C' de saklanmalıdır (İnal, 2006).

Aspergillus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında direkt tanı yöntemleri (mikroskopik inceleme, kültür, moleküler yöntemler, histopatolojik inceleme) ve indirekt tanı yöntemleri (GM, BDG antijen aranması gibi) uygulanmaktadır.

2.6.1. Direkt Tanı Yöntemleri

Mikroskopik İnceleme

Aspergillozların tanısında etkenin doğada yaygın olarak bulunması nedeniyle kolonizasyon-enfeksiyon ayırımının iyi yapılması gereklidir. Direkt mikroskopik inceleme ile örnekte *Aspergillus* elemanlarının görülmesi ile hızlı ön tanı şansı elde edilir. Kültür sonucunun değerlendirilmesine yardımcı olup, tanıyı desteklemektedir. İA tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olmasa da, hızlı ve ucuz olması en büyük avantajıdır. Ayrıca örneğin yetersiz olduğu durumlarda da direkt mikroskopik

incelemenin duyarlılığı düşüktür ve kültüre öncelik verilmelidir. Kültür, kesin tanı için hala altın standarttır (Hope ve ark., 2005).

Direkt mikroskopik inceleme ile tür ismini kesin olarak belirlemek mümkün değildir. Maya yalancı hiflerini küf hiflerinden ayırmak, *Aspergillus* türleri ve benzer diğer septalı hiyalen küflerin hiflerini *Zygomycetes* sınıfında bulunan septasız küf hiflerinden ayırmak ve esmer mantarlara ait hifleri belirlemek direkt mikroskopik incelemenin en önemli yararlarıdır (Verweij ve ark., 2007).

Nativ Preparat Hazırlanması

Aspergilloz şüpheli örneklerin mikroskopik inceleme öncesi bir dizi işlemden geçirilmesi gerekebilmektedir. En sık kullanılan yöntem, lam lamel arasında %10-25 potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinde klarifikasyondur. Bu yöntemle her türlü klinik örnekteki doku ve hücresel artıkların saydamlaştırılarak mantar elemanlarının daha net görülmesi sağlanmaktadır. Hazırlanan preparatta dikotomik (45° açılı), hiyalen görünümlü, septalı hiflerin varlığı *Aspergillus*'lar için tipiktir (Yıldıran, 1997; Murray ve ark., 2009).

Laktofenol Pamuk Mavisi ile Boyama

Özellikle küf tarzında üreyen mantarlardaki hif ve sporlarını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. İçeriğinde belirli miktarlarda laktik asit, fenol (kristal), gliserin, saf su, pamuk mavisi (anilin mavisi) bulunmaktadır. Laktik asit küf yapılarını koruyarak tespit eder. Fenol öldürücü etki gösterir. Gliserol kurumayı önlerken, pamuk mavisi küf yapılarını boyayarak daha iyi görünmesini sağlar. Örnekler lam lamel arasında doğrudan incelenebileceği gibi selofan bant yöntemi ile de incelenebilmektedir. *Aspergillus* yapıları ışık mikroskopunda mavinin farklı tonlarında görülmektedir (Yıldıran, 1997; Murray ve ark., 2009).

Kalkoflor Beyazı ile Boyama

Kalkoflor ve Blankoflor gibi floresan boyalar, mantar hücre duvarını boyayarak görünmelerini sağlayan maddelerdir. %10-20 KOH ile yapılan klarifikasyon işlemi kalkoflor beyazı veya blankoflor ile karıştırılarak birlikte hazırlandığında, hifal yapılar floresan mikroskopunda daha net görülmektedir. Ancak floresan mikroskobu gerektirmektedir. Örnek içerisinde 45° açılma yapan hiyalen görünümlü, septalı

hiflerin görülmesi *Aspergillus*'lar için tipik özelliklerdir (Tümbay, 1983; Hope ve ark., 2005).

Kültür

Aspergillus türlerinin doğada yaygın bulunması kültür işlemleri sırasında laboratuvar bulaşlarına neden olduğundan ve bu küfler insan solunum yolları florasında da yer alabildiğinden, tek başına kültürde *Aspergillus spp.* üremesinin anlamlı olmadığı konusunda konsensus sağlanmıştır. Ancak steril şartlarda alınan doku veya ince iğne aspirasyon örneklerindeki üreme veya histopatolojik olarak mantar elemanlarına rastlanması kesin invaziv fungal enfeksiyon tanısı koydurmaktadır (Ascioglu ve ark., 2002)

Kültür için balgam, BAL, akciğer doku biyopsisi, sinüs ponksiyon aspiratı gibi solunum yolu örnekleri yanında, kan, BOS, yara, idrar örnekleri de kullanılabilir. Kan, BOS ve kemik iliği örneklerinden yapılan kültürlerde *Aspergillus* nadiren ürer. Ancak *Aspergillus*'ların neden olduğu endokarditlerde, etkenin kan kültüründe üreme olasılığı yüksektir ve tanıda önemlidir (Karacan ve ark., 2003).

Uygun şartlarda laboratuvara gönderilen klinik örnekler izolasyon kültürleri yapılmaktadır. İzolasyon kültürlerinde *Aspergillus*'ların eşeysiz yapılarını görmek mümkün olabilmektedir. Genel olarak kültürde kullanılan izolasyon besiyerleri; gentamisin veya kloramfenikol ilaveli sabouraud kanlı agar, sabouraud-dekstroz agar (SDA), patates dekstroz agar (PDA), beyin kalp infüzyon agar (BHI), inhibitör mould agar, mikosel ve mikobiyotik agar kullanılmaktadır (İnal, 2006).

Klinik örneklerin uygun besiyerlerine ekimleri yapıldıktan sonra, kültür plakları aerobik olarak, 25-30°C' de nemli ortamda, üç ila dört hafta inkübasyona bırakılmaktadır. Üreme kontrolü ilk hafta her gün, sonraki haftalarda haftada iki kez yapılmalıdır. Bu süre içerisinde üreme gözlenmezse kültür negatif olarak sonuç verilmelidir. Besiyerlerin seçiciliğini arttırmak için besiyerlerine ilave edilen sikloheksimid *Aspergillus* türlerinin üremesini inhibe edebileceğinden, şüpheli örnekler sikloheksimidsiz besiyerlerine ekilmelidir (Stevens ve ark., 2000).

Aspergillus'lar kültürde üredikten sonra besiyeri plağında, 36-90 saat içerisinde kadifemsi veya pamuğumsu özellikte, beyaz, sarı, sarı-yeşil ve kahverengi, siyah renkte koloniler oluştururlar. Genellikle sporulasyon fazları PDA' da, 30-37° C' de, 36-48 saatlik inkübasyonda gerçekleşmektedir (Bouza ve Guinea, 2005; Hope ve ark., 2005).

Aspergillus türleri termotoleran olup, oluşturdukları koloninin rengi, büyüklüğü identifikasyonda yol gösterici olmaktadır. Besiyerinde üreyen koloniden hazırlanan laktofenol pamuk mavisi ile boyanan preparatta, *Aspergillus*'lara özgü septalı hif, konidiyoforun ucunda vezikül yapısı ve vezikülün üzerini kaplayan fiyalidler ve bunların ucundan çıkan konidiyaların görülmesi tanı açısından önemlidir (McClenny, 2005).

İzole edilen *Aspergillus*'un etken kabul edilebilmesi için (Mutlu, 2003)

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

Moleküler Yöntemler

İnvaziv mantar enfeksiyonları arasında invaziv küf enfeksiyonları ve özellikle de İA giderek daha sıklıkla izlenmektedir (Richardson ve Kokki, 1999; Loeffler, 2002). Yüksek mortalite oranları ve kötü prognoz, aspergilloz tanısında başvurulabilecek bütün yöntemlerin uygulanmasını erken tanı açısından zorunlu kılmaktadır (White ve ark., 2006).

Moleküler testlerin avantajı, birden fazla etkenin neden olduğu enfeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanıma yetenekleridir. Ayrıca, kan ve idrar gibi invaziv olmayan yöntemlerle alınan örneklerde nükleik asidi belirleyerek biyopsi ve BAL gibi invaziv yöntemlere olan ihtiyacı azaltmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, nükleik asitlerin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Ancak klinik örneklerde mantar DNA ve RNA'sını ekstrakte edici standart prosedürlerin olmaması testin duyarlılığını azaltmaktadır (Patterson, 2010).

Moleküler tanıda genellikle mitokondriyal ve ribozomal DNA genleri gibi genler tercih edilmektedir. Ancak mitokondriyal genler DNA genlerine göre daha çok değişkenlik gösterebildiği için tür ve cins düzeyindeki tanımlamalar için uygun görülmemektedir (Kanbe ve ark., 2002).

Aspergillozun moleküler tanısıyla ilgili literatürde, klasik PCR, nested PCR, real-time PCR, PCR-EIA, insitu hibridizasyon gibi birçok yöntem başvurulmuştur (Yamakami ve ark., 1996; Sanguinetti ve ark., 2003; Scotter ve Chambers, 2005; Bolehovska ve ark., 2006). Standart bir PCR yöntemi henüz mevcut olmaması nedeniyle,

EORTC-MSG'nun tanımladığı klasik invaziv mantar enfeksiyon tanı kriterleri arasına alınmamıştır (Donnelly, 2006).

Moleküler yöntemlerde yalancı pozitif ve negatifliklere rastlanılmaktadır. Hava ortamında konidyumların yoğun olarak bulunmasından dolayı yanlış pozitiflikler ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı kişilerden alınan BAL örneklerinin %25 kadarı PCR yöntemiyle pozitif çıkabilmektedir (Latge, 1999; Zeichner, 2012). Bu nedenle DNA izolasyonunda negatif kontrol eklenmesi, otomatik ekstraksiyon yöntemleri kullanılması ve amplifikasyonda gerçek zamanlı PCR yöntemi tercih edilmesi önerilmektedir (White ve ark., 2006)

Moleküler testlerin bir tek örnek yerine birbirini izleyen birden fazla örnekte yapılması önerilmekte ve haftada iki kez çalışılması gerektiği ifade edilmektedir (Saraçlı, 2006).

Bu yöntemlerle İA' un 6-8 saat içinde tanısı sağlanabilmektedir. Ancak çalışmalarda sınırlı sayılardaki hastalardan alınan örnekler değerlendirilebilmiştir. Bu nedenle PCR' nunun tanısal değerini saptamak için prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Richardson, 2003).

Histopatolojik İnceleme

İnvaziv aspergillozun düşünüldüğü durumlarda mantar boyaları uygulanmaktadır. Hifler hematoxilen-eozin ile iyi boyanmamaktadırlar. Bu amaçla kullanılan özel boyalar, histolojik kesitler ve yaymalarda kullanılan Gomori'nin methanamin gümüş boyası (GMS), Periodicacid-Schiff (PAS) ya da PAS ile kombine boyalardır (Mcclenny, 2005). PAS kombinasyonlu boyalar, örneğin 'lightgreen' PAS, doku yanıtını ve histolojik detayı daha iyi seçmeye yararırken, GMS ile zemin detayları kaybolmasına karşın mantarın daha ince detayları görülebildiğinden, bu iki boya birbirinin yerine değil birlikte kullanılması uygun olan boyalar olduğu düşünülmektedir (Chandler, 1997).

2.6.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Aspergillus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında direkt mikroskopi ve kültür gibi konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra mantar antijenlerinin tesbitine yönelik serolojik testler (galaktomannan antijen testi, beta glukan testi) kullanılmaktadır. Direkt tanı yöntemleri için örnekler invaziv işlemlerle temin edilirken, antijen tarama testleri invaziv

olmayan tanı yöntemleridir (Silveira ve Paterson, 2005). Sistemik *Aspergillus* enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek serolojik testler immündefüzyon, enzymlenmiş immunosorbent assay (ELISA), radio immünassay (RIA), immün floresan antikor testi (IFAT)' dir (Walsh ve Chanock, 1998).

Galaktomannan Antijen Testi

Galaktomannan *Aspergillus* türlerinde hücre duvarında bulunan ve ayrıca ekzoantijen olarak da salınabilen bir polisakkarittir. Galaktomannan β -(1,5)-D galaktofuran zincirlerine karşı oluşturulan monoklonal antikorlar aracılığıyla ELISA yöntemiyle tespit edilmesi İA tanısında kullanılmaktadır (Verweij ve ark., 1998)

Galaktomannan antijeni İA tanısında başta serum olmak üzere BAL, BOS ve idrar gibi farklı örneklerde aranmaya başlanmıştır; 1999 yılında Avrupa'da EIA kiti (Platelia *Aspergillus*; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) haline getirilmiş ve 2003 yılında ise Food and Drug Administration (FDA) tarafında İA tanısında serumda kullanılmak üzere onay almıştır (Maertens ve ark., 1999;Wheat, 2003). Sandwich ELISA prensibiyle çalışan bu kit, en düşük 0.5ng/ml GM tespit edebilmektedir. İA açısından testin haftada iki kez yapılması ve ardışık örneklerde pozitiflik bulunması anlamlı kabul edilmektedir (Steynen ve ark., 1992).

Serumda GM saptanması için ELISA testi standardize edilmiş olmakla birlikte BOS, idrar ve BAL gibi diğer vücut sıvılarında da antijen saptanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. BAL örnekleri ile yapılan araştırmalarda yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmektedir. Ancak bu örnekler için belirlenmiş standardize optik dansite indeksi bulunmamaktadır. Solunum yollarının *Aspergillus* spp ile kolonizasyonunun potansiyel yanlış pozitifliğe yol açabileceği ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır (Viscoli ve ark., 2002).

Galaktomannan antijen testi için 300 μ L serum gerekmektedir ve yaklaşık 4 saat içinde sonuç elde edilmektedir. Test sonucu GM indeksi olarak ifade edilir. Pozitif sonuç için eşik (cut-off) değer olarak 1,5, 1, 0,7 ve 0,5 değerleri kullanılmakta; FDA tarafından tek serum örneğinde GM indeksi 0,5 pozitif değer olarak kabul edilmektedir (Yıldırım, 1999; Stynen, 1995; Maertens, 2005).Yine FDA verilerine göre, EORTC-MSG kriterleri dikkate alındığında kitin özgüllük ve duyarlılığı sırasıyla %80,7 ve %89,2 ifade edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda özgüllük ve duyarlılıklar %23-100 gibi çok farklı

aralıklarda bulunmaktadır (Verweij ve ark., 1995; Swanink ve ark., 1997; Maertens ve ark., 1999; 2002; Kawazu ve ark., 2004).

Çalışmalarda ortaya çıkan duyarlılık ve özgüllük değerlerinin farklılığı, alınan örneğin sayısı ve tipine (tek veya seri örnek alımı, kan, BAL), enfeksiyonun hangi zamanda alındığına, profilaktik ya da ampirik antifungal tedavi alıp almadığına ve kabul edilen cut-off değerlerinin farklı olmasına bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Marr ve ark., 2004)

Yalancı pozitifliğin en önemli nedenlerinden biri, özellikle gastrointestinal sistem mukozasında hasar olan hastalarda diyetle alınan galaktomannanın translokasyonudur (Wheat, 2003). İA açısından riskli yoğun kemoterapi alan hastalarda bu hasar sık karşılaşılan bir durum olmaktadır. Bunun dışında siklofosamid, piperasilin-tazobaktam gibi ilaç kullananlarda yalancı pozitiflikler ortaya çıkmaktadır (Sulahian ve ark., 2003) Ayrıca pediatrik hastalarda ve yeni doğanlarda yüksek oranda yalancı pozitiflikler elde edilmiş ve bu nedenle kit FDA tarafından çocuk yaş grubu için onay almamıştır (Sulahian ve ark., 2001)

Beta Glukan Antijen Testi

(1-3)- β -D-glukan *Zygomycetes* ve *Cryptococcustürleri* dışında bir çok saprofitik ve patojen mantar ve *Aspergillus* 'un da dış hücre duvarında bulunan, immünojen olmayan bir moleküldür (Odabasi ve ark., 2004). İmmünojen olmamasına rağmen tanıda kullanılmaktadır. Denizde yaşayan ve horseshoecrab olarak bilinen bir canlıdan izole edilen faktör G ile beta glukanın kimyasal etkileşimini temel alarak geliştirilmiş bir testtir (Marty ve Koo, 2009).

Beta glukan testi 2004 yılında invaziv mantar enfeksiyonu teşhisi için FDA tarafından onaylanmış ve İA tanısı için EORTC-MSG tarafından önerilen mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında bulunmaktadır (Pauw ve ark., 2008)

İlk geliştirilen test Japonya orjinli Fungitec-G beta glukan testidir (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan). 1995' te yapılan bir çalışma ile testin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla, %90 ve %100 olarak bulunmuştur (Obayashi ve ark., 1995).

Avrupada BDG saptanması için yaygın olarak kullanılan test Fungitell (Associates of Cape Cod Inc. East Falmount, MA)' dir. Testin klinik değerlendirmelerde özgüllük ve duyarlılık değerleri çok iyi bulunmuştur (özgüllük %87-94, duyarlılık %77-

89). Ardışık örneklerde testin özgüllüğünün arttığı görülmüştür (Odabasi ve ark., 2004; Marty ve Koo, 2009; Zeichner 2012)

Testin en önemli dezavantajı belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır. İA tanısında özgüllüğü kısıtlıdır. Ayrıca selüloz membran ile hemodiyaliz yapılanlarda, siroz hastalarında, albümin ya da immünglobülin ürünleri alanlarda ve abdominal cerrahi sonrası yanlış pozitiflikler bildirilmiştir (Marty ve Koo, 2009).

2.7. Radyolojik Tanı

İA olgularının tanısı ve yönetilmesinde radyolojik bulgular kullanılmaktadır. Fakat hem klinik semptomlar hem de radyolojik bulgular erken dönemde nonspesifik olabilmektedir. Bu yüzden direkt akciğer grafilerin özgül olmayan bulgular ve düşük duyarlılığı nedeniyle tanıdaki değeri sınırlıdır (Thomas ve Patterson, 2005). Enfeksiyon alanının radyolojik olarak görüntülenmesinde yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT) düz grafiye kıyasla daha duyarlı bir yöntemdir (Georgiadou ve ark., 2011).

Aspergillus' ların akciğer parankimindeki küçük ve orta çaplı damarları invaze ederek, iskemik nekroz alanlarına neden olmaktadır. Nekroz alanının santrali nodül, çevresindeki hemoraji alanları buzlu cam alanları (halo bulgusu) olarak değerlendirilmektedir. Halo bulgusu nötropeni sürecindeki hastalarda İA' yı gösteren önemli bir bulgudur. Nötropenik hastalarda İA'nın diğer bir radyolojik bulgusu hava-hilal belirtisidir. Hava-hilal belirtisi nodülde nekroz ve nekrotik akciğer dokusunun komşu akciğer parankiminden ayrılmasıyla nodül içinde hilal şeklinde saydam alan oluşumuyla karakterizedir. Genellikle geç dönem bulgusudur. Hava-hilal bulgusu da İA için spesifik bir bulgu değildir (Caillot ve ark., 2001).

Bu radyolojik özellikler riskli hasta grubunda invaziv aspergillozu öncelikle düşündürmekle birlikte invaziv akciğer aspergillozu teşhis edici nitelikte olmamaktadır (Greene ve ark., 2007).

2.8. Epidemiyoloji

Aspergillus spp hemen her yerde özellikle toprak, su ve çürümekte olan organik materyalde bulunabilen filamentöz mantarlardır. Bununla birlikte bu mantarlar; tahıl, un, fındık, fıstık, pamuk, pirinç, deri ve tekstil ürünleri, iç ve dış ortam havası, hastanelerde filtre edilmemiş hava, havalandırma sistemleri, gibi çok sayıda kaynaktan bulunmaktadır (Laudon ve ark., 1996; Richardson, 1998; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Aspergillus türlerinin kolaylıkla solunum yolu ile alınabilen, hidrofobik konidyaları bulunmaktadır. Bazen bu konidyular, mukokütanöz yüzeylerin doku bütünlüklerinin bozulması ile dokuyu enfekte edebilmekte ve kontaminan aletlerle de vücuda girebilmektedir (Mutlu, 2003). Hastalık etkeni olarak en sık izole edilen türler *A. fumigatus* ve *A. flavus* iken *A. niger* ve *A. terreus* daha seyrek izole edilmesine karşın kemik iliği alıcılarında daha sık etken olarak görülmektedirler (Walter ve Bowden, 1995).

Aspergillus' lar hastane ortamında da bulunabilmektedir. Hastane içi ve çevresindeki yıkım, onarım, bakım gibi inşaat işlerinin varlığı, yüzeylerde biriken kontamine tozların etrafa yayılmasını kolaylaştırmakta ve ortam havasındaki konidiya yoğunluğunu arttırmaktadır. Bu durumun, yüksek riskli hastalarda gelişen hastane kaynaklı İA ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca hastalık gelişmesi için gerekli inokulum miktarı bilinmemekle birlikte immün yetmezliği olan hastalarda çok azı yeterli olabilmektedir (Overberger ve ark., 1996; Vonberg ve Gastmeier, 2006). National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS)'in 1980-1990 yılları arasındaki verilerine göre, hastane kökenli *Aspergillus* enfeksiyonları %1.3 oranında iken, kemik iliği transplantasyonu yapılan ünitelerde bu oranının %36 olduğu bildirilmektedir (Bilezikçi ve ark., 2002).

2.9. Tedavi

İnvaziv aspergilloz olgularında tedavinin başarısı erken tanı, erken agresif sistemik antifungal tedavi ve bağışık yetmezliğin düzeltilmesine bağlıdır. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar ve izlenen in-vitro direnç ya da klinik direnç büyük önem taşımaktadır (Eliopoulos ve ark., 2002).

Tedavi yaklaşımları ise;

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

Genel olarak direk terapi, diğer tedaviler başladıktan sonra gündeme gelmektedir. Profilaksi özellikle uzamış nötropenisi olan veya Hematopoitik kök hücre transplantasyonu (HKHT) yapılan hastalarda uygulanmaktadır. Ampirik tedavide ise,

gerçekte enfeksiyonu olmayan hastaların antifungal tedavi alma riski mevcuttur. Fakat klinisyen genellikle bu tedaviyi tercih etmektedir. Preemptif tedavi gereksiz antifungal kullanımını azaltırken aynı zamanda daha az maliyet, yan etki ve toksisiteyi hedefler. Ateş olmadığında da erken tedavi olanağı sağlar.

Etki spektrumu *Aspergillus* türlerini kapsayan antifungaller:

1.Polienler

2.Azoller

3.Alilamin

4.Ekinokandin grubudur (Arıkan ve Rex, 2003)

Tablo 5’de antifungallerin etki mekanizmaları gösterilmektedir (Dismukes, 2000; Somer, 2007) İmmün düşkün bireylerde *Aspergillus*’ lara bağlı gelişen İA’ un un prognozunun kötü seyretmesi ve %85 varan oranlarda mortalite ile sonuçlanması antifungal ilaçların önemini arttırmıştır (Somer, 2007) .

Tablo 5. Antifungallerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması (Dismukes, 2000; Somer, 2007)

Etki	İlaç
Nükleik asit sentezini inhibe edenler	5-florositozin
Sterol halkasına bağlanarak hücre membranını etkileyenler	Polienler
14 α dimetilaz bağımlı sitokrom P-450’ yiinhibe edenler	Azoller
Squalenepoksidaz inhibitörü (Ergosterol sentezi inhibitörü)	Allilaminler
β -(1-3) D-glukansentaz inhibitörü	Ekinokandinler

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmamız “Aspergilloz tanısında kullanılan konvansiyonel ve serolojik yöntemlerin karşılaştırılması” başlığı ile Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 04.05.2015 tarihinde, 211 sayılı karar ile onaylandı ve Temmuz 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Hastalar ve Örnekler

İnvaziv aspergilloz açısından risk taşıyan immün yetmezlikli, hematolojik malignitesi olan, nötropenik, immünsüpresif ilaç kullanımı olan hastalar çalışmaya dahil edildi. İA’ u düşündüren klinik bulgusu olmayan hastalar ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

Konvansiyonel yöntemler için hastalardan klinik örnek olarak balgam, BAL ve trakeal aspirat alındı. GA testi için serum örnekleri tam kandan ayrıştırılarak -20 °C ‘ de mikrosantrifüj tüplerinde saklandı.

Çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler, İA için risk faktörü olan altta yatan hastalıkları, uygulanan kemoterapi rejimi, antifungaller, kök hücre nakli varlığı gibi veriler sorgulandı.

Klinik olarak hastaların sınıflandırılmasında EORTC-MSG (Pauw ve ark., 2008)’ nin belirlediği kriterler kullanıldı. Bu kriterlere göre hastalar kesin (proven), yüksek olasılıklı (probable) ve düşük olasılıklı (possible) olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

3.2. MATERYAL

3.2.1. Besiyeri ve Boya Hazırlanması

Patates Dekstroz Agar (PDA) Hazırlanması

PDA Toz Bileşimi: Patates infüzyonu 4,0 g/L; D(+) Glikoz 20,0 g/L; Agar-agar 15,0 g/L.

PDA besiyerini hazırlamak için 39 g 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 15 dakika beklenerek sterilize edildi. Daha sonra sterilize edilen PDA çözeltisi yaklaşık 50 °C’ ye kadar soğuduktan sonra 2cc

Gentamisin 40 mg ve 0,8cc Penicilin G 40 mg ilave edildi. Daha sonra steril tüplere yatık şekilde döküldü ve besiyerinin katılaşması beklendi. Katılaşan besiyerleri +4 °C' de muhafaza edildi.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Hazırlanması

SDA Toz Bileşim: Peptone 10,0 g/L; D(+) Glikoz 40,0 g/L; Agar-agar 15,0 g/L

SDA besiyerini hazırlamak için 47 gram toz SDA 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 15 dakika beklenecek şekilde sterilize edildi. Daha sonra sterilize edilen SDA çözeltisi yaklaşık 50 °C' ye kadar soğuduktan sonra 2cc Gentamisin 40 mg ve 0,8 cc Penicilin G 40 mg ilave edildi. Daha sonra steril tüplere yatık şekilde döküldü ve besiyerinin katılaşması beklendi. Katılaşan besiyerleri +4°C' de muhafaza edildi.

Mikobiyotik Agar (MB) Hazırlanması

MB Toz Bileşim: Pancreatic Digest of Soybean Meal 10,0 g/L; Dekstroz 10,0 g/L; Sikloheksimid 0,4 g/L; Kloramfenikol 0,05 g/L; Agar-agar 15,0 g/L

MB besiyerini hazırlamak için 35,5 gram toz MB 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 15 dakika beklenecek şekilde sterilize edildi. Daha sonra steril tüplere yatık şekilde döküldü ve besiyerinin katılaşması beklendi. Katılaşan besiyerleri + 4°C' de muhafaza edildi.

Potasyum Hidroksit (KOH)

Potasyum hidroksit (%20'lik)

Laktofenol Pamuk Mavisi (Aman's Solüsyonu)

Bileşim: Fenol (kristal) 20.0 g, Laktik asit 20.0 g, Gliserin 40.0 g, Pamuk mavisi (anilin mavisi) 0.05 g, Distile su 20.0 ml.

Fenol distile suya katıldı ve eritildi. Sonra diğer maddeler ilave edilerek iyice karıştırıldı. Uzun süre saklanabilmektedir.

3.3. METOT

3.3.1. Örneklerin Mikolojik İncelemesi

Mikroskopik İnceleme

Hastalardan alınan balgam, BAL ve trakeal aspirat örneklerinin direkt mikroskopik incelemeleri yapıldı. Örnekler lam üzerine yerleştirilip, üzerine bir damla %20' lik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi damlatılıp lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar 20-30 dakika oda ısısında bekletilip, ışık mikroskopunda 10x, 20x ve 40x' lık büyütmede mantar elemanları olup olmadığı araştırıldı.

Kültür

İlgili hastalardan alınan balgam, BAL ve trakeal aspirat örnekleri klas II biyogüvenlik kabininde SDA, PDA ve MB tüplerine yuvarlak uçlu öze ile ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan SDA tüpleri 37 °C' lik, PDA ve MB tüpleri 26°C' lik etüvlerde nemli ortamda, 3 hafta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üreme kontrolü ilk hafta her gün, sonraki haftalarda haftada iki kez yapıldı.

Mantarın Tür Düzeyinde Tanımlanması

Kültürde üreyen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfoloji olarak tanımlanması yapıldı.

Aspergillus olduğu düşünülen kolonilerin makroskopik olarak değerlendirilmesi ve tür düzeyinde tanımlanması için besiyerlerinde üreyen kolonilerin şu özelliklerine bakıldı: konidyal renk, koloni çapı, miçel renk, pigmentasyon, koloni arkası rengi ve sklerotia.

Koloniler mikroskopik değerlendirmesi ve tür düzeyinde tanımlanması için laktofenol pamuk mavisi ile şu şekilde muamele edildi:

Temiz ve kuru bir lâmin ortasına bir veya iki damla laktofenol pamuk mavisi solüsyonu damlatıldı. Steril iğne ile koloninin bir kaç yerinden materyal alarak, bu solüsyon üzerine konuldu. Üzeri temiz bir lâmelle kapatılıp, hazırlanan preparat önce, 10x ve sonra da 40x' lık büyütme ile mikroskop altında incelendi. Alınan kolonilerin tüpün kenarlarından ve genç kolonilerden olmasına dikkat edildi.

3.3.2. Serolojik Test

Galaktomannan Antijen Arama

Platelia *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa) serumda galaktomannanı saptayabilen immüno enzimatik sandviç mikrokaplama yöntemidir.

Testte tavşan monoklonal antikoları EBA-2 ELISA çukurlarında kaplanmış olarak ve peroksidazla işaretlenmiş olarak bulunur. Test 0,5-1 ng/ml galaktomannanı saptayabilecek hassaslıktadır.

1. Testin Basamakları

- Serum içindeki immün kompleksleri ayırmak için %4 EDTA ile birlikte serumlar ısıtılır.
- Monoklonal antikolarla kaplı çukurlara serum ve konjugat eşzamanlı olarak konulur. Eğer serumda *Aspergillus* antijeni varsa galaktomannan-monoklonal antikor/peroksidaz kompleksi oluşturur.
- Substrat eklenince yıkamadan sonra mAb-Ag-mAb kompleksi oluşur.
- 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra sülfirik asitle reaksiyon durdurulur ve 450/620 nm dalga boyunda sonuçlar değerlendirilir.

2. Testi Uygulamadan Önce Yapılan İşlemler ve İçerik

- ELISA çukurcukları alüminyum folyo kaplı paketinden çıkarıldı ve oda ısısında 15-20 dakika bekletildi.
- Yıkama solüsyonu (TrisNaC pH 7,4 buffer, %1 Tween 20 ve %0.01 sodyum metiolat) distile su ile 10 kat sulandırıldı.
- Pozitif, negatif ve eşik serumu kullanılmaya hazır.
- Konjugat (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikoları) %0.01 meiolat içerir ve kullanılmaya hazır.
- Serum işleme solüsyonu (EDTA asid solüsyonu) kullanılmaya hazır.
- Substrat buffer (sitrik asit, sodyum asetat, pH5.2 % 0.009 hidrojen peroksit ve %4 dimetilsülfoksit) kullanılmaya hazır.
- Kromojen solüsyonu tetrametil benzidin içerir ve kullanılmaya hazır.
- Reaksiyonu durdurma solüsyonu 1,5 N sülfirik asit içerir ve kullanılmaya hazır.

3. Testin Uygulanışı

- Steril mikrosantrifüj tüpüne 300µl serum ve 100µl serum işleme solüsyonu (%4 EDTA) konuldu.
- İyice karıştırılıp benmari usuli 120°C’de 6 dakika bekletildi.
- 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi ve üstteki sıvı bölüm çalışıldı.
- Aynı işlemler kontrol serumları için de yapıldı.
- ELISA çukurlarında birinci çukur pozitif, ikinci çukur negatif, üç ve dördüncü çukur eşik değer kontrol çukuru olarak kullanıldı.
- Serumların üstteki sıvı bölümünden 50µl ve konjugattan 50µl çukurlara konuldu.
- Aynı şekilde kontrol çukurlarına da 50µl kontrol serumları ve konjugat konuldu.
- ELISA plağının üzeri yapışkan film ile kaplandı.
- 37°C’ lik etüvde 90 dakika bekletildi.
- ELISA plağından yapıştırıcı film çıkarılıp yıkama solüsyonu ve otomatik yıkama ile beş kez yıkandı.
- ELISA plağında yıkama solüsyonun kalmamasına dikkat edildi.
- Hızlı bir şekilde ve direkt ışıktan korunarak substrat kromojen (tetramethylbenzidin) solüsyonundan 200 µl eklendi.
- Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletildi.
- Her çukura eşit zamanlı olarak 100 µl reaksiyon durdurma solüsyonundan (1.5 N sülfürik asit) eklendi.
- Son olarak da 450 nm (referans aralığı 620nm) dalga boyunda optik okuyucuda sonuçlar okundu.

4. Sonuçların Hesaplanması ve Yorumlanması

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

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

İndeks: <0,5: negatif, >0,5: pozitif indeks olarak değerlendirildi.

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

Cut-off kontrol (OD): Her kontrol serumun cutoff değeri

OD kontrol eşik serum 0,3 -0,8 arasında

$$\text{Pozitif indeks} = \frac{\text{OD pozitif kontrol}}{\text{OD eşik kontrol serumu}} > 1,5$$

$$\text{Negatif indeks} = \frac{\text{OD negatif kontrol}}{\text{OD esik kontrol serumu}} < 0,50$$

3.3.3. İstatiksel Analiz

Nitel veriler %100 olarak tanımlandı. Tanı kriteri olarak duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplandı. Testler arasındaki istatiksel farklılığa McNemar testi kullanılarak bakıldı. Yöntemler arasındaki tanı koyma süresi açısından farklılığa Wilcoxon Signed Ranks Testi ile bakıldı. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Temmuz 2016 - Mayıs 2017 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi kliniklerinde yatmakta olan 27 hasta EORTC-MSG sınıflandırmasına göre invaziv aspergilloz açısından risk taşıyan hastalardı. Bu sınıflamanın dışında kalan *Aspergillus* enfeksiyonu düşünülmeyen 23 hasta ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

Kontrol Gruplarının Sonuçları

Kontrol grubu hastalarından alınan balgam örneklerinin direkt mikroskopik incelemeleri ve kültürlerinde mantar elemanlarına rastlanmamıştır. Tek serum örneklerinde galaktomannan antijen düzeyleri cut-off: <0,5 olduğu için negatif olarak tespit edilmiştir.

4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen İA şüpheli hasta grubunun yaş ortalamaları 67,8 (\pm 11,1) ve cinsiyetlerine göre dağılımları 20 (%74)' si erkek ve 7 (%26)' si kadın hastalardı. Kontrol grubunun yaş ortalaması 46,3 (\pm 12,7), erkek ve kadın oranları ise sırasıyla 19 erkek (%83) ve 4 (%17) kadın hastalar idi.

İA şüpheli hasta grubunun 16' sı hematoloji servisinde (HS), 6' sı göğüs hastalıkları servisinde (GHS), 3' ü enfeksiyon servisinde (ENF) ve 2' si de yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatmakta olan hastalardan, kontrol grubunun ise tamamı hematoloji servisinde yatmakta olan hastalardan oluşmaktadır.

İA şüpheli hasta grubunun altta yatan hastalıkları 8' inde Akut Miyeloid Lösemi (AML), 4'ünde Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), 3'ünde Non Hodgkin Lenfoma (NHL) , 1' inde Aplastik Anemi (AA)' dir. İmmünesüpresif hastalarda ise 7 hastada Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA), 2 hastada Renal Transplantasyon (RT), 1 hastada Hepatoselüler Karsinoma (HC), 1 hasta da Meme Kanseri (MCA) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise altta yatan hastalık olarak 9 hastada AML, 6 hastada NHL, 5 hastada multipl myelom (MM) ve 3 hastada ALL görüldü (Tablo 6).

Konak risk faktörleri değerlendirildiğinde; 10 hastada nötropeni, 11 hastada kemoterapi (KT) kullanımı, 6 hastada steroid kullanımı olduğu görüldü. Aynı zamanda 3 hasta kök hücre nakli yapılmış kemik iliği transplantasyon (KİT) hastası idi.

Tablo 6. Hasta grubuna ait demografik özellikler ve altta yatan hastalıkları

Hasta Bilgileri	İA Şüpheli Hasta Grubu (n=27)	
Cinsiyet	Kadın	7 (%26)
	Erkek	20 (%74)
	Yaş (ortalaması) 67,8 ±11,1	
Servis	HS	16 (%59,2)
	GHS	6 (%22,2)
	ENF	3 (%11,1)
	YBÜ	2 (7,4)
	Altta Yatan Hastalık	
Hematolojik Maligniteli	AML	8 (%29,6)
	ALL	4 (%14,8)
	AA	1 (%3,7)
	NHL	3 (%11,1)
Non-hematolojik-İmmünsüpresif Hasta Grubu		
KOAH	7 (%26,0)	
Renal Transplant	2 (7,4)	
Meme CA	1(%3,7)	
Hepatoselüler CA	1(%3,7)	
Nötropeni	10 (%37,1)	
Kemoterapi	11 (%40,7)	
Steroid Tedavisi Alanlar	6 (%22,2)	

Tüm bu veriler ışığında EORTC-MSG (Pauw ve ark., 2008) kriterlerine göre sınıflandırma yapıldığında şüpheli İA' lu 27 hastanın 21(%77.8)' i yüksek olasılıklı, 6 (%22.2)' sı düşük olasılıklı olarak değerlendirilmiştir. (Tablo 7).

Tablo 7. Hasta grubunun genel özellikleri

Hasta	Altta Yatan Hastalık	Konak Risk Faktörü	Radyolojik Bulgular	Antifungal Tedavi	DMİ	Kültür	GM	EORTC -MSG
1	NHL	Nötropenik	+	Vorikonazol	+	<i>A. flavus</i>	+	YO
2	RT	Nötropenik	+	Amp B	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
3	KOAH	Nötropenik	+	Vorikonazol	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
4	KOAH	Steroid	-	Yok	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
5	AML	KT	+	Vorikonazol	+	<i>A. flavus</i>	+	YO
6	AA	Nötropenik	+	Vorikonazol	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
7	AML	KT	+	Vorikonazol	+	<i>A. flavus</i>	+	YO
8	RT	Nötropenik	-	Amp B	-	<i>A. fumigatus</i>	+	DO
9	AML	Nötropenik	+	Amp B	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
10	AML	Nötropenik	+	Vorikonazol	+	<i>A. niger</i>	+	YO
11	ALL	Nötropenik	+	Kaspofungin	-	<i>Candida spp.</i>	+	YO
12	KOAH	Steroid	Yok	Yok	+	<i>A. fumigatus</i>	-	DO
13	AML	Nötropenik	+	Amp B	+	<i>A. fumigatus</i>	+	YO
14	AML	KİT	+	Amp B	-	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
15	NHL	Nötropenik	+	Amp B	+	<i>A. flavus</i>	-	YO
16	NHL	KT	+	Amp B	-	-	+	DO
17	ALL	KT	+	Amp B	-	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
18	KOAH	Steroid	+	Vorikonazol	+	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
19	KOAH	Steroid	+	Vorikonazol	+	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
20	KOAH	Steroid	+	Vorikonazol	+	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
21	AML	KT	-	Flukonazol	-	<i>Candida spp.</i>	+	DO
22	ALL	KT	+	Kaspofungin	-	-	+	YO
23	AML	KT	Yok	Amp B	+	<i>A. fumigatus</i>	-	DO
24	KOAH	Steroid	+	Yok	+	<i>A. fumigatus</i>	-	YO
25	MCA	KT	Yok	Yok	-	<i>A. flavus</i>	-	DO
26	HK	KT	+	Kaspofungin	-	-	+	YO
27	ALL	KT	+	Amp B	-	<i>Candida spp.</i>	+	YO

YO: Yüksek olasılıklı DO: Düşük olasılıklı

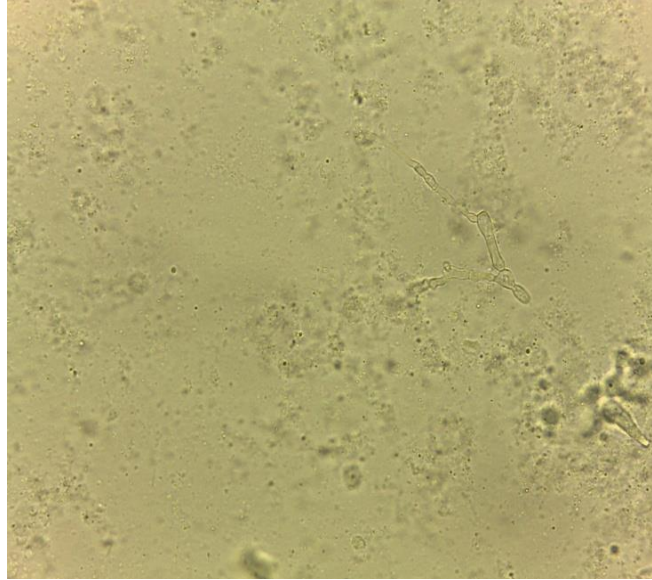
4.2. Hasta Grubunun Direkt Mikroskopik İnceleme (DMİ) ve Kültür Sonuçları

DMİ Sonuçları

İA şüpheli olan hasta grubundan (n=27) 18 balgam, 6 BAL, ve 3 trakeal aspirat (TAK) örneği işleme alındı. Hastaların 17 (%63)' sinin klinik örneklerinin direkt mikroskopik incelemelerinde *Aspergillus* ile uyumlu hif yapısı (45° C' lik açılı yapmış septalı hifler) görülürken, 10 (%37) örnekte görülmemiştir (Şekil 3). Klinik örneklerdeki DMİ sonuçları Tablo 8' de gösterilmektedir.

Tablo 8..Klinik örneklerde direkt mikroskopik inceleme (DMİ) sonuçları

Örnek Türü (n=27)	DMİ (+)	DMİ (-)	Toplam
Balgam	10 (%37,1)	8 (%29.6)	18 (%66,7)
BAL	4 (%14,8)	2 (%7.4)	6 (%22,2)
TAK	3 (%11,1)	-	3 (%11,1)



Şekil 3. %20' lik KOH ile *Aspergillus*' un direkt mikroskopik incelemede hifal görüntüsü

Kültür Sonuçları

İA şüpheli hasta grubunun kültür incelemelerinde, örneklerin 21 (%77,8)' inde *Aspergillus* türleri, 3 (%11,1)' ünde *Candida* türleri üremiştir. Diğer 3 (%11,1)' ünün kültüründe üreme olmamıştır.

İzole edilen *Aspergillus* türleri örneklerin %71,4' ünde *A. fumigatus*, %23,8' inde *A. flavus* ve %4,8' inde de *A. niger* olarak saptanmıştır. Hasta grubunun klinik örneklerinde üreyen *Aspergillus* türleri Tablo 9' da gösterilmektedir.

Tablo 9. Hasta grubunun klinik örneklerinin kültür incelemeleri

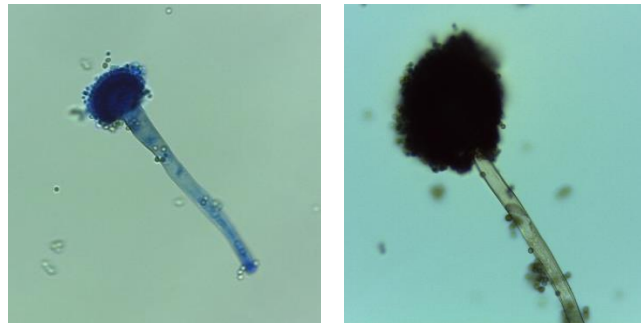
Tür	Balgam	BAL	TAK	Toplam
<i>A. fumigatus</i>	8 (%38,1)	4 (%19,0)	3 (%14,3)	15 (%71,4)
<i>A. flavus</i>	4 (%19,0)	1 (%4,8)		5 (%23,8)
<i>A. niger</i>	1 (%4,8)			1 (%4,8)

Kültürde üreyen *Aspergillus* türlerinin makroskobik görüntüleri ve mikroskobik morfolojileri şöyledi:

A. fumigatus' un makroskobik olarak besiyerindeki rengi donuk gri-yeşil tonlarda, kadifemsi yapıda görülmüştür. Mikroskobik incelemede konidyal baş tek sıralı, kolumnar ve konidiaları yeşil renkli, pürüzlü olarak görülmektedir (Şekil 4).

A. flavus besiyerinde sarı-kahverengi tonlarında, mikroskobik incelemede konidiaları genellikle çift sıralı ya da tek sıralı, radyal, renksiz ve pürüzlü olarak görülmüştür.

A. niger ise makroskobik olarak siyah tonlarda, konidyal baş çift sıralı küre şeklinde, konidiaları siyah ve düzgün şekilde görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. *A. fumigatus* ve *A. niger*' in laktofenol pamuk mavisi preperasyon görünümü

4.3. Antifungal Kullanımı

Hasta grubunun 23 (%85,2)' ünde antifungal kullanımı olup, 4 (%14,8) hasta antifungal tedavi almamıştır. Antifungal olarak hastaların 10 (%43,5)' unda amfoterisin B, 9 (%39,1)' unda vorikonazol, 3 (%13,1)' ünde kaspofungin ve 1 (%4,3)' inde flukanazol kullanıldığı görülmüştür.

4.4. Radyolojik Bulgular

Hasta grubunun akciğer grafileri ve/veya yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT) görüntüleri incelendiğinde; 27 hastanın 21 (%77,8)' inde nodül, kavitasyon ve buzlu cam gibi görüntüler olduğu belirlendi. Diğer 3 hastada radyolojik bulgulara rastlanmazken, 3 hastanın da görüntüleme bilgilerine ulaşılamamıştır.

4.5. Galaktomannan Antijeni Test Sonuçları

İA şüpheli 27 hastada galaktomannan antijeni arandı. Serum örnekleri haftada iki kez olmak üzere, ardışık olarak çalışıldı.

Örneklerin 17 (%63)'sinde GM (cut- off >0,5 ng/ml) pozitifliği saptandı. Bunlardan 2'si BAL örneği idi. Diğer 10 (%37) örnek ise (cut- off <0,5 ng/ml) negatif olarak saptandı. Negatif saptanan örneklerden bir tanesi BAL örneği idi.

GM testini farklı cut- off değerlerine göre incelediğimizde, cut- off 1ng/ml iken pozitifliği 12; ardışık iki serum örneğinde cut- off 0,5 ng/ml iken pozitifliği 15; tek örnekte cut- off 0,5 ng/ml iken pozitifliği 17 olarak belirlendi. GM testinin farklı cut-off değerlerindeki duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanmış ve Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10. GM cut-off değerlerine göre duyarlılık , özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri

GM /Cut-off	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
≥0,5 ng/ml	52	79	64.7	69.6
≥0,5 ng/ml *	52	82	66.6	71.8
≥1 ng/ml	38	86	66.6	65.7

*GM çift örnekte cut-off=0,5 ng/ml

4.6. Direkt Mikroskopik İnceleme ve Kültür Sonuçlarının Değerlendirmesi

İA şüpheli hasta grubunda 17 (%63) örnekte hem DMİ hem de kültür sonuçları pozitif olarak bulundu. DMİ negatif olup kültüründe *Aspergillus* türleri üreyen 4 (%14,8) örnek olup, bunlardan biri BAL örneği idi.

DMİ ve kültür birlikte negatif olarak tespit edilen örnek sayısı 6 (%22,2) olarak bulunurken, DMİ pozitif olup kültürü negatif olan örneğe rastlanmadı (Tablo 11).

Tablo 11. Direkt mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi

Hasta (n=27)	Örnek Türü	DMİ	Kültür
1	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
2	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
3	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
4	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
5	BAL	+	<i>A. flavus</i>
6	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
7	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
8	BAL	-	<i>A. fumigatus</i>
9	TAK	+	<i>A. fumigatus</i>
10	Balgam	+	<i>A. niger</i>
11	Balgam	-	<i>Candida spp.</i>
12	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
13	TAK	+	<i>A. fumigatus</i>
14	Balgam	-	<i>A. fumigatus</i>
15	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
16	BAL	-	-
17	Balgam	-	<i>A. fumigatus</i>
18	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
19	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
20	TAK	+	<i>A. fumigatus</i>
21	Balgam	-	<i>Candida spp.</i>
22	Balgam	-	-
23	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
24	Balgam	+	<i>A. fumigatus</i>
25	Balgam	-	<i>A. flavus</i>
26	Balgam	-	-
27	Balgam	-	<i>Candida spp.</i>

4.7. Kültür ve Galaktomannan Antijeni Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

Kültür ve GM birlikte pozitif olarak tespit edilen örnek sayısı 11 (%51,9)' di. Kültürü negatif olan 6 (%11,1) hastanın GM antijen testi sonuçları pozitif olarak bulundu. Kültürü pozitif olan 10 (%37,7) hastanın GM antijen testi sonuçları negatif olarak bulundu.

Kültür ile GM sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark saptanmadı ($p < 0.05$). GM antijen testi ile kültür sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 12' de gösterilmiştir.

Tablo 12..Çalışma grubunda GM ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

		GALAKTOMANNAN		P
		POZİTİF	NEGATİF	
KÜLTÜR	POZİTİF	11 (%51,9)	10 (%37)	p > 0.05
	NEGATİF	6 (%11,1)	-	

GM cut- off 1ng/ml iken kültür pozitifliği 8, ardışık iki serum örneğinde cut- off 0,5 ng/ml iken kültür pozitifliği 10, tek örnekte cut-off 0,5 ng/ml iken ise 11 hastada kültür pozitifliği tespit edilmiştir. Kültürü pozitif hastalarda GM duyarlılıklarının değerlendirilmesinde cut-off (1, ardışık 0,5, 0,5) sırasıyla (%38,0, %47,6, %52,3) olarak saptanmıştır (Tablo 13).

Tablo 13. Kültürü pozitif hastaların GM cut-off değerlerine göre duyarlılıkları (n=11)

	cut-off 1 ng/ml	cut-off 0,5* ng/ml	cut-off 0,5 ng/ml
KÜLTÜR (+)	8 (%38,0)	10 (%47,6)	11 (%52,3)

*ardışık örneklerde

4.8. Galaktomannan ile Radyolojik Bulguların Karşılaştırılması

GM pozitif 17 hastanın radyolojik bulguları incelendiğinde, 14 (%82,3) hastanın İA ile uyumlu akciğer grafi ya da YRBT görüntülerinin olduğu tespit edildi. Bunlardan 10 (%58,8) tanesinin GM pozitifliği radyolojik bulgularından daha önce ortaya

çıkmaktaydı. 3 hastanın da GM değerleri pozitif olduğu halde İA ile uyumlu radyolojik bulgusunun olmadığı görüldü (Tablo 14).

GM negatif (10 hasta) olup radyolojik bulguları İA ile uyumlu olan 7 hasta olup 3 hastanın da görüntüleme bilgilerine ulaşılammıştır (p > 0.05).

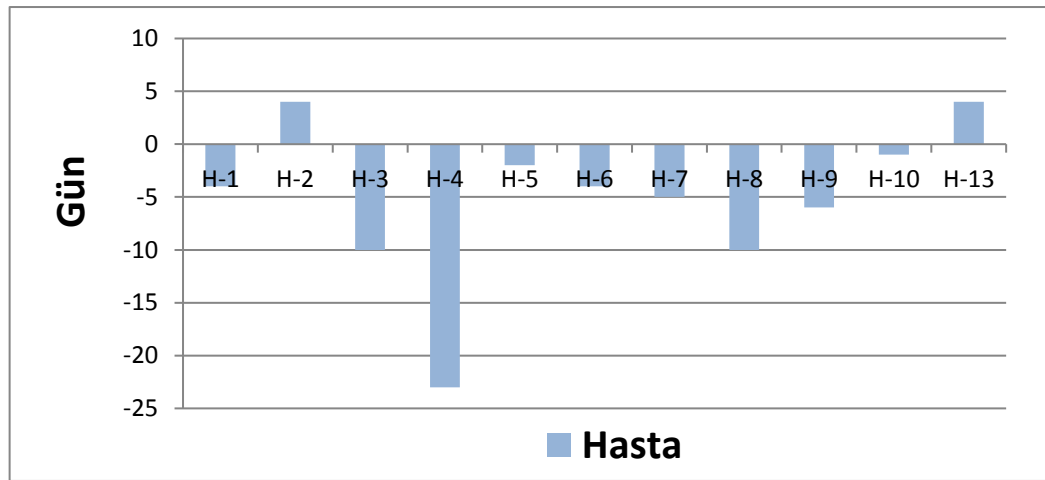
Tablo 14. GM ile radyolojik bulguların karşılaştırılması

		RADYOLOJİK BULGULAR		P
		POZİTİF	NEGATİF	
GALAKTOMANNAN	POZİTİF	14 (%52)	3 (%11,1)	p > 0.05
	NEGATİF	7 (%26)	-	

*3 hastanın radyolojik bulgularına ulaşılammıştır.

4.9. Galaktomannan ile Kültürün Tanı Koyma Süresi Açısından Karşılaştırılması

Galaktomannan antijen testinin pozitifleştiği süre ile kültürün pozitif olduğu süreyi karşılaştırdığımızda, hastaların 9 (%81,8)' unda GM pozitifliğinin kültür pozitifliğinden ortalama 5,1 gün öncesinde ortaya çıktığı saptandı (p < 0.05) (Şekil 5).



Şekil 5. Galaktomannan pozitif bulunan hastaların konvansiyonel yöntemlere göre tanı sürelerinin değerlendirilmesi

4.10. Galaktomannan Pozitifliği ile Konvansiyonel Yöntemlerin Tanı

Koyma Açısından Karşılaştırılması

Galaktomannan pozitifliği ile konvansiyonel yöntemlerden herhangi birinin pozitiflikleri karşılaştırıldığında GM antijen testinin duyarlılığı % 61,5 olarak saptandı.

GM değeri ardışık serum örneklerinde cut-off $>0,5\text{ng/ml}$ bulunan 1 hastanın direkt mikroskopi, kültür incelemeleri negatif ve radyolojik görüntüleme bulguları uyumsuz olduğu için yalancı pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 16).

GM değeri cut-off $<0,5\text{ng/ml}$ bulunan 10 hastanın 7'sinin kültür incelemelerinde *Aspergillus* türleri üredi ve aynı zamanda radyolojik görüntüleme bulguları da uyumlu bulundu. Bu hastalar da yalancı negatif olarak kabul edildi.

Tablo 16. GM ile konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması

		KONVANSİYONEL YÖNTEMLER		P
		POZİTİF	NEGATİF	
GALAKTOMANNAN	POZİTİF	16 (%59,3)	1 (%3,7)	p > 0.05
	NEGATİF	10(%37,0)	-	

5. TARTIŞMA

Aspergillus türleri hemen hemen her yerde yaygın olarak bulunabilen, su ve organik madde içeren tüm yüzeylerde hızla gelişip çoğalabilen, doğadaki her türlü maddeyi substrat olarak kullanıp üreyerek ortamı istila edebilen saprofitik mantarlardır (Özyaral ve ark., 2006).

Birçok *Aspergillus* türünün inhalasyon yoluyla kolaylıkla alınabilen, hidrofobik konidyumları bulunur. Bu konidyalar çok küçük çaplı, kuruluğa dayanıklı, hava içinde asılı damlacıklar şeklinde durabilmektedir. Havadaki partiküllerde asılı duran sporlar enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Özellikle hastane ortamındaki çevresel inşaat çalışmaları, fırsatçı invaziv aspergilloz için eksternal risk faktörüdür (Krasinski ve ark., 1985). *A. fumigatus* havadaki saprofitik mantarların başında gelmektedir (Latge, 1999).

İnhalasyonla, günde yüzlerce *Aspergillus* sporu alınsa da sağlıklı kişilerde hastalık oluşturabilmekte ve immün sistemi baskılanmış kişilerde de alerjik hastalıklardan, invaziv hastalıklara kadar değişen farklı tablolar gelişebilmektedir (Ener, 2011). İnvaziv aspergillozlar önemli bir mortalite nedenidir. Özellikle hematolojik maligniteli hastalara uygulanan yoğun kemoterapi rejimleri ya da kök hücre naklini takiben uygulanan immünsüpresif tedaviler invaziv aspergilloz riskinde artışa sebep olmaktadır. Ayrıca en yüksek risk taşıyan grup yoğun kemoterapi sonrası uzun süreli nötropeni olan hastalardır (Washinton ve ark., 2006).

Aspergilloz hematolojik maligniteli hastalarda, altta yatan hastalık olarak en sık AML, ikinci olarak da ALL hastalarında görülmektedir. Pagano ve ark.(2006)'nın yapmış olduğu bir çalışmada sistemik mantar enfeksiyonlarının en sık %12 ile AML'de, %6,5 ile ikinci sıklıkta ALL hastalarında olduğunu vurgulamaktadır. Yine Perkhofer ve ark. (2010)'nın yaptığı çok merkezli prospektif bir çalışmada AML hastalarının %34 ile invaziv mantar enfeksiyonların yüksek risk grubunu oluşturmakta olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da İA şüpheli hematolojik maligniteli hastaların, altta yatan hastalıkları en sık AML (%29,6) olarak saptanmıştır.

Literatürde hafif immün yetmezlik (DM, reaktif tüberküloz, düşük doz steroid kullanımı vb.) ve hatta bağışıklığı yeterli kişilerde bile sistemik mantar enfeksiyon olguları tanımlanmaktadır (Kristan ve ark., 2002). Dimopoulos ve ark. (2003) otopsi sonuçlarını ele aldığı çalışmalarında, 6 hastada İA saptanmış, bu hastaların 5'inin KOAH nedeniyle mekanik ventilasyon ve steroid tedavisi almakta olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda İA riski taşıyan hastaların %26,0' sı KOAH' li olup steroid tedavisi alan hastalardı.

İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonlarının özgül klinik belirtileri bulunmadığından olgular genellikle geç tanımlanırlar ve hızla ilerleme gösterirler. Bazı olgularda tanı ancak postmortem yapılabilmektedir. İA' un kesin ve erken tanısına ulaşmanın tek yolu ve altın standart, biyopsi veya iğne aspirasyon ile alınan örneğin direkt mikroskopik incelenmesi ve/veya histolojik inceleme ile kültür sonucunun birleştirilmesidir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2005).

Kan ve doku biyopsi kültürleri invaziv hastalıkların tanısında en değerli örnekler olmakla beraber, kan kültürlerinin duyarlılığı çok düşük (<%5) olup, doku biyopsisi almak trombositopeni nedeniyle zor olmaktadır (Kontoyiannis ve Bodey, 2002; Simoneau ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda İA tanısında solunum yolu örneklerinin (balgam, trakeal aspirat, sinüs ponksiyon aspiratı gibi) duyarlılığı %15-77 arasında değişmekle beraber BAL örneği kullanılırsa bu oran % 45-62'ye yükselmektedir (Nalensik ve ark., 1980; Kahn ve ark., 1986; Horvath ve Dummer, 1996; Perfect ve ark., 2001). Hematolojik maligniteli hastalarda ve kemik iliği nakli olanlarda solunum yolu örneklerinde İA tanısındaki üremelerinin, pozitif prediktif değeri %70-80 civarında olup, aksi ispatlanana kadar tüm pozitif örneklerin anlamlı kabul edilmesi önerilmiştir (Yu ve ark., 1986; Wald ve ark., 1997; Perfect ve ark., 2001). Çalışmamızda İA şüpheli olan 27 hastanın 13'ü balgam, 5'i BAL ve 3'ü TAK örneği olmak üzere toplam 21 (%77.7)' inde *Aspergillus* cinsi üreme saptanmıştır.

Aspergillus cinsinde insanlarda hastalık yapıcı olduğu bildirilen 33 türden bahsedilmektedir ve en sık görülen *Aspergillus* türleri *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* türleridir (Hope ve ark., 2005). Ağca ve ark. (2014), nütropenik ve nütropenik olmayan hastalarda BAL örneklerinde GM ve kültür sonuçlarını karşılaştırdığı bir çalışmada, 134 örneğinin 84 (%60.9)' ünü *Aspergillus fumigatus* olarak izole etmiştir. Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, klinik örneklerden en fazla *A. fumigatus* (%71.4) izole edilmiştir.

İA tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür, standart konvansiyonel yöntemlerdir. Klinik bulgular çoğunlukla özgül değil ve başka hastalıklarla karışabilmektedir. Klinik bulguların belirgin olmaması ve kültür sonucu çıkana kadar geçen süre, tedavide önemli gecikmelere neden olmaktadır. Radyolojik olarak İA bulgusu

saptandıktan sonra tedaviye başlansa bile, başarılı sonuçlar almak çoğu zaman gecikebilmektedir (Kiraz, 2010). Kesin tanıya ulaşmadaki güçlük nedeniyle hastaların büyük bir kısmına ampirik antifungal tedavi başlanmakla beraber oldukça maliyetli ve toksik olup, olguların çoğunda gereksizdir. Bu işlemlerin yerine örnek alması kolay, daha hızlı, klinik ve radyolojik bulguların ortaya çıkmasından önce kullanılacak, güvenilir testlerin gereği ortaya çıkmıştır, böylelikle tanıda serolojik testler kullanılmaya başlanmıştır (Latge, 1999; Maertens ve ark., 2005).

GM ekzoantijen olup İA'lı hastaların serum ve vücut sıvılarından ELISA, (Lateks Aglutinasyon) LA, (Radio Immün Assay) RIA gibi yöntemler ile saptanabilmektedir (Stynen ve ark., 1995). GM testi dolaşımdaki *Aspergillus'* a ait galaktomannan antijenini saptamaya yarayan ve 2003 de FDA tarafından onay alan antijen testidir (Platelia *Aspergillus* EİA=Bio-Rad). Kit tek basamaklı sandwich ELISA prensibi ile çalışmaktadır. İA tanısında serum GM antijeninin ardışık örneklerdeki pozitiflik bulunmasının anlamlı olacağı ifade edilmektedir (Swanink ve ark., 1997).

FDA' e göre, EORTC-MSG kriterleri dikkate alındığında kitin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 80,7 ve % 89,2 dir. Bununla beraber yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllükler %23-100 arasında değişmektedir (Marr ve ark., 2004).

Maertensve ark. (1999) İA açısından şüpheli 71 hastanın otopsi, kültür ve histolojik değerlendirmeleri sonucu 27'si kesin İA tanısı alan 27 hastada GM testinin duyarlılığı ve özgüllüğü cut-off 0,6 iken sırasıyla %92,6 ve %95,4 olarak bulunduğunu, testin hematolojik maligniteli hastalarda duyarlı olduğunu ve ampirik tedavi gereksinimini azalttığını bildirmişlerdir.

GM testinin tanısal değerinin araştırıldığı Pfeiffer ve ark. (2006) 27 çalışmayı içeren meta analizinde, EORTC-MSG kriterlerine göre kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA tanısı alan hastalarda, duyarlılığın %61, özgüllüğün ise %93 olduğu belirlenmiştir.

Tanrıöver ve ark. (2010) hematolojik malignitesi olan 45 hastada GM düzeylerini inceledikleri bir çalışmada, EORTC-MSG kriterlerine göre 1 kanıtlanmış ve 4 yüksek olasılıklı İA tanısı alan hasta yer almaktadır. Bu çalışmada cut-off değeri 0,5 olarak kabul edildiğinde duyarlılık %60, özgüllük %21 bulunmuş ve testin birçok faktörden etkilenebileceği, testin yararlılığını her merkezin kendi durumuna göre değerlendirmesi gerektiği vurgulanmıştır. İA şüpheli 87 hastanın incelendiği bir başka çalışmalarında da, hastaların 57' si İA tanısı almış, yine GM cut-off değeri 0,5 kabul

edilmiş ve bu durumda da duyarlılık %38, özgüllük %95 olarak saptanmıştır (Tanrıöver ve ark. 2008).

Galaktomannanın tanısal değerinin araştırıldığı Öz ve ark. (2014) çalışmasında İA şüpheli 87 hastanın 57'si İA' lı bunların 3'ü kesin, 33'ü yüksek olasılıklı ve 21'de düşük olasılıklı olarak bulunmuş ve İA' lı 57 hastanın %38'inin GM testi pozitif bulmuşlardır. Kültürü pozitif 16 hastanın GM testinin duyarlılıklarını (cut off >0,5) ise %49 olarak tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda EORTC-MSG kriterlerine göre sınıflandırma yapıldığında şüpheli İA' lı 27 hastanın 21' i yüksek olasılıklı, 6' sı düşük olasılıklı olarak değerlendirilmiştir. Kesin İA olgusuna rastlanmamıştır.

GM cut- off 1ng/ml iken pozitifliği %45, ardışık iki serum örneğinde cut- off 0,5 ng/ml iken pozitifliği %55, tek örnekte cut- off 0,5 ng/ml iken ise %63 olarak belirlenmiştir. Testin farklı cut-off değerlerindeki duyarlılık ve özgüllük değerleri de sırasıyla tek örnekte cut- off 0,5 ng/ml %52, %79, ardışık iki serum örneğinde cut- off 0,5 ng/ml %52, %82, cut- off 1ng/ml %38, %86 olarak tespit edilmiştir. Cut- off değeri arttıkça duyarlılık düşmekte özgüllük artmaktadır.

Özgüllük ve duyarlılığın çok farklı bulunmasının çeşitli sebepleri vardır. Bunlar içinde en önemlisi kanıtlanmış olguların çalışmalarda çok az olmasıdır. Leeflang ve ark. (2015) 54 çalışmayı içeren meta analizlerinde, nötropeni olan ve kesin ya da yüksek olasılıklı invaziv aspergilloz olarak sınıflandırılan hastaları değerlendirmeye almışlardır. GM testi cut-off 0,5 ng/ml olarak kullanıldığında duyarlılığı %82, özgüllüğü %81, cut-off 1ng/ml' de duyarlılığı %72, özgüllüğü %88, cut- off 1,5 ng/ml' de ise duyarlılığı %61, özgüllüğü %93 olarak saptamışlardır. Ancak sonuçların heterojenite gösterdiğini, referans standardın (EORTC_MSG kriterlerinin, özellikle konak faktörlerinin) her çalışma için aynı şekilde yorumlanamayabileceğini, GM testinin pozitif olduğu zamanla ilgili herhangi bir bilginin yer almaması gibi karşılaşılan zorluklara dikkat çekmişlerdir.

Yapılan çalışmalardaki duyarlılık ve özgüllük değerlerinin farklı olmasının diğer nedenleri; alınan örneğin tipi ve sayısı (ardışık örnek, tek örnek alımı), klinik örneğin enfeksiyonun hangi zamanında alındığı, çalışılan cut-off değerlerinin farklı olması, profilaktik veya ampirik tedavi alınıp alınmadığı olarak sıralanabilir. Klinik olarak İA şüpheli hastalarda serolojik test pozitifliği yüksek oranda enfeksiyonu düşündürürken, çıkan negatif sonuçlar ise enfeksiyonu dışlamamaktadır (Maertens ve ark., 2004).

Galaktomannan test sonuçlarında yalancı pozitifliklere yol açan çeşitli etkenler vardır. Bunlardan biri piperasilin-tazobaktam (TZP) kullanımınıdır. TZP ile galaktomannan antijeninin galatofuran zincirleri arasındaki çapraz reaksiyon sonucu yalancı pozitiflik gelişmektedir. Ancak yapılan değerlendirmelerde 2006 yılında üretici firma tarafından EDTA ilavesi ile çapraz reaksiyonun önlenildiği ve yalancı pozitifliğin engellenebildiği belirtilmektedir (Metan, 2012). Uzun nötropenisi olan veya transplantasyon yapılmış hastalarda İA tanısı için GM testinin değerlendirildiği bir çalışmada duyarlılık %89.9, yalancı pozitiflik %14 bulunmuş, *Aspergillus* dışı mantarların da göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamışlardır (Maertens ve ark., 2001).

Yalancı negatif sonuçların hastalığı kanıtlanmış olanların % 8-10'unda görüldüğü ve bunun sebebinin bilinmediği, bazı *Aspergillus* türlerinde GM üretim yeteneğinin farklı düzeyde olması ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). Ayrıca antifungal tedaviye erken başlamanın da yalancı negatifliğe yol açtığı görüşü bulunmaktadır (Wheat, 2003).

Mevcut kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisinin İA' lu hastalar için yeterli duyarlılığa sahip olmamalarından ve her testin enfeksiyonun farklı zamanlarında pozitifleşmesinden dolayı testlerin birarada kullanılmasının performanslarını arttıracığı düşüncesi kabul görmüştür. Bizim çalışmamızda da GM' ın konvansiyonel yöntemler ile birlikte kullanıldığında duyarlılığının arttığı gözlemlenmiştir.

İA tanısı için görüntüleme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Akciğer grafisi ve YRBT ile inceleme en sık kullanılan tetkiklerdir. Mantarın giriş yeri genellikle akciğerdir. Akciğer grafisi çoğu zaman normal olabilir veya yeterli bilgi vermeyebilir. Bu nedenle YRBT daha duyarlı bir yöntemdir. YRBT ile erken dönem belirtisi olan buzlu cam alanı olarak tanımlanan halo belirtisi saptanabilir. Erken dönem bulgularından yaklaşık bir-iki hafta sonra da kavitasyon ve hava-hilal belirtisi görülmektedir. 235 kanıtlı invaziv aspergilloz olgusunun BT bulgularının değerlendirildiği bir çalışmada olguların çoğunda en az bir makronodül (% 94) ve en az bir halo bulgusu (% 61) saptanmış olup kavitasyon ve hava-hilal belirtisine daha az rastlanmıştır (Greene ve ark., 2007). Ancak bu bulgular İA' a özgü olmayabilir, farklı etkenlerle oluşan enfeksiyonların seyrinde de görülebilmektedir (Nucci ve ark., 2010). Çalışmamızda hasta grubunun 21 (%77.7)' inde bu bulgulardan en az birine rastlanılmıştır.

Klinikte bazen immünsüpresif hastalarda İA gelişip gelişmediği izlemek için bir araç olarak, hastanın göğüs radyografilerinin klinik bulgularına ek olarak GM testi kullanılmaktadır. GM testi pozitif çıktığında hasta YRTB çekimi için yönlendirilir. Genellikle İA için klinik belirtiler ortaya çıkmadan GM pozitifleşmektedir (Pfeiffer ve ark., 2006). Bu nedenle testin erken ve olumlu bir tedaviye katkısı olduğu yapılan çalışmalarda dikkat çekmektedir (Maertens ve ark., 1999). Bir başka çalışmada, belirli aralıklarla çalışıldığında, galaktomannan yöntemi İA tanısında ortalama 6-14 gün süreyle diğer yöntemlere göre daha önde ve üstün bulunmuştur (Maertens ve ark., 2002).

Bizim çalışmamızda paralel olarak GM cut-off $\geq 0,5$ ng/ml pozitif olarak değerlendirilen hastaların 10' unda GM' in radyolojik görüntülemelerden 4 ila 10 gün önce pozitifleştiği, aynı zamanda GM testinin konvansiyonel yöntemlere göre de 5,1 gün önce pozitifleşebildiği saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri *Aspergillus* türleridir. Yüksek riskli hematolojik maligniteli ve risk faktörü taşıyan diğer immün yetmezlikli hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Bu hastalarda erken tanı hayati önem taşımakta ve tanıda klinik bulgular, histopatolojik inceleme, radyolojik görüntüleme yöntemleri ile mikrobiyolojik testler birlikte değerlendirilmelidir.

İnvaziv aspergilloz olgularında erken tanı konulmasının güçlüğü ve altın standart olan kültürde etkeni üretme aşamasında geçen sürenin uzun olmasından yola çıkarak, çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ve serolojik bir belirteç olan GM antijen testinin tanıdaki değerini karşılaştırmayı amaçladık.

İA etkeninin kesin laboratuvar tanısı için mikrobiyolojik örnekler, invaziv işlemlerle temin edilebileceğinden çoğu zaman hastaların kritik durumlarından dolayı yapılamamaktadır. Aynı zamanda konvansiyonel yöntemler yeterli duyarlılığa ve/veya özgüllüğe sahip olmadıklarından tanı açısından yeterli olamamaktadırlar. Bu nedenle invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında bu yöntemler dışında farklı tanı yöntemlerine de ihtiyaç duyulmaktadır.

Galaktomannan antijen testi oldukça hızlı sonuçlanan invaziv olmayan bir serolojik tanı yöntemi olmakla birlikte duyarlılık ve özgüllük oranları ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmektedir. Testin birçok faktörden etkilenebileceği, yapılan çalışmalarda yanlış negatiflik ve pozitifliklere neden olabileceği vurgulanmaktadır.

Bizim çalışmamızda serolojik tanı amacıyla kullanılan GM antijen testinin duyarlılık değerleri düşük olarak saptanmıştır. Bu düşüklüğün nedeninin *Aspergillus* türleri arasında GM sentez ve salıverilmesindeki farklılıklar ve GM dolaşımının sürekli olmamasına bağlı olabileceği, ayrıca ampirik veya profilaktik olarak antifungal tedavi uygulanması, antifungal proflaksi veya tedavi alan hastaların grubumuzda fazla olması, kanıtlanmış İA olgularımızın olmamasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu faktörler göz önünde bulundurularak GM antijen testi sonuçlarının hastanın klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda kültür, radyolojik bulgular ile GM testini değerlendirdiğimizde, erken tanı açısından GM testinin daha önce pozitifleştiğini saptadık. Buradan hareketle invaziv aspergillozda erken tanıyı ve preemtif tedaviyi yönlendirmek amacıyla GM testi

ümit verici olmakla beraber bu testin prospektif olarak tedavide ve prognozda etkinliklerini değerlendiren geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Ağca H, Ener B, Yılmaz E, Ursavaş A, Kazak E, Özkocaman V, Ali R. Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients. *Mycoses*, 2014;57(3);169-175.
- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*.2009;460:1117–1121.
- Akan H. Fungal İnfeksiyonlarda EORTC tanımları. *ANKEM Dergisi*. 2009; 23(2): 130-34.
- Al-Alawi A, Ryan CF, Flint JD, Müller NL. *Aspergillus* related lung disease. *Can Respir J* 2005; 12: 377-87.
- 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.
- Alp Ş. *Aspergillus* cinsi mantarların olası virülans faktörleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2006; 40: 109-19.
- Arda B. İnvaziv mantar enfeksiyonu tanısında kullanılan radyolojik ve serolojik testlerle ilgili tanımlar. *ANKEM Derg* 2009; 23: 122-125.
- Arda M. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş 2.Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 2000;(25)<http://www.mikrobiyoloji.org> (Ulaş:11.04.2017).
- Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington ASM Press, 2003:1859-68.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
- Ayhan K. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar ve Bulaşma Kaynakları. *Küfler*. <http://www.mikrobiyoloji.org>. (Ulaş:14.05.2017)
- Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prevost MC, Latge JP. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2007;9:1588–1600.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 497-516.
- Bernard M, Latge J.P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Medical Mycology*. 2001;39(1): 9-17.
- Bilezikci B, Demirhan B, Haberal AN, Arıkan Ü. Invasive pulmonary aspergillosis in solid-organ transplant recipients: postmortem histopatologic findings. *Turk J Med Sci* 2002; 32: 31-34.

- Birinci A, Bilgin K, ve Çaycı YT. Klinik Aspergillus spp. İzolatlarında Virülans Faktörü Olarak Asit Proteinaz ve Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2014. 48(3), 491-494.
- Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P. Detection of Aspergillus spp. in biological samples by real-time PCR. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006; 150:245-248
- 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.
- Brokhage AA, Systemic Fungal Infections Caused by Aspergillus species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Determinants. *Curr Drug Targets* 2005; 6: 875- 886.
- Bromley IMJ, Donaldson K, Binding of Aspergillus fumigatus spores to the lung epithelial cells and basement membrane proteins Relevance to the astmatic lung. *Thorax* 1996; 51:1203- 1209.
- Brookman JL and Denning DW. Molecular genetics in Aspergillus fumigatus. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3:468-74.
- Buchheid D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B. et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*. 2004; 125(2): 196-202.
- Buckingham SJ, Hansell DM. Aspergillus in the lung: diverse and coincident forms. *European radiology*, 2003;13:1786-1800.
- Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(1):253-9.
- Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006;44:163-172.
- Chandler FW, Blastomycosis. In Connor DH, Chandler FW, , Manz HJ eds. *Pathology of Infectious Diseases*. Stamford: Appleton & Lange, 1997;943-51
- Chandrasekar P. Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. *European Journal of Haematology*. 2009; 84: 281-90.
- Chatzimichalis A, Massard C, Kessler R, Barsotti P, Claudon B, Ojard Chillet J, VVihlm JM. Bronchopulmonary aspergilloma: a reappraisal. *Ann Thorac surg*; 1998, 65(4):927-929.
- Chris Tomee JF, Wierengha ATJ, Hiemstra PS, Kaufman HF. Proteases from Aspergillus fumigatus induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 1997; 176: 300-303.

- Çerikçioğlu N, Aspergillus hücre duvar organizasyonu. İç: Ener B editör, Aspergillus. İstanbul: Birmat Matbaacılık 2006. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın. 2006; 50: 53-56
- Çerikçioğlu N. Mantarlarda virülans faktörleri. ANKEM Derg, 26(Ek2), 2012 261-269.
- Delibalta DG, Gencer S, Çağ Y, Özer S, Uzamığ AteĖli Nötropenik Olgularda Galaktomannan Ölçümünün Ėnvaziv Aspergilloz Yönünden Değerlendirilmesi. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2012; 17(1): 11-17.
- Denning DW. Aspergillosis: diagnosis and treatment. Int. J. Antimicrob. Agents. 1996;6:161-8.
- Denning D.W. İnvazive aspergillosis. Clinical Infectious Disease. 1998; 26: 781- 805.
- Dismukes W.E. Introduction to Antifungal Drugs. Clin Infect Dis 2000;30: 653-7
- Doffman SR, Agrawal SG, Brown JS. Invasive pulmonary aspergillosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2005; 3:613–627.
- Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer but Stil a Ways to Go. Clin Infect Dis. 2006;42:487-9.
- Eliopoulos GM, Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clinical Infectious Diseases. 2002;35(9): 1073-1080.
- Ener B. Fungal infeksiyonlarda tanı. Ankem Derg 2011; 25(Ek 2):E156-61.
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of Aspergillus fumigatus cell wall. J. Biol. Chem. 2000;275:27594–27607. [27]
- Franquet T, et al. Spectrum of pulmonary Aspergillosis: Histologic, clinical, and radiologic findings. Radiographics 2001; 21: 825-837
- Gams W, Samson RA. Typification of Aspergillus and related telemorph genera. In: Samson RA and Pitt JI (eds). Advances in Penicillium nad Aspergillus systematics. New York: Plenum Pres; 1985. p. 23-31.
- Gastebois A, Clavaud C, Aimanianda V, et al. Aspergillus fumigatus: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. Future Microbiol. 2009;4:583–595
- Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2011;52(9):1144-55.
- Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW et al: Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign, Clin Infect Dis 2007;44(3):373-9
- Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P. et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. Clinical Infectious Diseases. 2007; 44(3): 373-39.

- Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B et. al. Aspergillus Galactomannan Detection in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20: 1898-1906.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM, Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9: 469- 488.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:609-22.
- Horvath JA, Dummer S. The use of respiratorytract cultures in the diagnosis of invasive aspergillosis, *Am J Med* 1996;100(2):171-8
- Huffnagle GB. Investigating Invasive Aspergillosis. *Am J Respir Critl Care Med*. 2002;166:1159-1160
- İnal AS. Mantar enfeksiyonlarının tanısı ve antifungal duyarlılık testleri. In:Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö. Önemli ve sorunlu fungal enfeksiyonlar. Ankara:Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006. p. 27-54.
- Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:518–23.
- Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification of the pathogenic Aspergillus species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiology and immunology*, 2002; 46(12), 841-848.
- Kantarcıoğlu SA, 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.
- Kantarcıoğlu SA, Yücel A. İnvaziv aspergillozun ön tanımında galaktomannan antijenini belirlemenin yeri ve önemi. *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 2005;36(3).
- Kantarcıoğlu SA, Yücel A. Mantarların Rinosinüzitlerdeki Rolü: Epidemiyoloji, Mikoloji, İmmünoloji, Patogenez, Sınıflama Kriterleri, Laboratuar Tanımı, Antifungallerin Tedavideki Yeri. *Cerrahpaşa J*. 2006; 37: 137-54.
- Kantarcıoğlu SA, Yücel A. The significance of galactomannan antigen detectionin presumptive diagnosis of invasive aspergillosis. *Cerrahpasa J Med* 2005; 36:155-166.
- 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.
- Karhaus M. Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin-review of the literature. *Eur Med Res* 2011; 16:145-52.
- Kaştımur S, editör “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu”. Ankara :Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, 2010. s:1-160.
- Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S & Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→ 3)-β-d-

- glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *Journal of clinical microbiology*, 2004;42:2733-2741.
- Kiraz N. Mantar enfeksiyonlarında etiyolojik tanı konvansiyonel ve serolojik yöntemler. XXXIV. Turk Mikrobiyoloji Kongresi, 7-11 Kasım 2010, Girne, KKTC. Program ve Bildiri Kitabı, s: 126-7.
- Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004;39:1467-74.
- Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R, Raad II. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. *Clinical infectious diseases*, 2000;31(1):188-189.
- Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: An update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(3):161-172.
- Krasinski K, Holzman RS, Hanna B, Greco MA, Graff M, Bhogal M. Nosocomial fungal infection during hospital renovation. *Infection Control* 1985; 278-282.
- Lakadamyalı H, Erdoğan H, Lakadamyalı H, Akçay Ş. Özyılkan Ö. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Olguda Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2007;27(1):142-145.
- Latge JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310-50.
- Latge JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 2007;66:279–290. [28]
- Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiol.* 2010;12:863–872. [29]
- Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;8(4)
- Leverly 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.
- Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Einsele H. Polymerase chain reaction detection of Aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *Journal of Infectious Diseases*, 2002; 185(8), 1203-1206.
- Loudon KW, Coke AP, Burnie JP, Shaw AJ, Oppenheim BA & Morris CQ. Kitchens as a source of Aspergillus niger infection. *Journal of hospital Infection*, 1996;32(3):91-198.
- Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases* 2002;186: 1297-1306.
- Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked

- immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3223-28.
- Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M: Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation, *Blood* 2001;97(6):1604-10.
- Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190: 641-49.
- Marty FM, Koo S. Role of (1-3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*. 2009; 47(1): 233-40.
- Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007;67:1567–601.
- McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol* 2005;43(Suppl.1):125-128.
- Metan G. The interaction between piperacillin-tazobactam and *Aspergillus* galactomannan antigenemia assay: is the story over? *Infection*. 2012. Epub 2012/09/08.
- Metin DY, Kiraz N. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu. İç: Ener B, editör. *Aspergillus taksonomisinde yenilikler*. Bursa; 2006. 25-29.
- Mitchell TG. Kingdom Fungi: Fungal phylogeny and systematics. In: Merz WG, Hay RJ eds. *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Medical Mycology*. Washington DC: ASM Press, 2005:3-68
- Murray RP, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry LM. İç: Başustaoğlu A, editör. *Aspergillus, Fusarium ve diğer fırsatçı mantarlar*. 9.baskı. Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009: s.1802-1838.
- Mutlu G. Aspergilloz. İç: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, editör. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:46* 2003; s. 221-32
- Nalesnik MA, Myerogitz RL, Jenkins R. Significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory secretions in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1980;11:370–6.
- Nucci M, Nouer SA, Graziutti M, Kumar NS, Barlogie B, Anaissie E. Probable invasive aspergillosis without prespecified radiologic findings: proposal for inclusion of a new category of aspergillosis and implications for studying novel therapies. *Clin Infect Dis* 2010(51); 1273-1280.
- Obayashi T, Kawai T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A & Horiuchi A. Plasma (1→3)-β-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *The Lancet*, 1995;345(8941):17-20.

- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ostrosky-Zeichner L. β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 2004;39:199-205.
- Oshero N. & May GS The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters*, 2001;199:153–160.
- Overberger PA, Wadowsky RM, Schaper MM. Evaluation of airborne particulates and fungi during hospital renovation. *American Industrial Hygiene Association* 1995;56(7):706-712.
- Özyaral O, Keskin Y, Erkan F, Hayran O. Nedeni Bilinmeyen Semptomların Ardındaki Hasta Bina Sendromu Olguları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 2006;5(5):552-563.
- Özyaral O. Aspergillus türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. İç: Ener B editör, *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın. 2006; 50: 30-41
- Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068-75.
- Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:5–14.
- Patterson TF. *Aspergillus Species*. In Mandell GL BJ, Dolin R. 6th ed. *Principles and Practice of Infectious Disease Philadelphia: Churchill Livingstone*, 2005.
- Patterson TF. *Aspergillus species*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R editors, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7. ed. Philadelphia. Churchill Livingstone; 2010;3241-55.
- Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group: Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group, *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813- 21.
- Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1824–33.
- Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G, Krause R, Hönigl M & Willinger B. The Nationwide Austrian *Aspergillus* Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *International journal of antimicrobial agents*, 2010;36(6): 531-536.

- Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 42: 1417-27.
- Raper KB, Fennell DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company; 1965. p. 686.
- Richardson MD, Kokki M. New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Annals of medicine*, 1999; 31(5), 327-335.
- Richardson MD, Kokki M. *Aspergillus*. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003;273-296.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. *Introduction to Food-borne Fungi*. 4th ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- Samson RA and Gams W. The taxonomic situation in the hyphomycete genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1984;50:815-824.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, Sorda ML, Franco A, Fadda G. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3922-3925.
- Saraçlı MA. Aspergilloz tanısında moleküler yöntemler. *Aspergillus*. Ener B (ed). *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:56* 2006, S.195-201
- Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. *Clin Diag Lab Immunol* 2005; 12:1322-1327.
- Sentandreu, R, Elorza MV, Valentin E, Ruiz-Herrera J. The structure and composition of the fungal cell wall, pp: 3-39. San-Blas G, Calderone RA (eds), *Pathogenic Fungi, Structural Biology and Taxonomy*. 2004. Caister Academic Press, Norfolk.
- Silveira F, Paterson DL. Pulmonary fungal infections. *Current opinion in pulmonary medicine*, 2005;11: 242-246.
- Simoneau E, Kelly M, Labbe AC, Roy J, Laverdiere M. (What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp in hematopoietic stem cell transplant recipients A 23 year experience. *Bone marrow transplantation*, 2005;35(3);303-306.
- Somer A. İnvazif Mantar İnfeksiyonlarının Tedavisi. *Çocuk Enf Derg*. 2007;1: Özel sayı 1;29-32.
- Soubani AO, Chandrasekar PH. "The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis." *Chest Journal* 2002;121:1988-1999.
- Stevens DA, Kan VL, Judson MA et al. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis*, 2000;30:696-709

- Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(2):497-500. Epub 1995/02/01.
- Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Latge JP. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infection and immunity*, 1992;60: 2237-2245.
- Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *New England Journal of Medicine*, 2003;349: 2366-2367.
- Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C & Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*, 2001;91:311-318.
- Sundaram C, Umabala P, Laxmi V, et al. Pathology of fungal infections of the central nervous system: 17 years' experience from Southern India. *Histopathology* 2006;49: 396-405.
- Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Mullbacher A. Immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun* 1994; 62: 1192-1198.
- Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly J P & Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997;35: 257-260.
- Tanriover MD, Ascioğlu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses*. 2008.
- Tanriover MD, Ascioğlu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses*. 2010; 53(1): 16-25. 96.
- Thompson B, Stanford V, Galvin J, Kurihara Y. Varied radiological appearances of pulmonary aspergillosis. *Radiographics* 1995; 15:1273-1284.
- Tillie-Leblond I, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2005;60:1004-13.
- Toscano CM, Jarvis WR. Epidemiology and Clinical Aspect of Unusual Fungal Nosocomial Infections. *Clinical Updates In: Fungal Infections, Estados Unidos*, 1999;2:1- 5.
- Tsai HF, Wheeler MH, Chang YC & Kwon-Chung KJ. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol*. 1999;181, 6469–6477.
- Tümbay E. *Pratik Tıp Mikolojisi*. İzmir: Bilgehan Basımevi; 1983: p. 120-3.
- Usta M, Ersoy A, Güllülü M, Ener B ve ark. Renal Transplant Alıcılarında *Aspergillus* Pnömonisi. *Archives Pulmonary*. 2001;1:25-28.

- Verweij PE, Erjavec Z, Sluifers W, Goessens W, Rozenberg-Arska M, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: 90 intra- and interlaboratory reproducibility. The Dutch Interuniversity Working Party for Invasive Mycoses. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(6):1612-6.
- Verweij PE, Lee HAL, Rijs AJMM. The role of conventional diagnostic tools, “Maertens JA, Marr KA (eds). *Diagnosis of Fungal Infections*” Informa Health, New York 2007:p.19-40.
- Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995;33:1912-1914.
- Viscoli C, Machetti M, Gazzola P et al. Aspergillus Galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 1496-99.
- Vonberg R-P, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings, Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Medical School Hannover, Germany, *Journal of Hospital Infection*. 2006; 63: 246-54.
- Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175:1459–66.
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *CID* 2008; 46:327-60.
- Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Current Clinical Topics and Infectious Disease*.1998; 18: 101-153.
- Walter EA, Bowden RA. Infection in the bone marrow transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9: 823-47.
- Washington 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.
- Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transplant Infectious Disease*, 2003;5: 158-166.
- White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clinical infectious diseases*, 2006; 42(4), 479-486.
- White PL, Barton R, Guiver M, Linton JC et al. A Consensus on Fungal Polymerase Chain Reaction Diagnosis *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006; 8(3): 376-84.
- Won HJ, Lee KS, Cheon JE, et al. Invasive pulmonary aspergillosis: prediction at thin-section CT in patients with neutropenia-a prospective study. *Radiology* 1998; 208:777-782.

- Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for Aspergillus species in serum of patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 1996; 34(10):2464-2468.
- Yıldırım ŞT. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Ustaçelebi Ş, editör Ankara: Güneş Kitapevi; 1999;s.1129-44
- Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of Aspergillus from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1986;81:249-54.
- Zander DS. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: An overview. Arch Pathol Lab Med 2005;129:924-8.
- Zeichner Ostrosky L. Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. The American Journal of Medicine. 2012;125: 14-24.
- Zeichner-Ostrosky L, Alexander B D, Kett D H, J. Vazquez et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3) β -D-Glukan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans . Clinical Infectious Disease. 2005; 41: 654-59.
- URL 1:http://old.aspergillus.org.uk/secure/image_library/flavus/flavcol.htm,2013
- URL 2:http://old.aspergillus.org.uk/secure/image_library/niger/fumni11.htm,2013

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1045

23.06.2017

Sayın Prof.Dr.Asuman BİRİNCİ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Aspergilloz tanısında kullanılan konvansiyonel ve serolojik yöntemlerin karşılaştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2015/211 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 30.04.2015 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof.Dr.Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Gonca YILMAZ

Doğum Yeri: Karabük

Doğum Tarihi: 06.11.1981

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2002-Mezun

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı-Çalışıyor

E-posta: biyogonca@hotmail.com

