

X

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
Küt. Dök. Daire Bek.



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

SİSTEMİK MANTAR ENFEKSİYONU ŞÜPHELİ
HASTALARIN KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN ÇEŞİTLİ
YÖNTEMLERLE MANTARLARIN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hafize SAV

Danışman

Prof. Dr. A. Nedret KOÇ

KAYSERİ-2012

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Prof. Dr. A.Nedret Koç'a ve eğitimimde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tezimi çalışmamda her türlü desteği benden esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışanlara özellikle de mikoloji çalışanlarına teşekkür ederim.

TST-09-1056 nolu tez projem Erciyes Üniversitesi Proje değerlendirme ve izleme tarafından desteklendiği için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında yanımda olan eşime, biricik oğlum Kadir Burak Sav'a her an yanımda olan ve dualarını benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
KUL Dök. Daire Bşk.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO ve GRAFİK LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2. 1. <i>CANDIDA</i> TÜRLERİ	3
2. 1. 1. <i>CANDIDA</i> Türlerinin Sınıflandırılması	3
2. 1. 2. <i>CANDIDA</i> Türlerinin Epidemiyolojisi.....	4
2. 1. 3. <i>CANDIDA</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	4
2. 1. 3. 1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri;.....	4
2. 1. 3. 2. <i>Candida</i> Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri;	5
2. 1. 3. 3. <i>Candida</i> Türlerinde Patogenez.....	5
2. 1. 3. 4. <i>Candida</i> Türlerinde Virülans Faktörleri;	5
2.1.4. <i>CANDIDA</i> Türlerinin Klinik Önemi	6
2.1.5. Tanı Yöntemleri	8
2. 1. 5. 1. Laboratuvar Tanı Yöntemleri.....	8
2.1.5. 2.Klinik Ve Radyolojik Tanımlama.....	11
2. 2. <i>ASPERGILLUS</i> TÜRLERİ	14
2.2.1. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Sınıflandırılması	14
2. 2. 2 <i>ASPERGILLUS</i> Türlerinde Epidemiyoloji.....	14
2.2.3. <i>ASPERGILLUS</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	15
2.2.3.1.Makroskobik özellikleri;	15
2.2.3.2.Mikroskobik morfolojisi :	15
2.2.3.3. Antijenik Özellikleri:	16
2.2.3.4. Patogenez	17
2.2.3.5.Virulans Faktör	17

2.2.4. <i>ASPERGİLLUS</i> Türlerinin Klinik Önemi	19
2.2.5 Tanı Yöntemleri	22
2.2.5.1.Laboratuvar Tanı Yöntemleri.....	22
2.2.5.3 KLİNİK VE RADYOLOJİK TANIMLAMA	26
2.2.6.Tedavi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER.....	31
3. 2. ÖRNEKLERİN MİKOLOJİK İNCELEMESİ.....	32
3. 2. 1. Mikroskopik inceleme:.....	32
3. 2. 2. Kültür:	32
3.2.3.Germ Tüp Oluşturma Özelliği	32
3.2.4 Karbohidrat Asimilasyon Özelliklerin Test Edilmesi	32
3. 2. 5. Mantarın tür düzeyinde tanımlanması:.....	33
3. 3. SEROLOJİK TESTLER	34
3. 3. 1. Galaktomannan antijen arama.....	34
3. 3. 2.Beta Glukan testi:.....	37
3. 3. 3. PZR İle <i>A.fumigatus</i> Araştırılması	41
2. 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	47
4.BULGULAR.....	48
HASTA GRUBUNUN DEMOGRAFİK BULGULARI:.....	48
5. TARTIŞMA	60
6.SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	70
Onay	90

KISALTMALAR

İM:	İnvaziv Mantar
Ark:	arkadaşları
GM:	Galaktomannan
BG:	1,3 β -D Glukan
Rt PZR:	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EORTC:	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu
MSG:	Mikoz Çalışma Grubu
SDA:	Sabouraud Dekstroz Agar
AML:	Akut Myeloid Lösemi
ALL:	Akut Lenfoblastik Lösemi
KOAH:	Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
İA:	İnvaziv Aspergilloz
İK:	İnvaziv Kandidoz
İPA:	İnvaziv Pulmoner Aspergilloz
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
MR:	Manyetik rezonans
LA:	Latex aglutinasyon
ELISA:	Enzim temelli immünolojik yöntem
FDA:	Food and Drug Administration
GHS:	Göğüs Hastalıkları Servisi
DYBU:	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi

GCYBU:	Genel Cerrahi Yoğun Bakım
KİT:	Kemik İliği Transplantasyon
DNA:	Deoksiribonükleik asit
BAL:	Bronko alveolar lavaj
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
SDA:	Sabouraud dekstroz agar
AMP B:	Amfotersin B
PPD:	Pozitif Prediktif Değer
NPD:	Negatif Prediktif Değer

TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

Tablo1	Kesin invaziv maya enfeksiyonlarının doku kriterleri.	12
Tablo 2.	invaziv maya enfeksiyonu olasılığını artıran durumlar.	13
Tablo 3.	<i>Aspergillus</i> enfeksiyonlarının sınıflandırılması	20
Tablo 4.	Kesin invaziv küf enfeksiyonlarının doku kriterleri.....	26
Tablo 5.	İnvaziv küf enfeksiyonu olasılığını artıran durumlar	28
Tablo 6.	Hastaların servislere göre dağılımı.....	48
Tablo 7.	Hastaların klinik sınıflandırılması, alt hastalıkları ve laboratuvar bulguları	49
Tablo 8.	Kesin hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları ...	50
Tablo 9.	Yüksek olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulgular	51
Tablo10.	Düşük olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları	52
Tablo 11.	Hastaların klinik örneklerinde üreyen <i>Candida</i> ve <i>Aspergillus</i> türleri ...	53
Tablo 12.	BG testinin klinik dağılıma göre istatistik değerleri	53
Tablo 13.	BG testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri....	54
Tablo 14.	BG testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri	55
Tablo 15.	İA hastalarda BG testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri.....	56
Tablo 16.	İA hastaların örneklerinde GM bulguları ile BDG bulguları karşılaştırılması.....	58
Tablo 17.	İA hastaların örneklerinde GM ve PZR bulguları karşılaştırılması	58
Tablo 18.	İA hastaların örneklerinde BG ve PZR bulguları karşılaştırılması	59
Grafik 1.	BG testinde sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan grafik.....	41
Grafik2.	GM cut-off değerinin ROC eğrisi gösterilmiştir.....	55
Grafik3.	GM cut-off değerinin ROC eğrisi gösterilmiştir.....	57

ÖZET

SİSTEMİK MANTAR ENFEKSİYONU ŞÜPHELİ HASTALARIN KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE MANTARLARIN ARAŞTIRILMASI

Amaç: İnvaziv mantar enfeksiyonu (İME) özellikle hematolojik malignitesi olan hastalarda önemi giderek artan mortalite ve morbitide sebebidir. Erken tanı ve etkili antifungal tedavinin başlatılması hastaların prognozunu etkileyebilir.

Kültür dışı tanı testleri geleneksel yaklaşımlara yardımcı olabilir. Bundan dolayı çoğu araştırmacı çabaları serolojik ve moleküler tanı yöntemleri üzerine odaklanmıştır.

Bu çalışmada İME’da kültür, galaktomannanın (GM), 1,3 β -D glukon (BG) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rtPZR) yöntemlerinin tanı potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Nisan 2009-Eylül 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri kliniklerinde takip edilen İM enfeksiyonu şüpheli 89 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. İM hastalığı Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu ve Mikozi Çalışma Grubu (EORTC/MSG) kriterlerine göre sınıflandırıldı. Mantar antijeni serum örneklerinde GM ve BG yöntemleri ile araştırıldı. Serum örneklerinden deoksiribonükleik asit (DNA) belirlenmesi için rtPZR uygulandı. Klinik örnekler kültür ve direkt mikroskopi ile değerlendirildi.

Sonuçlar: Bu çalışmada 10 invaziv kandidoz (İK), 42 invaziv aspergilloz (İA) ve 37 kontrol hastasını içeren 89 hasta analiz edildi ve EORTC/MSG kriterlerine göre 3 kesin IA, 10 yüksek olasılıklı IA, 29 düşük olasılıklı IA ve 10 kesin İK olarak sınıflandırıldı. BG (cut-off 80 pg/ml) testinin duyarlılığı %80, özgüllüğü %77, pozitif prediktif değeri (PPD) %84, negatif prediktif değeri (NPD) %73 olarak bulundu. Bununla birlikte yüksek cut-off değerleri özgüllüğü yükseltirken duyarlılığı

kabul edilemez sınırlara gerilettiler. İME olmayan 8 hastanın en az bir serum örneğinde BG değeri 80 pg/ml üzerinde saptandı.

İA'lu 3'ü kesin, 10'u yüksek olasılıklı, 29 düşük olasılıklı 42 hasta vardı. İA tanısı için *A.fumigatus* PZR, GM, BG duyarlılıkları sırasıyla %30, %47, %78 özgüllükleri ise %86, %89, %78 olarak bulundu. BG testi İA tanısını saptamada en duyarlı test olarak bulundu. GM testi ile beş kontrol hastası ve *Aspergillus fumigatus* PZR testi ile beş kontrol hastası pozitif bulundu.

BG ve GM testinin birlikte kullanılması duyarlılığı %83'e yükseltip özgüllüğü %72'ye düşürmüştür. İA tanısı için GM, BG ve PZR testlerinin birlikteliği duyarlılığı geliştirdi. İK'lu 4 hastada *C.albicans* PZR testi pozitif. Kanıtlanmış İK hastalarda *C.albicans* PZR testinin duyarlılığı, özgüllüğü pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) sırasıyla %44, %81, %36, %85 olarak bulundu. Yedi Kontrol hastasının test sonucu *C.albicans* PZR ile pozitif olarak saptandı

Tartışma: İME'da farklı tanı yöntemleri ve bu yöntemlerin optimal kombinasyonlarının performansını değerlendirmek için daha fazla çalışma gereklidir.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, *Candida*, 1,3 β -D-glucan (BG), real time polimeraz zincir reaksiyonu (rtPZR), galaktomannan (GM), kültür, direkt mikroskopi, invaziv aspergilloz (İA), İnvaziv kandidoz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FUNGI FROM CLINICAL SPECIMENS OF PATIENTS WITH SUSPECTED SYSTEMIC FUNGAL INFECTION BY VARIOUS METHODS

Invasive fungal infections (IFIs) are an increasingly important cause of morbidity and mortality particularly in patients with hematological malignancies. Early diagnosis and the initiation of efficacious antifungal treatments could affect the prognosis of these patients. Nonculture-based diagnostic tests may provide a useful adjunct to these more traditional approaches. Therefore most investigative efforts have focused on molecular and serological diagnostic techniques.

In this study, it was aimed to evaluate the diagnostic potential of culture, the galactomannan (GM), 1, 3 (β -D-glucan (BG) and real-time PCR assay for IFIs

Materials and methods: Various clinical specimens of the 89 patients with suspicious IFIs treated in Erciyes University Medical Faculty Hospitals (Kayseri, Turkey) clinics between April 2009 and September 2010 were included in this study. IFIs were classified according to the criteria of the European Organization for Research and Treatment of Cancer /Mycoses Study Group (EORTC/MSG). Fungal antigen was investigated in serum specimens by double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for GM (Platelia Aspergillus, BioRad, France) and an assay for BG (Fungitell; Associates of Cape Cod). Deoxyribonucleic acid (DNA) was investigated by real-time polymerase chain reaction (rtPCR) (light-cycler Roche diagnostics, Australia) in serum specimens. Clinical specimens were examined by culture and direct microscope.

Result: In this study it was analyzed 89 patients including 52 patients with IFIs and 37 control patients. According to the EORTC/MSG criteria, 3 patients were classified as having proven invasive aspergillosis (IA), 10 as probable IA, 29 as possible IA, and 10 as proven invasive candidiasis (IC). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of BG (cut-off value 80 pg/ml) were 80%, 77%, 84%, 73% respectively. Although higher cut-off

levels increased the specificity of the BG test, sensitivity decreased to an unacceptable level. BG value in at least one serum sample of eight patients without IFIs were >80pg/ml.

There were 42 IA cases (3 proven, 10 probable, 29 possible). The sensitivities of PCR *A.fumigatus*, GM, and BG measurement for diagnosis of IA were 30%, 47%, and 78 %. The specificities were 86%, 89%, and 78% respectively. BG was the most sensitive at predicting the diagnosis of IA in high-risk patients with hematological disorders. Five control patients test results were detected positive by GM test and five control patients were detected positive by *Aspergillus* PCR.

The use of a combination of the BG and the GM assay increased the sensitivity to 83%, decreased the specificity to 72%. For the diagnosis IA, a combination of GM, BG and PCR tests improved the sensitivity.

C.albicans PCR test was positive in four IC patients. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values *C.albicans* PCR test in patients with proven IC were : %44, %81, %36, % 85 Seven control patients test result were positive detected by *C.albicans* PCR.

Conclusion: The further studies are required to compare the performance of different diagnostic methods and the optimal combination of these methods in IFI.

Key Words: *Aspergillus*, *Candida* 1,3 β -D-glucan, polymerase chain reaction (PCR), galactomannan (GM), culture, direct microscopy, invasive aspergillosis, invasive candidiasis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantar enfeksiyonları günümüzde özellikle nütropenik hastalarda en önemli mortalite sebepleri arasındadır (1). Hematolojik kanser olgularında uzun nütropeni süresi ve önceden mantar enfeksiyon ve/veya kolonizasyon öyküsü olan yüksek riskli hasta gruplarında sistemik mantar enfeksiyon gelişme riski % 15-25'dir (2,3). Gelişen mantar enfeksiyonların %90 'ından fazlasında *Candida* ve *Aspergillus* türleri etkindir (4). Ancak *Trichosporon*, *Pseudallescheria*, *Fusarium*, *Scedosporium* türlerine bağlı nadir görülen mantar enfeksiyonlarında da artış gözlenmektedir (5).

Nütropenik hastalarda *Candida* enfeksiyonlarında mortalite %33-%75 (6,7) ve *Aspergillus* enfeksiyonlarında özellikle çocuk hastalarda %85 yetişkin hastalarda ise daha yüksek düzeylerde seyredabilmektedir (8,9). Yapılan çalışmalarda nütropenik hastalarda mantar enfeksiyon tanısı ne kadar erken konursa ve tedaviye erken başlanırsa prognozun o kadar iyi olacağı bildirilmiştir (10,11).

İnvaziv mantar enfeksiyonlarında (İME) tanı genelde klinik bulgularla laboratuvar sonuçlarının birleştirilmesine dayanır. Klinik tanıda kullanılan kültür gibi klasik yöntemler altın standart kabul edilip tanıdaki önemini korumaktadır. Ancak hematolojik malignitesi olan hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması, trombositopeni gibi nedenlerle invaziv tanı yöntemlerinin yeterince uygulanamaması ve kültür sonuçları çıkana kadar geçen süre tedavide önemli gecikmelere yol açmaktadır. Bu nedenle erken tanı için geliştirilen testler özellikle kritik hastalarda tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Serolojik ve

moleküler yöntemlerle mantar antijen ve DNA'nın saptanması tanıda önemli gelişmelere neden olmuştur (12).

Bu çalışmada, sistemik mantar enfeksiyonu düşünülen hastaların klinik örneklerinde kültür, galaktomannan (GM) ve beta glukan (BG) antijeni ve real time polimeraz zincir reaksiyonu (rtPZR) yöntemleri kullanılarak mikrobiyolojik tanımlamanın değerlendirilmesi amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

Mantarlar gerçek çekirdeğe sahip ökaryotik mikroorganizmalardır. Klorofil içermemeleri ile yüksek bitkilerden ayrılırlar. Ayrıca hücre duvarında bulunan kitin, mantarın bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmasını sağlar. Hücre duvarında peptidoglikan, gliserol, lipopolisakkaritleri içermez. Bunların yerine mantar hücre duvarında kitin, mannanlar, glukanlar ve diğer kompleks yapılar bulunur. Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Küfün temel yapı birimi hif olarak adlandırılan tübümsü yapılardır. Bunlar kalın, paralel duvarlı tüp benzeri hücre uzantılarıdır. Hif topluluğuna miçel denir. Mayalar tek hücreli mantarlardır. Tomurcuklanma (blast formasyonu) veya füzyon (ortadan ikiye bölünme) ile çoğalırlar. Yavru hücreye blastokonidyum adı verilir. Küf ve maya formu dışında bazı türler ise çevre şartlarının durumuna bağlı olarak iki şekilde üreyebilirler. Dimorfik mantarlar olarak adlandırılan bu mantarlar; doğal ortamda ve oda ısısındaki besiyerinde küf, *in vivo* ve 35-37 ° C 'de maya şeklinde ürerler (13).

2. 1. *CANDIDA* TÜRLERİ

2. 1. 1. *CANDIDA* Türlerinin Sınıflandırılması

Candida ismi 1959'da Montreal'de 'Uluslararası Botanik Kongresinde' *Basidiomycota* 'ya ait olanlar ayrı tutularak *Ascomycota* içine alındı. Bu aileye giren *Candida* türleri içinde en sık etken *C. albicans* olup, *C. tropicalis*, *C. glabrata*,

C.parapsilosis, *C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.dublinsiensis*, *C.guilliermondii* gibi diğler 200 tane türü de içerisine almaktadır (14).

Candida türleri *Ascomycota* şubesinde *Hemiascomycetes* sınıfında *Saccharomycetales* ordusunda ve *Candidiaceae* ailesinde bulunur (15).

2. 1. 2. *CANDIDA* Türlerinin Epidemiyolojisi

Başlıca kolonizasyon bölgesi ağızdan rektuma kadar olmak üzere gastrointestinal kanaldır. Ayrıca vajına ve üretrada, deride, el ve ayak tırnaklarının altında da kommensal olarak bulunabilirler. İnsanda en sık enfeksiyon yapan *C. albicans* türüdür (16). Sağlıklı insanların normal ağız florasında en sık *C.albicans* türü izole edilmektedir.

AIDS hastalarında *Candida* enfeksiyonları mortalitenin önemli nedeni olup, prototipik belirtisi mukokutanöz kandidozdur. Bu gruptaki hastalarda %41.8 oranında *Candida* orofarenjit ve % 9.4 oranında *Candida* özofajit görülmektedir. HIV enfeksiyonlu kadınlarda aynı zamanda *Candida* vaginitide önemli bir problemdir (17). Bunun yanında parenteral beslenme sıvıları ve tıbbi cihazlar mayalarla özellikle *C.parapsilosis* ile kontaminasyonuna açıktır (18).

2. 1. 3. *CANDIDA* Türlerinin Genel Özellikleri

Candida türleri sistemik enfeksiyon etkenleri arasında görülen en sık etkenlerden birisidir. Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyon oluşturmaktadır (3).

2. 1. 3. 1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri;

Tüm *Candida* türleri tomurcuklanır veya blastokonidyumlar oluşturan oval maya benzeri hücreler şeklinde bulunurlar. *C.glabrata* dışındaki *Candida* türleri yalancı hif ve gerçek hif oluşturlar. Ayrıca *C. albicans* germ tüp ve terminal yerleşimli kalın duvarlı klamidospore oluşturun (19). *Candida* türleri Gram boyama ile boyanırlar ve Gram olumludur (20). Bunun yanında floresan boyalardan potasyum hidroksit – kalkoflor beyazı ile boyanabilir. Kalkoflor beyazı maya hücre duvarındaki kitin ve

selüloza nonspesifik bağlanarak yeşilden maviye değişen renklerde florasın verir (21).

2. 1. 3. 2. *Candida* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri;

Türleri ayırt etmek için karbon asimilasyon ve ender olarak fermantasyon testlerine ihtiyaç duyulur. *Candida* türleri genellikle üreaz negatiftir fakat *C.lypolytica* ve *C.krusei* üre pozitifdir. KNO_3 asimilasyonu yapmazlar (22).

2. 1. 3. 3. *Candida* Türlerinde Patogenez

Normal florada bulunan *Candida* türleri bir hastalık yada tedavi girişimleri nedeniyle immün sistemi bozulmuş kişilerde dokuları istila ederek yaşamı tehdit eden patolojilere neden olmaktadır. *C.albicans* hemen hemen tüm kandidoz formları içinde en sık görülen türdür (16). *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde konağın savunma mekanizmaları da rol oynar. Konağın savunma mekanizması yetersiz kaldığında *Candida* enfeksiyonları artmaktadır.

2. 1. 3. 4. *Candida* Türlerinde Virülans Faktörleri;

Candida türlerinin virülansı enfeksiyon oluşturmada en önemli faktörlerdendir (23).

-Adherans: *Candida* türlerinin mukoza epitelyum ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonunda ilk aşamasıdır (24). Maya hücreleri ile epitel hücrelerinin yüzey lipidlerinin ve glikolipidlerin de yapışma olayında rollerinin olabileceği bunların giderildiği deneylerde bağlanmanın %48-54 azaldığı öne sürülmüştür (25).

-Germ tüp oluşumu; Germ tüp oluşturan mayaların yapışma yeteneğinin daha fazla olduğunu ve dolayısıyla daha fazla patojen olduğu düşünülmektedir.

-Dimorfizm; *C.albicans* kültürde tomurcuklanan ve yalancıhif nadirde olsa gerçek hif yaparak üreyen dimorfik bir mayadır (26). Patojenitede dimorfizm üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

-Enzimler; Proteinazlar ve fosfolipazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Proteinazlar *C.albicans*, *C.tropicalis* gibi en patojen türlerden salgılanmaktadır. Fosfolipazlar ile mukoza epitelyum hücrelerine yapışmada korelasyon bulunmaktadır. Hidrolitik enzimlerden fosfolipazlar membran fosfolipidlerini, asit proteinazlar salgısal IgA'yı parçalayarak epitelyum hücrelerine yapışmada rol oynar (27).

-Slime faktör; Bir kısım *Candida* türlerinde insan vücudunda yapışmaya uyum sağladıklarında *in vivo* katı yüzeylere yapışma ve kalınlığı birkaç milimetreye varan hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluşturma özelliklerinin bulunduğu bu yapışmanın özgün olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu biyofilm damar içi kateter veya protez uygulamalarında enfeksiyona yol açmaktadır (28). Bu yabancı cisim fibronektin laminin gibi yapılarla kaplanır ve mikroorganizmalar konağın bu matriks proteinlerine yapışırlar burada hücre dışı matriks salgılayabildiklerinde yüzeye yapışan, çoğunlukla polisakkarit yapısında bir biyofilm oluşmaktadır (29).

-Fenotipik değişim; *C.albicans* türlerinin %2-4 kadarı beyaz –opak sıçrama sistemine sahiptir. Belirli kökenlerde opak ve beyaz fenotip arasında sıçrama göstermektedir. Bu özellik hücre ve koloni yapısı olarak fark edilebilmektedir. Beyaz fenotipte düzgün yüzeyli S koloniler ve opak fenotipte geniş yüzeyli, yassı R koloniler bulunmaktadır. Mannan antijenik yapı olmasının yanı sıra virülansta da rol oynar. Kronik mukokutanöz kandidozda hücresel bağışıklığı inhibe eder. Geç tip aşırı duyarlılığı baskılar ve kronik kandidozda mannan metabolitleri IL-1, IL-2 ve TNF aktivitesini etkiler (30).

Sonuçta *Candida* türlerinin mukoza yüzeyine yapışma, çoğalma *C.albicans* olgularında germ tüp oluşumu patojeniteye karışır ve enzimlerin üretimi sayesinde doku hasarı ve invazyon gibi olaylar gerçekleşir.

2.1.4. CANDIDA Türlerinin Klinik Önemi

Candida türleri uygun ortam olduğu müddetçe pek çok enfeksiyona neden olabilmektedirler. Bu enfeksiyonlar yüzeysel mukoza enfeksiyonu ve kutanöz kandidozdan karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyin gibi bölgelerde olabilmektedir. *Candida* türlerine bağlı mukoza enfeksiyonları orafarinkse sınırlı

kalabileceği gibi özefagus ve tüm gastrointestinal kanala da yayılabilmektedir. Deri yüzeyinin kapalı olduğu bölgelerde yerel deri enfeksiyonu oluşturmaktadır. Ayrıca florada bulunan *Candida* türleri onikomikoz ve paranişiyede sebep olmaktadır (31). Kronik mukokütanoz kandidoz ender görülen T-lenfositlerin *Candida* türlerine yetersiz yanıtı sözkonusudur (32). Saçlı deri, ayaklar yüz öncelikli olmakla birlikte bazen tırnak ve parmak uçlarını da tutan bir enfeksiyondur.

İnvaziv kandidoz (İK) sistemik enfeksiyondur. Bu enfeksiyonun oluşmasında geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı sonucu aşırı miktarda çoğalma ve kolonizasyon, radyoterapi ve kemoterapiye bağlı mukozit ve cerrahi travma, uzun süreli kateterlerin neden olduğu mukoza ve cilt bütünlüğünde bozulma, immün fonksiyonlarda bozulma gibi faktörler rol almaktadır (33). Hematojen kandidemiler üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar kandidemiler, akut dissemine kandidemiler ve kronik dissemine kandidemilerdir. Kandidemi kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir ya da daha fazla kan kültüründe kandida üremesi demektir. En sık rastlanan belirtisi yüksek ateştir. Akut dissemine kandidemi fulminant bir enfeksiyondur ve genellikle tedaviye direnç gösteren bir ateş vardır. En sık komplikasyonu menenjit , beyin apsesi, renal apse, miyokardit, endokardit, endoftalmit, kutanoz apselerdir (34-36). Kronik dissemine kandidemiler ise çoğunlukla lösemili hastaların nötropenik döneminde ortaya çıkar herhangi bir organ tutulumu belirtisi olmayabilir ancak ısrarcı ateş vardır. Nötrofil sayısı normale dönse bile ateş ve kilo kaybı devam eder. Karaciğer ve dalak büyüyebilir alkalen fosfataz genellikle çok yüksek olup tomografide çoklu lezyonlar görülmektedir (37).

Daha nadir görülen durumlardan biri de gastrointestinal kandidozdur. Daha çok kanser hastalarında ve AIDS hastalarında sıklıkla görülmektedir. Kandidüri için risk faktörleri ise geniş spektrumlu antibiyotik ve kortikosteroid kullanımı, nötropeni, diabetes mellitus, üriner kateter, nefrostomi ve radyoterapi tedavisidir (38). Kandidüriye en sık etken *C.albicans* iken *C.parapisilosis* ve *C glabrata*'da son yıllarda etken olarak bildirilmektedir (39).

2.1.5. Tanı Yöntemleri

Sistemik mantar enfeksiyonlarında tanı Avrupa'da EORTC (Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu) ABD'de ise MSG (Mikoz Çalışma Grubu)'nin oluşturduğu kriterlere göre radyolojik laboratuvar ve klinik kriterlerin skorlanmasına göre konulmaktadır.

2. 1. 5. 1. Laboratuvar Tanı Yöntemleri

-Direkt Mikroskopik İnceleme;

Klinik örnek kültürü yapılmadan önce direkt mikroskopik incelemesi yapılarak laboratuvar çalışanına ve klinisyene ön tanıda yardımcı olunur. Direkt incelemede ilk aşamada %30 'luk potasyum hidroksit (KOH) kullanılarak mukoid salgılardaki, deri tırnak ve kıldaki mantarlar ayırt edilir. Vücut sıvısının direkt inceleme yapılmadan önce santrüfüjlenilmesi gerekmektedir. Mikroskopik inceleme direkt yapılabildiği gibi Gram ve kalkoflor gibi boyalarıyla da yapılabilmektedir (13).

Direkt mikroskopik incelemede mayanın büyüklüğüne, tomurcuk yapıp yapmadığı morfolojisi ve sayısı, kapsülü olup olmadığı, hücre duvarının kalınlığı, yalancı hiflerin varlığı, artrakonidyum varlığına bakılmalıdır.

-Kültür;

Tüm örnekler Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerine ekilerek 25°C ve 37°C inkübe edilir. Saprofitler yüksek ısı derecelerinde üreyemezler (21). SDA 'da saf kültürde üreyen mantarlar mısır unu Tween 80 besiyerine ekim yapılarak lam kültürlerinin direkt mikroskopisine göre yalancı hif ve/ veya gerçek hif yapıp yapmadıkları blastokonidyumların büyüklüğü şekli ve dizilimleri, klamidospor oluşturup oluşturmadıklarına bakılır (13,21). *C.albicans* tanısı germ tüp testi ve klamidosporlarla kesinleştirilebilir fakat *C. dubliniensis* suşlarının da klamidospor oluşturduğu unutulmamalıdır (40).

Mayaların besiyerlerinde gösterdiği farklı morfolojik yapılarda tanıda yardımcıdır. Glikozlu Sabouraud buyyonu veya malt ekstresi sıvı besiyerlerinin yüzeyinde zar

oluşturarak üreme özelliği *C. tropicalis* ve *C.krusei* türlerinin identifikasyonunda yardımcı olarak kullanılırken *C. albicans* kanlı agarda yıldızimsı görüntüler oluşturur (41).

Bir diğer besiyeri CHROM agar kullanılarak *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* türlerinin oluşturdukları koloni rengine göre tanımlama yapılabilir (42).

-Germ Tüp

C. albicans suşlarının hızlı ön identifikasyonu için kullanılan en değerli ve basit testlerden biri germ tüp testidir. Test tecrübeli bir laboratuvar çalışanı tarafından yapılsa bile düşük oranda yalancı pozitiflikler görülebilmektedir (43,44). Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* 2-3 saat serumda bekletildikten sonra mikroskopik incelenmesinde maya hücrelerinden direkt olarak oluşan ve kısa bir hif başlangıcı olan germ tüpler maya hücresiyle birleşim bölgesinde boğumlanmanın olmaması ile yalancı hiflerden ayrılmaktadır.

-Karbohidrat asimilasyon testi;

Mayaların tür düzeyine kadarki identifikasyonunda esas dayanak noktası karbohidrat asimilasyon testidir. Bu test mayanın oksijen varlığında belli bir karbohidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer. Wickerman ve Burton yönteminin yerini pek çok ticari kit almıştır. Bunlar API 20C AUX, API ID 32C ,BBL Minitex Yeast Set'dir (13,45).

-Üreaz Testi

Üreaz testi mayanın üreaz enziminin olup olmadığını anlamak için yapılan bir testtir. Uygun substrat varlığında üreaz üreyi parçalayıp amonyak oluşturur ve amonyakta pH yı yükselterek fenol kırmızısı indikatöründe koyu sarı renkten pembemsi sarı renge dönüşmektedir. Üreaz testi üreaz pozitif olan *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* türlerinin tanımlanmasında kullanılır. *Candida* türlerinde ise üreaz pozitif olan *C.lipolytica* ve *C.krusei* nin tiplendirilmesinde kullanılan bir testtir (46).

-Fenol Oksidaz Testi:

Fenol oksidaz tarama yöntemi *C.neoformans*'ın kafeik asit içeren ortamlarda fenol oksidaz oluşturma yeteneğini saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Mayalar L-dopa L-dopamin, klorojenik asit ve kafeik asit gibi bileşikler ihtiva eden besiyerlerinde üretiltiklerinde substrata bağlı olarak beş gün içinde substrata bağlı olarak koyu kahve siyah renkli koloniler oluşturlar (21).

-Serolojik Testler

İK enfeksiyonlarının bulgu ve semptomları bakteri enfeksiyonlarına benzediği için hızlı tanı için ve kültür dışı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

-Beta Glukan

Mantar hücre duvarının özgün yapısı mantar serolojik testi için uygun hedeftir BG *Candida* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere bir çok maya ve küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür (47). Denizde yaşayan ve Horseshoe crab olarak bilinen ve bir canlıdan izole edilen Faktör G Beta glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon verir. BG testi bu kimyasal etkileşim sonucu ortaya çıkan bir testtir (48,49). Hastaların düzenli serolojik takiplerinde klinik olarak mantar enfeksiyon tanısından ortalama 4-12 gün önce testin pozitifleştiği gösterilmiştir. Testin pratikte bakılması uzun sürmemektedir ve 5µl serum test için yeterlidir. Testin dezavantajı sayılabilecek nokta ise mantar enfeksiyonların tanısı açısından belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır. Hücre duvarında beta glukan düzeyi çok düşük düzeyde olan *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* enfeksiyonlarında test negatif sonuç vermektedir (50). BG testinde diğer serolojik yöntemlere göre yalancı pozitiflik oranları düşüktür. Bu test ile meydana gelen yalancı pozitiflik sebebi selüloz, hemodiyaliz membranları, bazı immünglobülün preperatlarıdır (51,52). İK düşünülen cerrahi yoğun bakım bölümünde yatan 57 hastanın serumunda BG testi çalışılmış ve testin duyarlılığı %87 ise özgüllüğü %73 bulunmuştur (53). Kan kültürü pozitif 15 pediatrik hastada yapılan bir çalışmada BG test sonuçları ile kültür sonuçları uyumlu olmasına rağmen pediatrik hastalarda da BG testinin diğer mikrobiyolojik testlerle desteklenmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (54).

Mannan; *Candida* türlerinin hücre duvar komponentidir. Enfeksiyon sırasında dolaşıma geçtiği için tespit edilebilmektedir. (30,55). Hematolojik malignitesi bulunan 453 hastada yapılan bir çalışmada testin duyarlılığı%58, özgüllüğü ise %93 olarak saptanmıştır (56).

-Moleküler Testler

Moleküler testler günümüzde İK enfeksiyonlarının tanısından ziyade araştırma ve epidemiyolojide kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Moleküler testlerden en önemlisi PZR'dır ve testin temeli mantar DNA yapılarını tespit etmeye yöneliktir. Pratikte henüz kullanıma girmiş standart bir PZR protokolu yoktur. *Candida* ve *Aspergillus* gibi belli bir mantar türüne ait primerler aracılığı ile hasta serum, BAL ya da dokuda fungal enfeksiyon araştırmaları yapılmaktadır (57). Enfeksiyona sebep olan *Candida* suşlarının tür tayininde kullanılan rtPZR'larla yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (58). Özer ve arkadaşları simüle kan örneklerinden 5S rDNA'nın çoğaltıldığı PZR ile kan kültürü karşılaştırmalı çalışmalarında PZR'ın *Candida* DNA'sını daha hızlı tespit ettiğini ve bu yöntemle daha erken tanıya gidilebileceğini bildirmişlerdir (59). Son zamanlarda geliştirilen rtPZR yöntemi ile mantar yük miktarının hassas bir şekilde gösterilmesi sağlanmıştır (60,61). Bir diğer çalışmada 33 hastanın serumu TAQ-MAN PZR testi ile çalışılmış örneklerde %2,9 oranında *Candida* DNA'sı saptanmıştır. İnvaziv mantar enfeksiyonların tanısında PZR'ı kullanıma sokmadan önce standardize edilmesi gerektiği bildirilmiştir (62). Fakat bu testlerin tanıda erken ve özgül olarak sonuç vermesinden dolayı klinikte tamamlayıcı test olarak kullanılabileceği çalışmalarla rapor edilmiştir (63).

2.1.5. 2.Klinik ve Radyolojik Tanımlama

Mantar enfeksiyonlarda mücadelede karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi elde yeterli veri olmadan uzamış ateşi olan nütropenik bir hastada maliyeti yüksek olan ve yan etkileri fazla olabilen antifungal ilaçları başlamak. ABD ve Avrupa'da ampirik antifungal tedavi alanların ancak %20-25'i gerçek anlamlı İM enfeksiyonu vardır. Bu sebeplerden dolayı 2000 yılında Avrupa'da bir grup ve Amerika'dan bir grup bir araya gelerek klinik araştırmalarda ortak dil konuşulmasını sağlamak için bir uzlaşma metni oluşturmaya karar verdiler. Bu grubun Avrupa tarafını

EORTC(Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu) ABD tarafını ise MSG (Mikoz Çalışma Grubu) oluşturmaktadır. Çeşitli toplantıların ardından 2002 yılında EORTC/MSG İME tanımları yayınlandı (64). Bu tanımlar 2008 yılında yenilendi ve etken maya ise invaziv maya enfeksiyonu üç grupta sınıflandırıldı (65).

1-Kesin

2-Yüksek olasılıklı

3-Düşük olasılıklı invaziv maya enfeksiyonu .

-KESİN İNVAZİV MAYA ENFEKSİYONU

Doku faktörlerinin varlığı kanıtlanmış invaziv maya enfeksiyonların tanımı için yeterlidir. Tanım gereği konak faktör ve klinik faktörlerinde yüksek oranda birlikte olması beklenir. Kesin maya enfeksiyonu doku kriterleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo1. Kesin invaziv maya enfeksiyonlarının doku kriterleri. (65).

MAYALAR

-Maya veya yalancıhif gösteren mukoza dışı alanların biyopsi /iğne aspirasyonu

-Normalde steril olan ancak klinik veya radyolojik olarak enfeksiyonla uyumlu

anormal bölgeden alınan kültürden maya üretilmesi

-Uyumlu klinik bulgu ve belirti olanlarda kan kültürlerinde maya üretilmesi

-YÜKSEK OLASILIKLI MAYA ENFEKSİYONU

En az bir adet konak faktör yanında bir adet mikrobiyolojik ve bir adet klinik kriterin olması

-DÜŞÜK OLASILIKLI MAYA ENFEKSİYONU

En az bir konak faktör yanında mikrobiyolojik kanıt olmaksızın klinik kriterlerle desteklenmesidir.

EORTC/MSGN metnine göre invaziv maya enfeksiyonu olasılığını artıran durumlar

1-Konakçı faktörler

2- Klinik faktörler

3- Mikrobiyolojik faktörler olarak incelenmiştir.

Tablo 2. İnvaziv maya enfeksiyonu olasılığını artıran durumlar.

KONAK FAKTÖR

Kök hücre alıcılar

10 gün yada daha uzun nötropeni($<0.5 \times 10^9$ n/L <500 n/mm³)

Uzun süreli kortikosteroid(3 haftadan fazla 0.3mg /kg üstü prednizolon kullanımı)

Son 90 günde T hücre baskılayıcılarının kullanımı(cyclosporine, TNF alfablokörü, monoklonol antikörler veya nükleozid analogları)

Hereditör ciddi immün yetmezlik (Kronik granülamotöz hastalık vb...)

KLİNİK FAKTÖRLER

Trekeabronsit

Trekeabronşial ulserasyon nodule, psodomembran plak, bronkoskopik analizde eskar görülmesi

MSS enfeksiyonları

Meningeal fokal lezyonlar Manyetik rezonans (MR) görüntülemeve BT 'de değişiklikler.

Dissemine kandidoz; Karaciğer ve dalakta küçük apseler

Oftalmolojik örneklemede retinal eksuda

MİKROBİYOLOJİK FAKTÖRLER:

Serolojik:1,3 beta glukan serumda

2.2. ASPERGILLUS TÜRLERİ

2.2.1. *Aspergillus* Türlerinin Sınıflandırılması

Aspergillus türleri mantarlar (fungi, kingdom) aleminde Ascomycota bölümünün Euoscomycetes sınıfının Eurotiales takımının Trichocomaceae ailesinde Emericella, Eurotium ve Neosartorya telemorf formları olan 200'e yakın tür içeren bir genustur. (66). Bakterilerde olduğu gibi *Aspergillus*'larda cins ve tür ismini alarak iki sözcük halinde adlandırılmaktadır. İlk sözcük cins (genus) adı olup büyük harfle başlar, ikinci sözcük ise tür (species) adı olup küçük harflerle yazılır. Hem cins hem de tür adları italik yazılmaktadır.

2.2.2. *Aspergillus* Türlerinde Epidemiyoloji

En sık invaziv aspergilloz (İA) etkeni *A. fumigatus*'tur. Daha az sıklıkta ise *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*'dır (67). *Aspergillus* türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler bunlar olgunlaştıklarında ortama yayılmaktadır. Konidyumlar genelde 2-5 mikro çapındadır.

Konidyumlarla havadan bulaş olabileceği gibi su yoluyla da bulaş olabilir. *A. fumigatus* hastane suyu kültürlerinden ve hastanedeki duş başlıklarından da izole edilmektedir (68). İstanbul'da yapılan bir çalışmada ise 110 evin iç ortamındaki alerjen küf florasının araştırılmış 748 küf kökenin 115 'nin *Aspergillus* cinsine ait türlerden oluştuğu ortaya konmuştur (69). Sağlık kurumlarında sıklıkla karşılaşılan *Aspergillus* salgınlarına yol açtığı düşünülen kaynaklar arasında yetersiz çalışan havalandırma sistemleri, hava filtreleri, bina içi inşaat, vakumlu temizlik sistemleri gelmektedir. Hastane içinde veya yakınında inşaat çalışmalarının bulunması, nötropenik hastalarda nozokomiyal aspergillozun görülmesine neden olur. Tipik olarak IA insidansı hematolojik maligniteli hastalarda özellikle akut myeloid lösemili (AML) hastalarında % 5 civarındadır ve özellikle kök hücre nakli yapılmış hastalarda bu insidans %15'e kadar yükselmektedir (70). Yapılan bir diğer çalışmada granülositopenik, kemik iliği veya solid organ taransplantlı veya kortikosteroid alan hastaların alt solunum yolu örneklerinin yaklaşık 2/3'ünde *Aspergillus* türlerinin izolasyonundan söz edilmektedir (71).

2.2.3. *ASPERGILLUS* Türlerinin Genel Özellikleri

Aspergillus tür düzeyinde sınıflandırılmasında makroskopik (koloni özellikleri) ve mikroskopik (hif yapısı , dallanma şekli, askus yapıları) morfolojileri yaşam siklusları, üreme şekilleri (eşeyli, eşeysiz) hücre duvar polisakkaritleri, metabolizmaları, vitamin gereksinimleri, enzim üretimi, mikotoksin üretip üretmedikleri), üreme parametreleri (ısı, Ph,) antijenleri gibi çeşitli fenotipik özellikleri dikkate alınmaktadır.

2.2.3.1.Makroskopik özellikleri;

Koloniler genellikle hızlı gelişirler. Renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, kırmızıdır. Konidyoforların sıklığından dolayı keçemsi görünüme sahiptir. Koloni rengi daima vegetatif hiflerin konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır (72).

2.2.3.2.Mikroskopik morfolojisi :

Aspergillus türleri hifler ve sporlar yardımıyla aseksüel ve seksüel olarak ürerler. Ancak seksüel üreme fazını laboratuvarlarda göstermek kolay olmadığından tanımlanma besiyerinde üreme olduktan sonra küf ve konidyalar yardımıyla yapılmaktadır.

-*Aspergillus* türlerinde aseksüel tanımlama;

Konidya: Tek hücreli bölmesiz düzgün ya da üzeri desenli şekilli, şeffaf ya da renkli aseksüel evrede üremeyi sağlayan yapıdır. Tek dizilimli ya da çift dizilimli konidyal başa sahip iki farklı türü vardır (73).

Konidyofor: Konidi üreten hücreleri taşıyan özelleşmiş yapıya konidiyofor (fertil hif) denilmektedir. Rengi ve yüzeyinin düz, tırtıklı olması septalı ve septasız olması, konidiofor uzunluğunun farklı olması türden türe farklılıklar gösterir.

Vezikül: *Aspergillus* türlerinin konidyoforu düzenli bir yapılanma içerisindedir. Burada taşıyıcı bir ayak hücresinin üzerinde bulunan sapın tepe kısmında oluşan şişkin kısma vezikül adı verilir.

Fiyalid: Vezikülü kısmen veya tamamen örten dar boyunlu şişecik biçiminde ki yapılardır. Fertil hif de denilir. Veziküle bitişik olan fiyalidlerin tek sıralı (uniseriate) veya çift sıralı(biseriate) dizilimleri, türden türe değişiklik gösterir.

Sterigma: Fialid yerine kullanılan bir başka terminolojidir. Tek sıra dizilimli yapılarda birincil sterigma (metula), çift sıra dizilimli yapılarda ise ikincil sterigma konidiya oluşumunu sağlamaktadır.

2.2.3.3. Antijenik Özellikleri:

-Galaktomannan

Mantar hücresinin duvarında bulunan galaktomannan (GM) *Aspergillus* türleri için spesifik ve ekzoantijen olarak da hücre dışına salgılanabilen bir polisakkarittir. Bir çekirdek (mannan polimerleri) ve yan zincirlerden (galaktofuran polimerleri) oluşmuştur. Yan zincirde düz ve dallanmış iki yapı vardır. Düz yapı beta (1,5) galaktofuranoz ve beta (galaktopirinozdan) dallanmış yapı ise beta (1,5) ve (1,6) galaktofuranozdan oluşmuştur (74). GM antijeni arama testlerinde kullanılan monoklonal antikorlar, β -(1,5) galaktofuranoz epitopuna bağlanır. Lateks aglütinasyonu (LA), radyoimmünoassay (RAİ), enzimimmünoassay ve sandviç ELISA yöntemleri ile galaktomannan antijeni saptanır. Test esnasında kullanılan monoklonal antikor (sıçan kökenli, EB-A2) galaktomannan molekülünün galaktofuranoz epitopuna özgüdür. Bu yapı hem duvar yapısında hem de salgılanan galaktomannan antijeninde bulunur (75).

-Beta Glukan

Aspergillus ve *Candida* türleri başta olmak üzere bir çok maya ve küf mantarının hücre yapısında bulunan bir moleküldür. BG antijeni, denizde yaşayan ve Horseshoe crab olarak bilinen ve özellikle de *Tachypleus tridentatus* ve *Limulus polyphemus* canlılarının doğal immün sistemi tarafından tanınabilir. Bu canlılardan izole edilen faktör G, BG temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon oluşturur (76). BG antijenini saptamaya yönelik testler bu temele dayanabilir. Serumdaki BG seviyesi, İA ve diğer birçok fungal infeksiyonların erken safhalarında pozitifleşebilir (77,78).

2.2.3.4. Patogenez

Mantarların sahip olduğu virulans faktörleri ile konağın savunma mekanizmaları arasındaki karmaşık ilişkiler derin mikozların patogenezinde rol oynamaktadır. Virulans faktörler mantarın adezyonunu, kolanizasyonunu dissemine olmasını konak ortamında canlılığını sürdürmesini sağlar ve konağın bağışıklık yanıt mekanizmasını etkisizleştirmeye çalışır (79).

Mantarın gelişme hızı patogenezle ilgilidir. En hızlı gelişen tür *A. fumigatus* olup 37 °C çimlenme hızı besiyerine bağlı olarak 5-12 saattir (80). Konidyumlardaki hidrofobik protein tabaka sayesinde olağan dışı atmosfer koşullarına dayanabilmektedirler. *A. fumigatus* laminini ve fibrinojeni etkili biçimde bağlar ve invazyondan önce mantar elemanlarının konağın hava yollarına daha fazla adezyonunu sağlar. *Aspergillus* türlerinin bazı toksik molekülleriyle makrofaj ve nötrofil fagositozunun önlenildiği, enzimleriyle ise dokularda ilerlediği tespit edilmiştir.

Köpek, at kuşlarda da aspergilloz geliştiren *A. fumigatus* türlerinin bilinen bir bağışıklık yetersizliği bulunmaksızın insanda da enfeksiyon etkeni olabileceği saptanmıştır (67). Enfeksiyonun gelişmesinde konağa ait faktörlerde önemlidir. Burunda ve akciğerlerde *Aspergillus* türlerine karşı ilk immünolojik savunma konidyumları öldüren makrofajlar tarafından gerçekleştirilir. Hifler ise nötrofiller tarafından öldürülür monositler ve makrofajlarda bu işleme yardımcı olmaktadır. Kortikosteroidler makrofajların *Aspergillus* sporlarını , nötrofillerin ve mononükleer hücrelerinde hifleri öldürmesini bozar.

2.2.3.5. Virulans Faktör

Virulans faktörler mantarın konağa yerleşmesi ve enfeksiyon oluşturmada önemli faktörlerdir.

En önemli virulans faktörleri ;

-Sıcaklık toleransı; Bir kısım *Aspergillus* türleri 37°C üreyebilme yeteneğinden yoksundur. *A. fumigatus* ise 37°C üreyebilir ve 50°C kadar olan ısıyı tolere edebilmektedir (81).

- Yıkıcı enzimler; *A.fumigatus* enfeksiyon süreci içerisinde dokuda yayılımı sağlamak amacıyla alkalın serin proteaz, metalloproteaz, aspartik proteaz, elastaz ve fosfolipaz gibi litik enzimler salgılamaktadır (82). Enfeksiyonun oluşum sürecinde *Aspergillus*’un akciğer epiteline penetre olabilmesi en önemli basamaktır. Akciğerin dokusunun %30’u elastinden ve kollajenden oluşmaktadır. Bu nedenle elastinolitik ve kollajenolitik aktivite önemli rol oynamaktadır.

-Pigmentler; *A.fumigatus* konidyası 1,8-dihidroksinaftalen benzeri melanin içermektedir. Mantarın pigmentlerini oluşturan bu melanin, aynı zamanda patojenitede rol aldığı düşünülmektedir. Melanin pigmentinin mantarları konak savunmasından koruduğunu böylelikle kökenlerin *in vivo* canlılığının artırıldığı belirtilmektedir (83).

-Toksik moleküller; *A.fumigatus* hif üremesi sırasında değişik metabolitler oluşturur. En fazla oluşturulan metabolitlerden biri gliotoksindir. Gliotoksin makrofaj ve nötrofil fagositozunu önlediği B ve T hücre aktivasyonunu bloke ettiği açıklanmaktadır (84,85).

-Adezinler; Konidyumlar fibrinojen, laminin, komplement, fibronektin gibi konağın membranıyla ilgili proteinlerine yüzeysel olarak bağlanmaktadır (86).

-Fosfolipaz; Gliserofosfolipidlerde bulunan bağları hidrolize edilebilen bir grup enzimdir. Her enzim spesifik ester bağı koparmaktadır. Fosfolipidler ve proteinler konak hücre membranının major bileşenleridir. Dolayısıyla fosfolipazlar konak hücre invazyonunda membran yıkım işlemine katılırlar. Membranın zedelenmesi sonucunda hücre parçalanmaktadır (87).

-Demirin elde edilmesi; Serum, demir bağlayan transferin varlığından dolayı çoğu mantar için fungustatik etki göstermektedir. Bununla birlikte *A.fumigatus*’un serum içerikli besiyerinde üretildiğinde fagolizozomlardakine nazaran daha hızlı üretildiği

gözlennmektedir. Buda bize *A.fumigatus*'un konakta bulunan demiri kazanmak için bazı mekanizmalara sahip olabileceğine işaret etmektedir (88).

2.2.4. *ASPERGILLUS* Türlerinin Klinik Önemi

Aspergillus türleri pek çok hastalığın etkenidirler. Alt solunm yollarında allerjik bronkopulmoner aspergilloz, aspergilloma ve İA klinik tabloları olarak görülür. Hastanın immünitesi ve etkenin patojenitesi kliniği doğrudan etkiler. Granülamotöz hastalıklar ve kaviter akciğer lezyonlarında fırsatçı patojendir.

-Akut invaziv akciğer aspergillozu: En sık görülen klinik formudur. Mortalite oranı %95'dir. En sık etken *A. fumigatus* türüdür (89,90). Hastalarda yüksek ateş, nefes darlığı ve radyolojik incelemede minör infiltrasyon gözlenir. Büyük pulmoner arterlere yayılma ve tromboz sonucu hemorajik pulmoner enfarktüs gelişebilir. Akciğerden yapılan iğne biyopsi örneklerinde, mantarın histopatolojik tanısı yapılabilir. Hemoptizi ve göğüs ağrısı ise major bir damar hasarı ve ölümcül kanamanın habercisi olabilir. Erken tanı bu hastalarda uygun ve güçlü tedavi ile başarılı bir netice almak için önemlidir. Fakat hem klinik semptomlar hem de radyolojik bulgular erken dönemde nonspesifiktir (91). Radyolojik olarak BT direkt radyolojiye göre tercih edilen yöntemdir. Radyolojik bulgu olarak nodüler alan, bu nodüler alanların alveolar hemoraji ile çevrelenmesi ve bununla birlikte oluşan halo işareti, kavite, kama şeklinde tutulum, alveolar infiltrasyon, buzlu cam görünümü, plevral effüzyon ve pnömotoraksa bakılır (92,93).

-Kronik nekrotizan aspergilloz; Patolojik olarak üç farklı patern ile karakterizedir. Nekrotizan granülamatoz pnomoni, granülamatoz bronşektazik kaviterler ya da bronkosentrik granulamatosiz (94). Kronik nekrotizan aspergillozda bronşektazik kaviterler mevcut olduğu takdirde bunlarda mantar topları ya da mantar elemanı bulunur.

-Allerjik bronkopulmoner aspergilloz; *Aspergillus* türleri konidyumları ilk tanımlanan önemli aeroallerjenlerdir. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz en çok atopik kimselerde görülmektedir (95). Klinik özellikleri reagen (IgE) ve

presipitasyon (IgG) antikorlarına bağılı ortaya çıkar. Hastalarda balgam çıkarma, halsizlik, kilo kaybı görülür (96).

-Aspergilloma (Mantar Topu) Mantar topu, akciğerde önceden var olan kronik kaviteler veya genişlemiş bronşlar içinde kolonize olmuş mantar kitlesine denir. Yüksek ateş, öksürük, nefes darlığı , balgam oluşturan diğer kronik akciğer hastalığı durumunda akciğer kavitesinde ortaya çıkmaktadır (97). Aspergilloma radyografik incelemelerde görülebilir, fakat genellikle asemptomatiktir.

-Paranasal sinüslerin enfeksiyonu; Aspergilloz sinüslerin en sık görülen mantar enfeksiyonu olup etken olarak en sık *Aspergillus flavus* izole edilir (98). Kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastalarda ölüm oranı yüksektir.

Aspergillus 'ların oluşturduğu diğer enfeksiyonlar tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. *Aspergillus* enfeksiyonlarının sınıflandırılması

I.Sağlıklı konak hastalık

A.Toksikoz veya mikotoksikoz

1-Mikotoksinlerin alınması

2-Diğer metabolitlerin alınması

B.Allerjik tablolar

1- Allerjik astım

2-Allerjik rinit

3-Allerjik sinüzit

4-Extrensek alerjik alveolit

C.Yüzeysel ya da invaziv olmayan enfeksiyonlar

1- Deri enfeksiyonu

2-Otomikoz

3- Sinüzit

D. İnvaziv enfeksiyon

1-Tek organ

2-Çoklu organ

II. Doku hasarı veya yabancı cisim ile ilişkili enfeksiyon

A.Keratit ve endoftalmit

B.Yanık yarası enfeksiyonu

C.Osteomyelit

D.Prostetik kapak endokarditi

E.Aspergilloma

F.Ampiem veya plevral aspergilloz

G.Peritonit

III. Bağışıklık sistemi bozulmuş konakta enfeksiyon

A.Primer deri aspergillozu

B.Sinoorbital enfeksiyon

C.Pulmoner aspergilloz

1-İnvaziv trakeabronşit

2-Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz

3-Akut invaziv pulmoner aspergilloz

D. Santral sinir sistemi aspergillozu

E. İnvaziv yayılım gösteren aspergilloz

2.2.5 Tanı Yöntemleri

Son yıllarda immün yetmezlikli hasta sayısında artış ve mantar enfeksiyonu sıklığını ve önemini artırmıştır. İM enfeksiyonlarda tanı klinik bulgular radyolojik ve laboratuvar tanının birleştirilmesi esasına dayanmaktadır (99,100).

2.2.5.1.Laboratuvar Tanı Yöntemleri

-Örneklerin Toplanması;

Mantar kültürü için balgam, BAL sıvısı ve steril olmayan diğer alt solunum yolu örnekleri alınabilir. Bu bölgelerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin kontaminasyon ya da kolonizasyonu yansıtabilecekleri unutulmamalıdır.

Aspergillozla ilgili en inandırıcı kanıtlar ise biyopsi ile alınan akciğer dokusu ya da steril olan yerlerden izole edilmesi ve hif elemanlarının dokuda direkt olarak gözlenmesidir (101).

Örneklerin aşırı sıcak ve soğuklardan etkilendiği düşünülerek örneklerin 2 saat içinde oda sıcaklığında saklanması ve gönderilmesi önerilir. Örneğin mantar kültür için işleme alınması gecikecekse SSS örnekleri 30°C’de diğer örnekler +4°C’de kısa bir süre saklanabilir. GM, BG antijenleri ile *Aspergillus* DNA’sının arandığı PZR testi için gönderilen örnekler 72 saat içinde çalışılacaksa +4°C’de, uzun süre saklanacaksa – 20°C’de saklanmalıdır (102).

-Mikroskopik inceleme

Mantar enfeksiyonu düşünülen klinik örneğin ilk olarak direkt bakı ve boyamalar için hazırlanması gerekmektedir. Örnek öncelikle %20’lik KOH ile bekletilerek doku ve hücre artıklarından arındırılarak saydamlaştırılır ve mantar elemanlarının daha rahat görülmesi sağlanır. *Aspergillus* türlerinin hiflerinin görünümü enfeksiyon tipine göre değişiklik gösterebilir. İA’da *Aspergillus* türleri tipik olarak hiyalen 3-

6µm çapında septumlu hifleri olan, dar açıyla 45 derece birbirine eşit dallara ayrılarak dallanan düzgün yüzeyli duvarları birbirine paralel ve septum yerlerinde çok hafif bir daralma olan yada olmayan yapılar şeklinde görünürler. Akciğer kavitelerinde veya kulak kanalında konidyumlardan meydana gelen tipik yuvarlak yapıların ve ya askomaların varlığı tanıya yardımcı olur.

A.terreus dokuda hifin yan duvarları boyunca tipik aleurioconidia sergiler bu tür tanımlamasında önemlidir (103). *A.niger* ise solunum yolu örneklerinde kalsiyum oksalat kristalleride bulundurabilir (104). Serbest haldeki konidyumlar Gomori metamin gümüş boyası ile boyandıklarında maya hücrelerine ya da *P.jiroveci* kistlerine benzeyebilir. Gümüş boyası konidyumların rengini maskeler fakat *Aspergillus* konidyumları tırtıklı olmasından dolayı farklılık gösterir.

Kalkoflor beyazı mantar duvarında ki beta 1,3 ve beta 1,4 polisakkaritlere özellikle selüloz ve kitine bağlanarak hiflerin görünümünü sağlar (105).

Laktofenol pamuk mavisi ise sadece mantarın morfolojisini göstermek amacıyla kullanılır.

-Kültür

Aspergillus türlerinin identifikasyonu için hem makraskobik hem de mikroskobik özellikleri gerekmektedir. İzolasyon için bakteriyel üremeye engel olmak amacıyla gentamisin veya kloramfenikol ilaveli SDA, Patates dekstroza agar, inhibitör mold agar kullanılırken, üreyen *Aspergillus* cinsi mantarının türünün belirlenmesinde ise malt-extract agar, corn-meal agar veya Czapek agar'dan birisi kullanılır. Sikloheksimid *Aspergillus* üremesini engellediği için sikloheksimitsiz SDA kullanılmaktadır. SDA'da izole edilen türler genellikle eşeysiz formda üremeye meyillidirler. Buradan Czapek -Dox ve %2'lik malt ekstrakt agara pasajının yapılması sonucunda koloni ve mikroskobik özelliklerinin taksonomik klavuzlarda verilenlerle karşılaştırmasına olanak sağlar.

Bununla birlikte standart tanımlamalar çoğunlukla 7 günden sonraki üremeye göre yapılır. Yedi günden sonra standart besiyerinde 25 °C ve 37 °C koloni çapları

kolonin ön ve arka yüzündeki renk yapısı, topografisi ve eksuda damlacıklarının ya da yayılım gösteren pigmentlerin varlığı kayıt edilir.

Askosporların şekil, renk, büyüklük ve duvar özellikleri *Aspergillus* türlerinin telomorflarının ayırımında önemli özelliklerdir. *Aspergillus* suşlarının beyaz pamuğumsu ve spor oluşturmeyen varyantları özellikle kronik solunum yetmezliği olan hastalardan izole edilir. Küf 45 °C üreyebiliyorsa bu *A.fumigatus* olabilir (106). Varyantları bazen oldukça atipik görünürler ve tanınmayacak kadar pürüzsüz kıvrımlı koloniler oluştururlar.

-Serolojik Yöntemler:

On günden uzun süren ağır nötropenisi olan ve akciğerde infiltrasyon gelişen hastalar antifungal tedavisi altındayken bile ölümcül enfeksiyon ve tedavide başarısızlık riski ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bunu önlemek amacıyla erken tanı için geliştirilen serolojik testler özellikle kritik hastaların tedavisini yönlendirmek amacıyla büyük önem taşımaktadır.

-Galaktomannan testi:

GM, *Aspergillus* türlerinin de içinde bulunduğu hylohyphomycetes grubu küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür. Galaktomannan antijeni LA veya ELISA yöntemi ile hasta kanı ve sekresyonlarda tespit edilir. ELISA testi LA test metoduna göre daha üstün olduğundan son yıllarda tamamen ELISA yöntemi kullanılmaktadır (107,108). Avrupa ve Amerika'da çeşitli organizasyon ve kuruluşlar IA tanısında enzim immüassay (EIA) yöntemi ile galaktomannan antijeni saptanmasını tanısal mikrobiyolojik kriter olarak kabul etmişlerdir (64).

GM ELISA testinde sınır değer Amerika Birleşik Devletlerinde Food and Drug Administration (FDA) önerisi ile 0,5 ng/ml Avrupa da ise 0,7ng/ml olarak kabul edilmektedir (109). Ancak cut off değerinin 0,5ng/ml olması yalancı pozitiflik oranlarını artırmaktadır. Testin haftada iki defa yapılarak ardı ardına gelen serum örneklerinin İA bakımından değerlendirilmesi önerilmektedir. Zira ardışık gelen serum örneklerindeki pozitiflik, duyarlılığı ve özgüllüğü artırmaktadır (110).

Nötropenisi olmayan hastalarda duyarlılık daha düşük bulunmuştur (111). Belirli antibiyotikler (piperasilin –tazobaktam ve amoksisilin-klavunat), *Bifidobacterium* ile kolonizasyon ve diğer invaziv mantar enfeksiyonları (*Penicillium*, *Histoplazmosis*, *Blastomikozis*) yalancı pozitifliğe neden olmaktadır (112). Ayrıca çocuklarda yalancı pozitifliklerle sık karşılaşmaktadır bu nedenle kit FDA tarafından onay almamıştır. Önemli bir nokta ise laboratuvar hatasıdır. Kontaminasyonun çok yoğun olduğu unutulmamalıdır. Test mümkün olduğunca biyolojik kabinlerde ve steril malzemelerle çalışılmalıdır (113).

-Beta Glukan testi;

Mantarların hücre duvarında bulunan bir diğer antijen ise beta d glukandır. Serumda BG antijenin bulunması mantar invazyonun göstergesidir ancak *Aspergillus* türlerine özgül değildir (111). Kontamine kan toplama tüpleri, gazlı bezler, çeşitli antibiyotikler (bazı sefolosporinler, karbapenemler, ampisilin-sulbaktam) *Staphylococcus*, *Enterococcus* bakteriyemisinde de bir takım yanlış pozitiflikler görülmektedir (115). BG antijen tayinine yönelik fungitell tetkiki FDA tarafından aspergilloz da dahil olmak üzere invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında onaylanmıştır (116,117). İA vakalarında BG ve GM antijenlerinin etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada her iki testinde aynı oranda duyarlılığı saptanırken BG testinin GM testine göre daha erken pozitifleştiği gösterilmiştir (102). İA'lu hastalarla yapılan bir çalışmada BG testinin GM testi ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (118). Genel olarak BG testi etkinliği açısından ümit verici olmakla birlikte daha fazla sayıda bu yöntemle yapılmış çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

-Moleküler Testler

Mantarlara özgü gen dizilerinin PZR ile amplifikasyonu hızlı tanı için uygun bir testtir. Literatürde klasik PZR, nested PZR, rt-PZR, PZR-EIA, PZR dizi analizi, in-situ hibridizasyon ve 'DNA microarray' gibi yöntemlerden bahsedilmiştir. Bir kaç Avrupa merkezinde bu yöntemler İA tanısında kullanılmaktadır. Fakat standardizasyonunda olmaması nedeniyle EORTC tarafından tanımlanan klasik invaziv mantar enfeksiyonu tanı kriterleri arasında değildir (119). Bu tekniklerde

solunum yolu örnekleri, doku ve kan örnekleri kullanılmaktadır. Tam kan örneğinde gerçekleştirilen PZR testinin duyarlılığı plazma ve serum örneklerinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (120). Pan-fungal primerler ya da *Aspergillus* gibi belli bir mantar türüne yönelik primerler aracılığı ile hasta serum yada BAL sıvısında fungal enfeksiyon araştırması yapılabilmektedir (57). Bu yöntem ile pulmoner aspergillosis tanısına yönelik çalışmalarda testin duyarlılığı %85 özgüllüğü ise %96 ların üzerinde bulunmuştur (121). Testin en önemli dezavantajı ise yüksek yalancı pozitiflik ve buna bağlı düşük pozitif prediktif değerleridir. Yalancı pozitiflik değerleri özellikle BAL sıvısı test edildiğinde fungal kolonizasyon riski nedeniyle daha sık olmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen rtPZR yöntemi ile fungal yük miktarının hassas bir şekilde gösterilmesi sağlanmıştır ancak bu yöntem ile yapılan çalışmalarda yalancı pozitiflik halen sorun olmaya devam etmektedir (122).

2.2.5.3 KLİNİK VE RADYOLOJİK TANIMLAMA

EORTC/MSG kriterlerine etken küf ise invaziv küf enfeksiyonu üç grupta sınıflandırıldı (65).

1-Kesin

2-Yüksek olasılıklı

3-Düşük olasılıklı invaziv küf enfeksiyonu

-KESİN KÜF ENFEKSİYONU

Küflerin doku faktörlerinin varlığı kanıtlanmış mantar enfeksiyonları için yeterlidir fakat klinik faktörlerin varlığında beklenir.

Tablo 4. Kesin invaziv küf enfeksiyonlarının doku kriterleri. (65).

KÜFLER

Sitopatolojik ve histopatolojik veya direkt mikroskopik incelemeyle iğne aspirasyonunda ya da biyopsi örneğinde hifa oluşumuna eşlik eden doku hasarı

Normalde steril olan ancak radyolojik ve klinik olarak enfeksiyonla uyumlu anormal bir bölgeden alınan kültürden küf üremesi (Bronko alveolar Lavaj(BAL), Sinüs kavitesi örneği ve idrar hariç)

Uyumlu klinik bulgu belirtisi olan hastalardan alınan kan kültüründe *Fusarium* gibi küf mantarlarının üretilmesi.

Kan kültüründe üretilen *Aspergillus* türleri her zaman kontaminasyon olarak kabul edilmektedir

-YÜKSEK OLASILIKLI KÜF ENFEKSİYONU

En az bir adet konak faktörün yanında bir adet mikrobiyoloji ve bir adet klinik kriterin bulunması

-DÜŞÜK OLASILIKLI KÜF ENFEKSİYONU

En az bir konak faktör yanında mikrobiyolojik kanıt olmaksızın klinik kriterlerle desteklenmesidir.

İnvaziv küf enfeksiyonu olasılığını artıran durumlar

- 1-Konakçı faktörler
- 2- Klinik faktörler
- 3- Mikrobiyolojik faktörler olarak incelenmiştir.

Tablo 5. İnvaziv küf enfeksiyonu olasılığını artıran durum

KONAK FAKTÖR

Kök hücre alıcılar

10 gün yada daha uzun nötropeni($<0.5 \times 10^9$ n/L <500 n/mm³)

3 haftadan fazla 0.3mg /kg üstü prednizolon kullanımı

Son 90 günde T hücre baskılayıcılarının kullanımı (cyclosporine, TNF alfa blokörü, monoklonol antikorlar, veya nükleozid analogları)

Hereditör ciddi immün yetmezlik (Kronik granülamotöz hastalık)

KLİNİK FAKTÖR

Alt solunum yolu enfeksiyonu; Halo sign bulunan yada bulunmayan iyi sınırlı mantar ile uyumlu dens alan , air crescent bulgusu , kavite

Trakeabronşit; Trakeabronşial ülserasyon, nodül, psödomembran, plak, veya bronkoskopik analiz ile eskar görülmesi

Sinonazal enfeksiyon Sinüzite ek olarak 3 bulgudan ;

Akut ağrı göze vuran

Siyah eskarı olan burunda ülser

Paranasal sinüs bariyerinden orbitaya yayılım

Santral sinir sistemi enfeksiyonu; Meningeal fokal lezyonlar MR ve BT 'de değişiklikler.

MİKROBİYOLOJİK FAKTÖRLER

Direkt; Sitolojik direk mikroskopik ya da kültür pozitifliği (Bronkoalveolar Lavaj balgam ya da sinüs aspirasyonu)

İndirekt testler GM antijen testi (plazma , serum, BAL, BOS)

BG serumda

-Korunma ve kontrol;

Aspergilloz riski taşıyan kişilerin hastane ortamında korunmaları gerekmektedir

Bunun için ;

1-Yüksek etkili partiküler filtreler (HEPA) ile havanın temizlenmesi

2-Hasta izolasyonunun sağlanması

3-Hasta odalarında bitkilerin kaldırılması hastane inşaatları esnasında bariyerlerin kullanılması

4-Bazı gıda maddelerinin (buğday, fındık) *Aspergillus* kontaminasyonu nedeniyle hastalara önerilmez.

2.2.6.Tedavi

Fungal enfeksiyonların tedavisinde başlıca dört grup ilaç kullanılmaktadır. Poliyen grubu antifungal ilaçlar (Amfotersin B), Azol deriveleri(imidazoller ve azoller), Nükleik asit sentez inhibitörleri (5-fluorositozin), hücre duvarına etki edenler (Ekinokandinler)

Poliyen grubu antifungal ilaçlar

Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde Amfoterisin B (Amp B) onaylanmış standart bir ilaçtır (123). Poliyen grubu antifungal ilaçlar fungal membrandaki ergosterole bağlanır ve önemli katyon kaybı sonucu hücre ölümü gerçekleşir (124).

A. terreus, Amp B' ye intrinsek dirençli bir türdür. Bu nedenle *A. terreus* ile oluşan enfeksiyonlarda artışlar bildirilmektedir (125). Direnç mekanizması; hücre zarındaki lipid yapısının değişmesi, hücre duvarında bulunan BG içeriğinin değişmesi ve artmış katalaz aktivitesi direnç gelişmesine yol açabilmektedir (126). Konvansiyonel Amp B nefrotoksiktir yan etkiyi azaltmak için lipid bazlı üç formülasyon geliştirilmiştir. Bunlar lipozomal Amp B, Amp B lipid kompleksi, Amp B kolloidal dispersiyondur (127).

Azol grubu antifungal ajanlar

Etkilerini sitokrom p-450 14 α lanosterol dimetilaz enzimini (ergosterol sentezinde görevli enzim) inhibe ederek hücre membranının yapısını bozar ve hücre ölümüne neden olurlar (128). Ketokonazol imidazol türevi olup, flukonazol, itraconazol

vorikonazol, ravukonazol, posakonazol ise triazol türevidir. Flukonazol en önemli azol türevidir. Genellikle kandidoz ve kriptokok menenjit tedavisi ve profilaksisinde ve kullanılmaktadır (129). Vorikonazol *Aspergillus* , *Candida* , *Cryptococcus* gibi pek çok fırsatçı mantar enfeksiyonun yanı sıra flukanazole dirençli *C.krusei* ve *C.glabrata* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ikinci kuşak azoldur (130). Posokonazol ise yeni jenerasyon azoller içerisinde olup *Candida*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*, *Fusarium* türlerini içeren geniş bir etki spektrumu bulunmaktadır (131). Direnç mekanizması; 14 α lanosterol dimetilaz enziminde mutasyon, enzimin fazla eksprese edilmesi, ilacın hücreye alınmasında azalma, eflüks pompası azol grubuna karşı direnç gelişmesinde etkili faktörlerdir (126).

Ekinokandinler grubu antifungal ajanlar

Ekinokandinler hücre duvarında yer alan β -(1-3) glukana sentetazı etkileyerek *Candida* türleri için fungisidal etki gösterirken *Aspergillus* türleri için fungistatik etki gösteren yeni jenerasyon antifungal ilaçlardır (132). Kaspofungin birinci kuşak ekinokandin grubu olup FDA tarafından 2002'de onay almışken, mikafungin 2005, anidilafungin ise 2006 yılında onay almıştır (133). Ekinokandin grubu antifungal ilaçlar *Candida* türlerinin oluşturduğu biyofilm üzerine etkileri son derece iyi iken *Zygomycetes*, *C. neoformans* ve *Fusarium* türlerine etkisi daha düşüktür (134).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. HASTALAR VE ÖRNEKLER

Nisan 2009-Eylül 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kliniklerinde takip edilen İM enfeksiyonu şüpheli hastaların klinik örnekleri çalışmaya alındı.

Kültür için alınan klinik örnekler balgam, BAL, akciğer biyopsi örnekleri, plevra, periton gibi örneklerdi. Hastaların serumlarında BG, GM arandı ve rtPZR ile mantar DNA'sı bakıldı.

Klinik olarak sınıflama da EORTC'nin belirlediği kriterler uygulandı.

Prospektif olarak çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler EORTC'nin belirlediği sınıflamaya göre kaydedildi.

Bu hastalardan alınan izole edilen örnekler mikoloji laboratuvarında rutin mikroskopik değerlendirilmeleri ve kültürleri yapıldı. Kan örnekleri (3000 devir/dakika) 10 dakika santrifüjlenerek serumlarına ayrıştırıldı. Serumlar BG ve GM çalışılması için -20°C'de, PZR çalışmak üzere ise -70°C'de mikrobanklarda saklandı.

3. 2. ÖRNEKLERİN MİKOLOJİK İNCELEMESİ

3. 2. 1. Mikroskopik inceleme:

Hastalardan alınan balgam, BAL, plevral mayi ve akciğer biyopsi örneklerinin direkt mikroskopik incelemeleri yapıldı. BAL, balgam ve akciğer biyopsi örnekleri %10'luk KOH ile muamele edilip lam lamel arasında ışık mikroskopunda x10-20-40' lık objektifiyle incelenerek mantar elamanı olup olmadığı araştırıldı.

Gerektiğinde Kalkoflour beyazı ile boyanıp floresan mikroskopisi ile değerlendirildi.

3. 2. 2. Kültür:

IM enfeksiyonu şüpheli olan hastalardan alınan balgam, BAL, plevra, akciğer biyopsi örnekleri antibiyotikli ve antibiyotiksiz SDA besiyerine ekildi. Biri 37°C'de diğerleri de 25°C'lik etüvlerde 3 hafta inkübe edildi. Günlük değerlendirmesi yapıldı. Üreme görülen mayalar germ tüp oluşumu ve karbohidrat asimilasyonu testi için değerlendirmeye alındı.

3.2.3.Germ Tüp Oluşturma Özelliği

Test edilecek maya kolonisi 0,5 ml insan serumu bulunan tüp içerisine eklenerek karıştırıldı. 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra direkt preparat hazırlanarak ışık mikroskopunda x40 objektifle incelendi. Blastospordan köken alan başlangıç noktasında boğumlanma göstermeyen ve maya hücresinin 3-4 katı uzunluğundaki hif benzeri yapılar germ tüp olarak kabul edildi.(135)

3.2.4 Karbohidrat Asimilasyon Özelliklerin Test Edilmesi

SDA'da üreyen maya kolonilerinin karbohidrat asimilasyonunu değerlendirebilmek için ticari kitlerden API 20C AUX (bioMerieux, France) kullanıldı. API 20C AUX stripi, 19 asimilasyon testinin performansını gösterebilen ve dehidrate substratlar içeren 20 küpülden oluşur. Küpüller yarı-katı bir minimal madde ile inoküle edilir ve mayalar karbon kaynağı olarak her bir substratı kullanma kapasitesine sahip olduklarında çoğalabilirler. Test edilen karbohidratlar: glukoz, gliserol, 2-keto-D-Glukonat, L-Arabinoz, D-ksiloz, ADO nitol, ksilitol, galaktoz, inozitol, sorbitol, a-

Metil-D-Glukosid, asetil-D-Glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur. Mayalar inoküle edildikleri 26 mikro kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorlarsa, o kuyucukta üreme olur. API 20C AUX'la mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri, 24. 48. ve 72 saatte değerlendirilerek sonuç verildi.

Testin uygulanması

1. Stripin hazırlanması: İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu, strip paketi açılarak kabın içine yerleştirildi.

2. İnokülasyon: SDA'daki 24 saatlik *Candida* kolonilerinden steril bir öze ile alınarak, 2ml'lik Suspension Medium (%0.85 NaCl) içinde karıştırılarak, yoğunluğu 2 Mc Farland'a ayarlandı. Bu süspansiyondan 100µL kit içeriğinde olan C Medium içine aktarıldı. Steril bir pipet kullanılarak, C Medium'daki süspansiyondan strip içindeki kuyucuklara dolacak, fakat taşmayacak şekilde 300µL dağıtıldı. Strip inkübasyon kabının içine yerleştirilip, kapağı kapatıldı. 25°C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı.

3. Stripin okunması: Bulanıklık olan kuyucuklarda üreme pozitif kabul edildi. Negatif kontrolde üremenin olmamasına dikkat edildi. Özellikle glukoz kuyucugunda belirgin üreme yoksa inkübasyon süresi 24 saatten 72 saate kadar uzatıldı. Üreme olan kuyucuklar not edildi.

4. İdentifikasyon: Bunun için, test prosedürüne göre, pozitif kuyucuklara değerlendirme cetvelinde 1, 2, 4 gibi numaralar verildi. Her bir grup içindeki sayılar toplandı ve sayısal profil elde edildi. Hif oluşumu için de 4 sayı eklendi. Elde edilen sayısal profil, API 20C AUX Analytical Profile Index'e göre değerlendirildi (API 20C AUX, bioMerieux, France kit prosedürü)

3. 2. 5. Mantarın tür düzeyinde tanımlanması:

Mikroskopik morfoloji, türe özgü olup, tanımlanması için anahtar rolü oynar.

Lam kültürü: Lam kültür düzeneği cam bir petride lam ve üzerindeki besiyeri, lamel, nemli ortam için ıslatılmış spanç ve yükseltici borulardan oluşmaktadır.

Mısır unlu agar besiyeri 4mm kalınlıkta dökülüp 1x1 cm²lik boyutlarda kesildi ve lam üzerine koyuldu. SDA besiyerindeki koloni öze ile alınıp şekilde görüldüğü gibi mısır unlu agar besiyerin 4 kenarını da ortalayıp ekildi. Üçüncü veya 5. günde mikroskopta x40'lik objektifde değerlendirildi.

3. 3. SEROLOJİK TESTLER

Çalışmada şüpheli hastalarda serolojik olarak GM ve BG antijen arama yöntemleri kullanıldı.

3. 3. 1. Galaktomannan antijen arama

Testin prensibi:

Platelia *Aspergillus* kiti (Platelia *Aspergillus*; Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) serumda GM'ı saptayabilen birinci basamak immünoenzimatik sandviç mikro kaplama yöntemidir.

Testte tavşan monoklonal antikorlar ELISA çukurlarında kaplanmış olarak ve peroksidazla işaretlenmiş olarak bulunur

1-Test aşağıdaki basamakları kapsar:

- Serum içindeki immün kompleksleri ayırmak için %4 EDTA ile birlikte serumlar ısıtılır.
- Monoklonal antikorlarla kaplı çukurlara serum ve konjugat eş zamanlı 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 sülfürik asitle reaksiyon durdurulur ve 450/620 nm dalga boyunda sonuçlar değerlendirilir.

2-Testi uygulamadan önce yapılacak işlemler ve içerik:

- ELISA çukurcukları aliminyum folyo kaplı paketinden çıkarıldı ve oda ısısında 15-20 dakika bekletildi.
- Yıkama solüsyonu (Tris NaCl pH 7.4 buffer,%1 Tween 20 ve %0.01 sodyum metiolat) distile su ile 10 kat sulandırıldı.
- Kontrol serumları (pozitif, negatif ve eşik serumu) 1 ml steril su ile sulandırılıp iyice karıştırıldı.
- Konjugat (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikorları) %0.01 meiolat içerir ve kullanılmaya hazırды.
- Serum işleme solüsyonu (EDTA asid solusyonu) kullanılmaya hazırды.
- Substrat buffer (sitrik asit, sodyum asetat, pH 5.2 % 0.009 hidrojen peroksid ve %4 dimetilsülfoksit) kullanılmaya hazırды.
- Kromojen solüsyonu tetrametilbenzidin içerir ve subsrat buffer ile 50 kat seyreltildi.
- Reaksiyonu durdurma solüsyonu 1.5 N sülfirik asit içerir ve kullanılmaya hazırды.

3-Testin uygulanışı:

- Steril eppendorf tüpüne 300µl serum ve 100µl serum işleme solüsyonu (%4 EDTA) konuldu.
- İyice karıştırılıp ependroflarda benmari usuli 100°C'de 3 dakika bekletildi.
- 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve üstteki sıvı bölüm çalışıldı.
- Aynı işlemler kontrol serumları için de yapıldı.

- ELISA ukurlarında birinci çukur pozitif, ikinci çukur negatif, üç ve dördüncü çukur eşik değeri 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 daha önce karışımı yapılan 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 450nm (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: indeks=örneklerin optik dansitesi/eşik serumun optik dansitesi;

indeks: <0.5: negatif

>0.5: pozitif

indeks olarak değerlendirildi. Sonuçlar ardışık örneklerde cut off 0.5 olarak kabul edildi.

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

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

OD kontrol eşik serum 0.3 -0.8 arasında

Pozitif indeks = OD pozitif kontrol / OD eşik kontrol serum > 2

Negatif indeks = OD negatif serum / OD kontrol eşik serum < 0.5 olması gerekiyordu.

3. 3. 2.BG testi:

Testin prensibi:

Fungitell test kiti (1→3)-β-D-Glukan seviyesini ölçen bir testtir. Test kiti içinde Limulus Amebocyte Lysate (LAL) pathway'in modifiye edilmiş formu bulunmaktadır.

Fungitell reagent içerisindeki LAL; Factor C nin elimine olduğu yolun modifiye edildiği, (1→3)-β-D-Glukan'ın etki ettiği Factor G'nin aktive olduğu yoldur.

(1→3)-β-D-Glukan factor G i aktive eden bir serin proteaz zimogen dir. Aktive olan faktor G inaktiv proclotting enzimi clotting enzime dönüştürür. Oluşan enzimde kromojenik peptid substrattan pNA₁ bölerek 405 nm de absorbansı olan bir kromofora dönüştürür.

Fungitell testi ile (1→3)-β-D-Glukan seviyesi ortamdaki optik dansite seviyesinin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu değer ortamdaki (1→3)-β-D-Glukan seviyesini göstermektedir.

Testi uygulama kullanılacak maddeler:

- Fungitell reagent içerisinde liyofilize (1→3)- β -D-Glukana spesifik LAL
- Pirosol düzenleyici buffer (Tris HCl 0.2 M pH 7.4)
- Glukan standart
- RGW (Reagent Grade Water)
- KOH 0.25 M, KCL 1.2M
- glukan free tüpler ve mikroplateler (96 kuyucuklu)
- Pipetler (5-25 μ l ve 100-1000 μ l), pipet stepper (100 μ l çekebilen) glukan-free olmalı
- Standartların hazırlandığı test tüpleri glukan free 13x100mm borosilikat camdan olmalı
- Okuyucu testin 37C de inkübe edilebildiği başlıca 405 ve 490 dalga boylarında okuyan ve en az 2 Absorbans unit aralıkta yükselme bilgisayara aktarılabilen bir yazılımı olmalı

Kullanılacak maddelerin hazırlanması:

Standartların hazırlanması:

- Fungitell test kitinin içinde hazır olan Glukan standartın üzerine 100pg/ml olacak şekilde RGW eklenir. 30sn vortexlendikten sonra 1.standart
- 50 pg/mL için 1.standarttan 500 μ L alındıktan sonra üzerine 500 μ L RGW eklenip 10 sn vortexlendikten sonra 2.standart
- 25 pg/mL için 2.standarttan 500 μ L alındıktan sonra üzerine 500 μ L RGW eklenip 10 sn vortexlendikten sonra 3.standart

- 12.5 pg/Ml için 3.standarttan 500µL alındıktan sonra üzerine 500µL RGW eklenip 10 sn vortexlendikten sonra 4.standart
- 6.25pg/Ml için 4.standarttan 500µL alındıktan sonra üzerine 500µL RGW eklenip 10 sn vortexlendikten sonra 5.standart hazırlandı.

Serum pre-treatment reagent hazırlanır. Alkalın serum pre-treatment solusyon triple helix glukani single stranded glukana çevirir. Böylece daha aktif hale dönüşür. Alkalın olması da serumdaki serin proteaz ve serin proteaz inhibitörleri inaktive ederek sırasıyla yanlış pozitif ve yanlış negatifliği engel olur. 0.25M KOH ile 1.2M KCl eşit miktarlarda karıştırılarak hazırlanır. Önerilen 900µl'şer miktarlarda olmasıdır.

Testin uygulanış şekli:

- Oda ısısında erimiş ve vortexlenmiş her hastadan 5µl'şer serumlarından iki kuyucuğa konuldu. Üzerlerine 400 µl KOH ve 400 µl KCL karışımından elde edilen serum reagentden 20 µl'şer konuldu.
- Cihaza yüklenerek Mikroplate 5 sn çalkalandı. Daha sonra 10 dakika 37°C'de plate readerda inkübe edildi. Bu süre içinde standartlar ve fungitell reagent hazırlandı.
- Bir flakon Fungitell reagent 2.8 mL RGW ile çözüldü ve 2.8 mL pyrosol buffer eklenip hazırlandı. Üzeri parafilm ile kaplanıp ters düz edilerek karıştırıldı. Vortexlenmedi.
- Sonraki aşamada negatif kontroller ve standartlar eklendi.
- Her test için 25 µl 2 kuyucuk negatif kontrol, 5 standart ve her standart için 3 kuyucuk kullanıldı.
- Negatif kontrol olarak RGW kullanıldı.
- Sonra hasta serumları, pozitif ve negatif kontrol ve de standartlar bulunan tüm kuyucuklara fungitell reagent dan 100 µl eklendi. 5-10 sn karıştırıldı.

- Sonra mikropelateler üzerini kapatmadan 37°C ısısında 405nm ile 490nm arasında değişen 40 dakika süren okuma cihazında okunması sağlandı.
- Sonuçların analizi: 40 dakika boyunca tüm değerlerin optikal değişim değerleri ortalama değerleri hesaplanır.

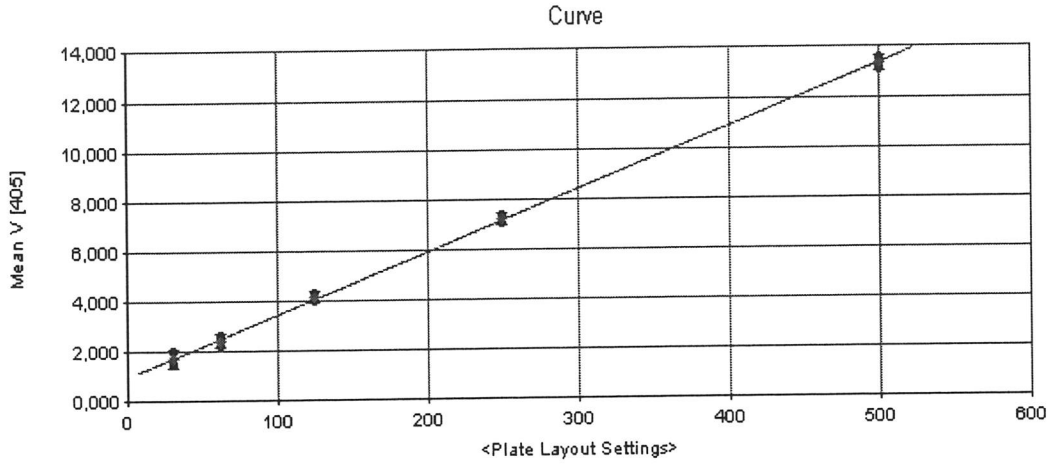
Testin değerlendirilmesi:

- Test en az 31pg/ml en yüksek 500pg/ml değerlerinde ölçüm yapabilmektedir. Değer >500pg/ml iken RGW ile tekrar dilue edilip test tekrar edildi.
- Sonuçları değerlendirirken <60pg/mL olanlar negatif
- >80pg/mL olanlarda pozitif olarak kabul edildi.
- 60 ile 79 pg/ml arasında ise muhtamel bir fungal enfeksiyon olarak kabul edildi.

Testin kalite kontrolü:

Testin değerlendirmesinde standart eğrinin korelasyon kofiensisi (r) >0.980 olmalıdır. Ayrıca negatif kontrollerin optik dansite değerleri en düşük standartın %50 sinden daha düşük olmalıdır. Olmazsa test yeni reagentlarla tekrar edilmelidir.

Örneklerdeki dikkat edilmesi gereken hususlar: Eğer örnekler renksiz ve bulanık ise muhtemelen kanın hemoliz olması, hastanın lipidemisi olması yada bilirubin değerlerinin çok yüksek olmasına bağlıdır. Bu durumda hasta örneğine RGW katılarak dilue edilip test tekrarlanmalıdır.



Grafik 1. BG testinde sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan grafik

3. 3. 3. PZR İle *A.fumigatus* Araştırılması

Hastaların kan örneklerinden nükleik asit eldesi için Heliosis DNA izolasyon sistemi (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılarak test kiti prosedürüne uygun çalışıldı. Elde edilen DNA'lar *A. fumigatus* hedefleri çoğaltmak üzere gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [Real Time PZR (LightCycler-Roche, ABD)] kullanılarak değerlendirildi.

Nükleik asit izolasyonu:

Örnekler çalışmadan önce 15-25⁰C oda sıcaklığına getirildi.

İzolasyon Kit içeriği (Heliosis® DNA Extraction Module (Metis Biyoteknoloji, Türkiye))

- DNA Lysis binding solution
- DNA Precipitation solution
- DNA Washing solution
- DNA Sample diluter

Kit Dışında Kullanılanlar:

- A214-RBC lysis solution (Heliosis® RBC Lysis Module (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
- Proteinaz K
- Tissue lysis buffer (Heliosis® Tissue Digestion Module (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

FAST START MASTER KİTİ (Way2gene All Fungi Nükleik Asit Saptama Kiti)

- Primer ve problemlerin karışımı
- Standartlar

M MIX:

- 1a solusyon: Lightcycler Fast Start Enzyme
- 1b solusyon: Lightcycler Fast Start Reaction Mixt Hyb Probe (Fast Start Taq DNA Polimeraz, Reaction Buffer dNTP mix with dUTP ya da dTTP, 10mM MgCl₂
- 25 M MgCl₂
- dH₂O

Testte kullanılacak solüsyonların hazırlanışı ve çalışmaya hazırlık:

- 1b solusyonda 60µl alınıp 1a içinde karıştırılarak Mix M hazırlandı.
- Primer-prob içine 66 µl, standartlara 40µl PZR-grade su eklendi ve hazırlandı.
- MgCl₂, Proteinaz K, tissue lysis buffer, A214-RBC lysis solution hazırdır.
- Kuru ısı bloğu 95°C'ye, etüv 65°C'ye getirildi.

- İzolasyondan önce tüm örneklerle (kan, serum, plazma gibi) A214-RBC lysis solution protokolü uygulandı.

A214-RBC lysis solution protokolü:

- A214-RBC lysis solution'dan 1.2ml alınıp 1.5ml'lik ependrof tüpüne aktarıldı.
- EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden 300 µl kan üzerine eklendikten sonra pipetajla iyice karıştırıldı (vortexlenmedi). Sonra 5 dakika -20°C'de bekletildi.
- 3 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Eğer taze kan çalışıldı ise çökelek üzerine tekrar RBC lysis solutiondan 1ml eklenip pipetajla iyice lizis edilir. 5 dakika -20°C de bekletildi.
- 3 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. Kalan çökelek üstüne 100µl Tissue Lysis Buffer ve 5µl Proteinaz K eklendi.
- Karışım 65°C'de 2saat etüvde sonra 95°C ısı bloğunda 10 dakika inkübe edildi.
- 1 dakika 10000rpm'de santrifüj edildi ve örneklerin üst kısımdan 100µl alınıp heliosis izolasyon kiti ile izolasyona geçildi.

A101-DNA Ekstraksiyon Protokolü:

- Çökelek üzerine 400 µl DNA Lysis binding solution eklendi. Pipetle 5-6 kez karıştırılıp lizis yapıldı.
- Karışım 65°C'de 10 dakika'yı takiben +4°C'de 2dk bekletildi. Ependrof tüpün kapakları açılmadan spin santrifüj edildi.
- Üzerine 500 µl DNA Precipitation solution eklendi. Yavaşça 5-6 kez bir aşağı bir yukarı karıştırıldı ama vortexlenmedi.
- 15dk 13000rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım pipetle tamamen alındı ve atıldı.

- Üzerine 500 µl DNA Washing solution eklendi.
- 5 dakika 13000rpm’de santrifüj edildi. Üst kısım tamamen alındı ve atıldı.
- 10-15 dk kapaklar açık kuruması için oda ısısında bırakıldı.
- Sonra tüplerin herbirine 100 µl DNA sample diluter eklendi. 65°C’de 10 dakika bekletildi. Spin santrifüj edildi. Kullanmadan önce iyice pipetaj yaparak DNA elde edildi.
- Elde edilmiş DNA 1hafta içinde kullanılacaksa +4°C’de saklandı. Daha uzun süre kullanılmayacaksa -20°C’ye kaldırıldı.

Fast Start Master Kiti

M Mix:

- 1a solusyon: Lightcycler Fast Start Enzyme
- 1b solusyon: Lightcycler Fast Start Reaction Mixt Hyb Probe (Fast Start Taq DNA Polimeraz, Reaction Buffer dNTP mix with dUTP ya da dTTP, 10mM MgCl₂)
- 25 M MgCl₂
- dH₂O PZR-grade

***A. fumigatus* PZR Kiti**

- Forward primer 20µM stok
- Reverse primer 20µM stok
- Prob Fc 20µM stok
- Prob Lc 20µM stok

***C. albicans* PZR Kiti**

- Forward primer 20µM stok
- Reverse primer 20µM stok
- Prob Fc 20µM stok
- Prob Lc 20µM stok

***C.albicans* ve *A. fumigatus* Real Time Testinde kullanılacak solüsyonun hazırlanışı ve çalışmaya hazırlık:**

- 1b solüsyonundan 60µl alınıp 1a içinde karıştırılarak Mix M hazırlandı.
- Her iki primerde stok 20µM konsantrasyonundan 5µM konsantrasyonuna seyreltildi.
- Problar 2 µM dH₂O ile sulandırıldı.
- Numunelerin izolasyonları tamamlandı.

DNA Amplifikasyonu

Hasta kanlarından DNA izole edildikten sonra *A.fumigatus* rtPZR ve *C.albicans* rtPZR çalışıldı.

***A.fumigatus* DNA amplifikasyon karışımı:**

- 3,4 µL ----dH₂O
- 1.6 µL----Mg
- 2 µL-----F primer
- 2 µL-----R primer
- 2 µL-----FL prob
- 2 µL-----LC prob

-2 µL-----M mix

***C.albicans* DNA amplifikasyon karışımı**

-3,4 µL ----dH₂O

-1.6 µL----Mg

- 2 µL-----Forward primer

-2 µL-----Reverse primer

-2 µL-----FL prob

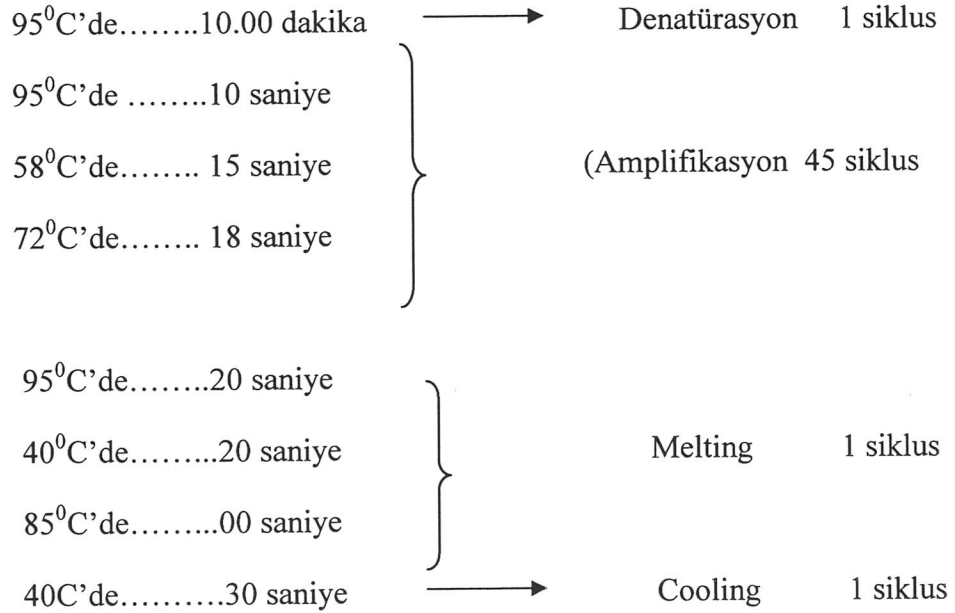
-2 µL-----LC prob

-2 µL-----M mix

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminar akım içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon için kullanılacak M mix için Lightcycler Fast Start Reaction Mixt Hyb Probe dan 60 µL alıp 1 Lightcycler Fast Start Enzyme içine konup karıştırıldı. Hazırlanan M mix üzerine Forward primer, Reverse primer FL prob, LC prob , MgCl₂ , ve distile su çalışmada hasta sayısına uygun miktarlarda eklenerek PZR amplifikasyon karışımı hazırlandı. Örnek sayısı, pozitif ve negatif kontrol sayısı kadar PZR amplifikasyon karışımı tek ependorf tüpüne hazırlandı ve kapillere 15 µL dağıtıldı.
2. Standartlar, negatif kontrol ve hasta örneklerinden elde edilmiş DNA izolatlarından 5'er µL kapillere dağıtıldı.
3. Lightcycler version 3.5 Roche PZR cihazına yerleştirildi.

4. Örneklerdeki nükleik asit 'light cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.



Oluşan floresan eğrileri LightCycler software version 4 ile değerlendirildi. Floresan eğri 6 tane 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ titrelerindeki standartlara göre çizildi. Negatif kontrol olarak su kullanılırken pozitif kontrol kullanılmadı.

Kalite kontrolü:

Tm 65.5 -75.5 arasında olmalıdır

2. 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Nitel veriler %100 olarak tanımlandı. Tanı kriteri için duyarlılık ve özgüllük hesaplandı. Testler arasındaki istatistiksel farklılığa McNemar testi kullanılarak bakıldı. Testler arasındaki uyuma ise kappa katsayısı hesaplanarak bakıldı. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alındı.

4.BULGULAR

HASTA GRUBUNUN DEMOGRAFİK BULGULARI:

Çalışmaya alınan İM hastalığı olarak sınıflandırılan 52 hastanın 12(%23)'si kadın, 40(%77)'i erkek hastadır. Bu hastaların yaş ortalaması ise 46.7' dir. İM hastalığı düşünülen 52 hastada en sık görülen alt hastalık sırasıyla 16(%30)AML, 7(%13)ALL, 5(%57) Lenfomadır. Kontrol hastasının ise 18(%48)'i erkek ve 19(%52)'u kadın hastadan oluşmaktadır. Bu hastaların yaş ortalaması 51.2 dir. Kontrol hastalarında 10(%27) solid organ kanseri, ve 7(%18) AML hastalığı tespit edilmiştir. Hastaların ve kontrol grubunun servislere göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. Hastaların servislere göre dağılımı

SERVİS	HASTA	KONTROL
Hematoloji	28	24
Enfeksiyon hastalıkları	4	1
GHS*	6	5
DYBÜ*	10	4
GCYB*	3	2
Nefroloji	1	1
TOPLAM	52	37

* Göğüs Hastalıkları Servisi (GHS), Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi (DYBU), Genel Cerrahi Yoğun Bakım (GCYB)

Tablo 7. Hastaların klinik sınıflandırılması, alt hastalıkları ve laboratuvar bulguları

Hasta bilgileri	Kesin hasta	Yüksek olasılıklı	Düşük olasılıklı	Kontrol grubu
Cinsiyet(E/K)	8/5	10/0	22/7	18/19
Hasta sayısı	13	10	29	37
Alt hastalıkları				
AML(Akut myeloid lösemi)	1	4	11	7
Akut Lenfoblastik Lösemi(ALL)	4	1	2	3
LENFOMA	1	1	3	3
Solid organ CA	1	1	2	10
Aspergilloz	2	2	2	-
Wegener,Múltipl Myelom,	1	-	2	1
Diğer alt hastalıklar	3	1	7	13
Kemoterapi	4	8	15	-
KİT ünitesi	1	2	4	-
Steroid tedavisi	1	-	10	-
BG pozitif hasta	13	6	23	8
GM pozitif hasta	5	5	14	5
Kültür pozitif hasta	13	10	8	-
<i>Candida albicans</i> PCR Pozitif hasta	4	-	-	7
<i>Aspergillus Fumigatus</i> PCR Pozitif hasta	2	5	6	5

*Diğeralt hastalıklar;(kronik obstrüktif hastalığı,Hepatit B,Pnomoni,HIV,Diabet)

*Kemik iliği Transplantasyonu(KİT)

KLİNİK SINIFLANDIRMA

İM hastalığı olan 52 hasta EORTC 'ye göre sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmaya göre 10 hasta kesin İK 42 hasta IA (3 kesin +10 yüksek olasılıklı+ 29 düşük olasılıklı)olarak sınıflandırıldı. Hastaların klinik sınıflandırılması alt hastalıkları ve laboratuvar bulguları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Kesin Hastalar

Konak faktörün yanısıra 5 hastada kan kültüründe, 5 hastada ise doku kültüründe *Candida* üremesi, 3 hastada ise doku kültüründe *Aspergillus* üremesi saptanmıştır. Bu hastalardan tümü antifungal tedavi almaktaydı. Bu hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kesin hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları

Kesin Hastalar	KÜLTÜR	BG	GM	CT	ANTIFUNGAL
1	Doku/ <i>C.glabrata</i>	214	0.28	Ø	+
2	Doku/ <i>C.albicans</i>	>523	0.66	Ø	+
3	Doku/ <i>C.glabrata</i>	117	0.18	Ø	+
4	Doku/ <i>C.tropicalis</i>	89	0.22	Ø	+
5	Doku/ <i>C albicans</i>	>523	2.61	Ø	+
6	Kan/ <i>C albicans</i>	486	0.24	Ø	+
7	Kan/ <i>C albicans</i>	84	0.17	Ø	+
8	Kan/ <i>C albicans</i>	98	0.14	Ø	+
9	Kan/ <i>C albicans</i>	>523	0.11	Ø	+
10	Kan/ <i>C.pelliculosa</i>	>523	0.19	Ø	+
11	Doku/ <i>A.fumigatus</i>	156	2.3	Dens alanlar	+
12	Doku/ <i>A.fumigatus</i>	93	3.39	Fokal lezyonlar	+
13	Doku/ <i>A.fumigatus</i>	523	1.09	Halo	+

BG: Beta Glukan GM: Galaktomannan CT: Computed Tomography

Yüksek Olasılıklı Hastalar

Yüksek olasılıklı hastalarda konak faktör yanında mikrobiyolojik bulgu olarak *Aspergillus* suşunun BAL ya da balgamda üremesi, radyolojik bulgu olarak ise halo, kavite , hava-hilal belirtisi ve dens alanlar alınmıştır. Bu bulgulara göre 10 hasta yüksek olasılıklı IA olarak sınıflandırılmıştır. Yüksek olasılıklı hastaların %70'i

antifungal tedavi almaktaydı. Yüksek olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Yüksek olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulgular

Yüksek olasılıklı	KÜLTÜR	BG	GM	CT	ANTIFUNGAL
1	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	>523	0.6	Kavite	-
2	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	<7	0.8	Halo	+
3	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	117	0.65	Kavite	-
4	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	>523	0.21	Kavite	+
5	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	<7	0.55	Halo	+
6	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	62	0.23	Halo	+
7	Balgam/ <i>A.fumigatus</i>	186	0.24	Halo	+
8	Balgam/ <i>A.fumigatus</i>	46	0,4	Hava hilal	+
9	Balgam/ <i>A.fumigatus</i>	141	0.81	Dens alanlar	-
10	Balgam/ <i>A.fumigatus</i>	64	0.26	Dens alanlar	+

BG: Beta Glukan GM: Galaktomannan CT: Computed Tomography

Düşük Olasılıklı hastalar

Konak faktörün yanında klinik kriterle desteklenmiş bulgularla sınıflandırılmıştır. Bu hastalardan klinik kriterlerden radyolojik bulguların yanı sıra biri hastada trekeabronşial ülserasyon, üç hastada sinonazal enfeksiyon bulgusu saptanmıştır. Düşük olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo10. Düşük olasılıklı hastaların radyolojik ve mikrobiyolojik laboratuvar bulguları

NO	KÜLTÜR	BG	GM	CT	ANTİFUNGAL
1	BAL/ Ø	<7	4.07	Dense alan	-
2	BAL/ Ø	285	0.67	Dense alan	-
3	Balgam	412	0.23	Kavite	-
4	Balgam/ <i>A.fumigatus</i>	127	0.27	Kavite	+
5	Plevral mai/ Ø	84	0.55	Halo	-
6	BAL/ Ø	91	0.28	Kavite	+
7	BAL/ Ø	198	0.28	Kavite	+
8	BAL/ Ø	96	1.7	Hava hilal	-
9	Balgam	95	0.21	Dens alan	-
10	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	163	0.24	Dense alan	+
11	BAL/ Ø	134	0.23	Dens alan	-
12	BAL/ Ø	90	0.26	Hava hilal	-
13	BAL/ Ø	80	0.32	Dens alan	-
14	Plevral mai/ Ø	65	0.11	Halo	+
15	Balgam / Ø	131	0.17	Dens alan	-
16	Balgam / <i>A.fumigatus</i>	100	0.26	Kavite	-
17	Balgam <i>A.fumigatus</i>	62	0.74	Dens	-
18	Balgam / Ø	136	0.59	Dens	-
19	Balgam Ø	104	0.55	Hava hilal	-
20	Balgam Ø	98	0.55	Dens	+
21	Balgam Ø	439	0.22	Densealan	-
22	Balgam / Ø	7	0.61	Kavite	-
23	Balgam / <i>A.fumigatus</i>	233	0.22	Dens	-
24	Balgam / Ø	313	0.65	Dens	-
25	Balgam / Ø	>523	0.26	Dense alan	-
26	Balgam / Ø	>7	0.45	Kavite	+
27	Balgam / <i>A.fumigatus</i>	>523	0.21	Dens	-
28	Balgam / <i>A.fumigatus</i>	>523	0.26	Dens	-
29	BAL/ <i>A.fumigatus</i>	103	0.24	Dens	-

BG: Beta Glukan GM: Galaktomannan CT: Computed Tomography

HASTALARIN KÜLTÜR SONUÇLARI

Mantar enfeksiyonu düşünülen 52 hasta ve 37 kontrol hasta örneğinden kültür yapıldı. Bu örneklerin 31(%60)'inde kültür sonucunda üreme görüldü. Üremelerin 10(%32)'u *Candida* ve 21(%68) 'i ise *Aspergillus* türüne aittir. Kontrol hastalarının örneklerinden yapılan kültürde üreme saptanmamıştır. Kültürde üreyen mantarların klinik örneklerle göre dağılımı tablo 11 de gösterilmiştir.

Tablo 11. Hastaların klinik örneklerinde üreyen *Candida* ve *Aspergillus*' türleri

Örnek(hasta sayısı)	Mantar(sayı)
Doku(5)	<i>C.albicans</i> (2), <i>C.glabrata</i> (2), <i>C.tropicalis</i> (1)
Kan(5)	<i>C.albicans</i> (4), <i>C.pelliculosa</i> (1)
BAL(8)	<i>A.fumigatus</i> (8)
Balgam(10)	<i>A.fumigatus</i> (10)
Doku(3)	<i>A.fumigatus</i> (3)

İM HASTALIĞI BG TEST SONUÇLARI

İM hastalığı olarak sınıflandırmış olduğumuz 52 hastanın serum örneklerinden haftada iki kez BG testi çalışıldı. Kontrol hastalarında cut –off 80pg/ml alınığında 8 hastada pozitiflik saptandı. Bu hastalardan bir hasta diyaliz hastasıyken iki hasta piperasilin tazobactam (Pip-tazo) kullanmaktaydı.

Tabloda BG testinin (cut –off 80 pg/ml) duyarlılık , özgüllük PPD, NPD değerleri sırasıyla hastaların klinik sınıflandırılmasına göre verilmiştir. Testin kappa değeri 0.58'dir. BG testinin klinik dağılıma göre istatistik değerleri tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. BG testinin klinik dağılıma göre istatistik değerleri

BG(pg/ml)	Kesin	Kesin+Yüksek olasılıklı	Kesin+Yüksek+Düşük olasılıklı
Duyarlılık	%100	%78	%80
Özgüllük	%77	%77	%77
PPD	%61	%69	%84
NPD	%100	%84	%73

İM HASTALIĞI BG CUT-OFF SONUÇLARI

İM olarak sınıflandırdığımız hastaların cut -off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları tablo 13'de belirtilmiştir.

Tablo 13. BG testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri

BG(pg/ml)	Duyarlılık	Özgüllük
>62	%84	%75
>84	%78	%77
>90	%71	%83
>104	%53	%86

İA GAKLAKTOMANNAN TEST SONUÇLARI

GM testi 10 günden fazla nötropenisi (<500 nötrofil) devam eden 42 İA hastanın serum örneğinden haftada iki kez çalışıldı. Kültür ile eş zamanlı alınan serum örnekleri ve kontrol grubunu oluşturan hastaların serum örneğinden test çalışıldı. GM testinde İA olarak sınıflandırdığımız hastaların serumlarında cut -off 0.5ng/ml aldığımızda kesin hastaların tümünde, yüksek olasılıklı hastaların %60'ında düşük olasılıklı hastaların %65'inde pozitiflik saptandı. Kontrol hastalarındaki GM serum değerlerinden (cut -off 0.5ng/ml) 5 hastada pozitiflik saptandı. Bu hastaların ikisi sefalosporin tedavisi aldı.

Testin, duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD değeri sırasıyla (cut-off 0.5ng/ml) %47, %89, %83, %60'dır. Testin kappa değeri 0.38'dir

İA GAKLAKTOMANNAN CUT-OFF SONUÇLARI

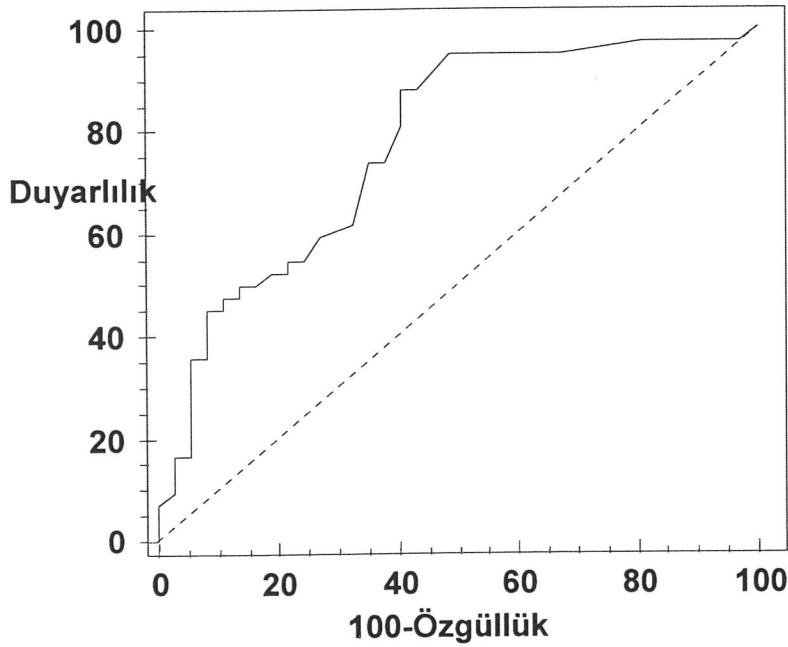
İA düşünülen hastaların serumunda çalışılan GM testinin cut -off değerlerine duyarlılık ve özgüllükleri tablo 14'de belirtilmiştir. Testin cut-off değeri yükseldikçe duyarlılık düşerken özgüllüğü yükselmektedir.

İA 'lu hastalarda GM testinin ROC eğrisinde duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirdiğimizde en iyi cut-off ≥ 0.5 ng/ml olduğu görüldü. (Grafik2)

Tablo 14. GM testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri

GM cut-off(ng/ml)	Duyarlılık	Özgüllük
>0.22	%88	%59
>0.3	%54	%78
>0.5	%47	%89
>0.55	%35	%91
>0.6	%30	%94
>0.7	%19	%94

Gal.
1



Grafik 2. GM cut-off değerinin ROC (Receiver Operating Characteric) eğrisi gösterilmiştir.

IA BG SONUÇLARI

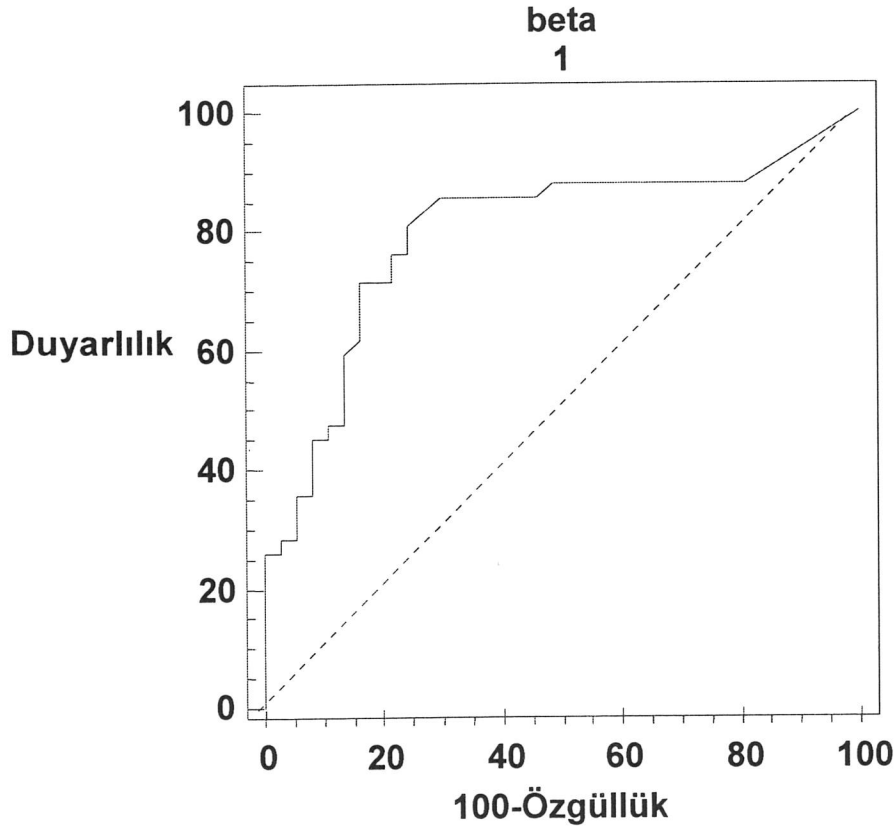
IA olarak sınıflandırdığımız 10 günden fazla nötropenisi (<500 nötrofil) devam hastaların serumlarından haftada iki kez BG testi çalışıldı. Cut-off 80 pg/ml alındığında kesin hastaların hepsinde, yüksek olasılıklı hastaların %50'sinde düşük olasılıklı hastaların %86'sında pozitiflik saptanmıştır. Testin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD değeri (Cut-off 80 pg/ml) sırasıyla %78-; %78, %80, %76 bulunmuştur. Testin kappa değeri 0.56'dır.

IA BG CUT-OFF SONUÇLARI

IA olarak sınıflandırdığımız hastaların cut –off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları tablo15 de belirtilmiştir. IA hastalarında BG testinin ROC eğrisine göre duyarlılık ve özgüllüğü değerlendirdiğimizde en iyi cut –off ≥ 62 olarak belirlendi. (Grafik 3)

Tablo 15. İA hastalarda BG testinin cut-off değerlerine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri

BG(pg/ml)	Duyarlılık	Özgüllük
>62	%80	%75
>69	%76	%78
>84	%71	%78
>96	%59	%86
>118	%47	%89



Grafik 3. BG cut-off değerinin ROC eğrisi gösterilmiştir.

ASPERGILLUS PZR SONUÇLARI;

İA sınıflandırmış olduğumuz hastaların serumlarından *A.fumigatus* rtPZR çalışıldı. Kesin hastalardan ikisinin serumda, yüksek olasılıklı hastaların %50'si, düşük olasılıklı hastalardan %20'sinde pozitiflik saptandı. Testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD'i sırasıyla %30, %86, %72, %52 bulunmuştur. Kontrol hastalarımızda 5 yalancı pozitiflik saptanmıştır. Bunların kültürlerinde üreme tespit edilmedi. Testin kappa değeri 0.16 bulundu.

IA BG & GM TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

IA olarak sınıflandırdığımız 42 hastanın eş zamanlı çalışılan GM (cut-off 0.5) ve BG (cut -off 80 pg/ml) testler birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, PPD,

NPD sırası ile %83, %72, %77,%79.BG ve GM testinin beraber değerlendirildiğinde GM testin duyarlılığı yükselmiştir. GM bulguları ile BG bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark vardı ($p<0,05$).

Tablo 16. İA hastaların örneklerinde GM bulguları ile BG bulguları karşılaştırılması

GM SER BG SER	POZİTİF	NEGATİF	P
POZİTİF	18(%42)	15(%35)	P< 0.05
NEGATİF	4(%9,5)	5(%11)	

SER:SERUM

IA BG& PZR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

IA olarak sınıflandırdığımız 42 hastanın eş zamanlı çalışılan BG (cut –off 80 pg/ml) ve *Aspergillus fumigatus* rtPZR testleri birlikte değerlendirildiğinde testin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırası ile %85,%78,%81,%82’dir. BG bulguları ile PZR bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark vardı ($p<0,05$)

Tablo 17.İA hastaların örneklerinde BG ve rtPZR bulguları karşılaştırılması

PCR SER BG SER	POZİTİF	NEGATİF	P
POZİTİF	11(%26)	22(%52)	P< 0.05
NEGATİF	2(%5)	7(%17)	

SER:SERUM

IA GM& PCR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

IA olarak sınıflandırdığımız 42 hastanın eş zamanlı çalışılan GM (cut-off 0.5) ve *Aspergillus fumigatus* rtPZR testleri birlikte değerlendirildiğinde testin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırası ile %69, %72, %78, %61’ dir. GM bulguları ile PZR bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark vardı($p<0,05$)

Tablo 18. İA hastaların örneklerinde GM ve PZR bulguları karşılaştırılması

PCR SER	POZİTİF	NEGATİF	P
GM SER			
POZİTİF	6(%14)	16(%38)	P< 0.05
NEGATİF	8(%19)	13(%30)	

SER: SERUM

IA GM, BG PCR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

IA olarak sınıflandırdığımız 42 hastanın eş zamanlı çalışılan GM (cut-off 0.5) ve *Aspergillus fumigatus* rtPZR ve BG testleri birlikte değerlendirildiğinde testin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırası ile %92, %86; %73, %89 idi.

CANDIDA PZR SONUÇLARI;

IC olarak sınıflandırmış olduğumuz hastaların serumlarında *C.albicans* rtPZR çalışıldı. Kesin hasta olarak sınıflandırmış olduğumuz hastaların 4 hastanın serumunda pozitiflik saptandı. Bu hastaların kan kültürlerinde *C.albicans* üremesi tespit edildi ve konvansiyonel testlerle tür tayini yapıldı. Testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD'i sırasıyla %44, %81, %36, %85 bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

İME hematolojik malignitesi olan immünsüpresif pek çok hastada tespit edilen en önemli mortalite ve morbidite sebebidir (1). Bunun sebebi hematolojik malignitesi olan hastaların tedavisinde kullanılan sitotoksik kemoterapi ajanları, hemopoetik stem cell transplantasyonu, kortikosteroid, siklosporin ve immünsüpresif ajan kullanımının fırsatçı mantar enfeksiyonuna yol açmasıdır (136) .

İM enfeksiyonlarında en sık etken *Candida* türleri iken son yıllarda, *Aspergillus* türlerinin görülme sıklığının da arttığı bildirilmiştir (1). *Candida* türlerinin etken olduğu mantar enfeksiyonlarının yarısından fazlasında *C. albicans* izole edilirken non- *albicans* türlerinde de artışın görüldüğünü rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (137). Küflerin etken olduğu mantar enfeksiyonlarda en sık etken *Aspergillus* türleridir. *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium*, *Zygomycetes* türlerinde de artış gözlemlendiği epidemiyolojik çalışmalarla bildirilmiştir (138) . *Aspergillus* türleri içinde en sık izole edilen tür ise *A.fumigatus*' dur. Son dönemlerde *A.terreus* türlerinin izolasyonunda da artış gözlemlendiği bildirilmiştir (139). Bu çalışmada İM enfeksiyonlu hastaların klinik örneğinin kültüründen en sık *Aspergillus* daha sonra *Candida* türü izole edildi. *Candida* türü içinde ise en sık *C.albicans* türü tanımlandı.

Hematolojik malignitesi olan hastalarda mantar enfeksiyonu gelişme sıklığı ve bu hastalarda görülen alt hastalıkları hakkında pek çok çalışma yapılmıştır. Pagano ve ark. (140) mantar enfeksiyonu gelişen hastalarda en sık altta yatan hastalığın %12

AML, %6.5 ALL olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise , 249 kandidemili olguda en sık altta yatan hastalığın %69 ALL, %19 lenfoma ,%9 sıklıkla MM olduğu bildirilmiştir (7). Bunların dışında literatürde hafif yada minimal immün yetmezlik (DM, reaktif tüberküloz, düşük doz steroid kullanımı vb.) ve hatta bağışıklığı yeterli kişilerde bile sistemik mantar enfeksiyonu tanımlanmıştır (141). Bu çalışmada en sık alt hastalık AML iken ikinci sıklıkta ALL daha sonra solid organ kanserleri, DM, KOAH olduğu belirlendi.

İM enfeksiyonunda açıklanamayan ateş, akciğer tutulumu, oral kandidoz, mukozit, hepatosplenik kandidoz, intraserebral lezyonlar görülebilir (142). İA hastalarda %80-%90 oranında akciğer tutulumuyla kendini gösterirken başka klinik formlarla da karşımıza çıkmaktadır (67). İM enfeksiyonlarında erken tanı ne kadar hızlı olursa bu hastalıklara bağlı mortalite oranı azalmaktadır. Almirante ve ark. (143) yaptıkları bir çalışmada *Candida* enfeksiyonlarına bağlı mortalite oranı %44 olarak bildirirken , Pagano ve ark. (140) İA bağlı mortalite oranını AML 'li hastalarda da %80'e kadar değişen miktarda bildirmişlerdir.

Yüksek mortalite oranının görülmesine bağlı olarak mantar enfeksiyonlarının tanısında yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde pek çok yeni yöntem gündeme gelirken direkt mikroskopik inceleme ve kültür vazgeçilmez konvansiyonel yöntemlerdir. Bu yöntemler için alınacak örnekler invaziv işlem gerektiren biyopsi ve steril vücut sıvılarıdır. Ancak hastaların hematolojik problemleri ile birlikte koagülasyon bozukluklarının olması invaziv işlemleri zorlaştırır. Bu hastalar balgam gibi invaziv işlem gerektirmeyen örnekleri bile verememektedirler. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı az olmakla birlikte hızlı ve ucuz olması en önemli avantajıdır. Mantar elemanlarının bazı hasta örneklerinde görülmesi patognomik olup direkt tanıyı koydurabilir (144). Kültür yöntemlerinden en önemlisi kan kültürleridir. Yapılan bir araştırmada kandidoz enfeksiyonlarında kan kültürlerinin duyarlılığı %50 olduğu bulunmuştur (145). Küf mantarlarından *Aspergillus* türlerinin kan kültüründe üremesinin saptanması güçtür. İA olgularının çoğunda kan kültüründe üreme görülmez. Üreme olsa bile klinik sınıflandırmada değerlendirmeye alınmamıştır (65). Klinik sınıflandırmada önemi olan sistemik *Fusarium* enfeksiyonlarında kan kültüründe üreme %40 oranında

görüldüğü bildirilmiştir (146). Yapılan pek çok çalışmada ,balgam ve BAL örneklerinin kültürünün özellikle *Aspergillus* enfeksiyonlarında klinik ve radyolojik bulgularla birleştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (147). Kültür de üreyen *Aspergillus* türlerinin tanımlanması antifungal kullanımında amfoterisin B'ye doğal dirençli *A. terreus* ve *A. nidulans* gibi suşlar için son derece önemlidir. Bununla birlikte kültür yönteminin yavaş ve daha az duyarlı olması dezavantajıdır. Ayrıca kültürde patojen türlerin 37°C'de saprofit türlere göre daha hızlı (24-48 saat içinde) ürediği de unutulmamalıdır (148). Non-nötropenik hastalarda beş yıllık yapılan bir çalışmada BAL örneği kültüründe *Candida* türlerinin üremesi antifungal terapiye başlanması için yeterli olmadığını ve klinik tanının histolojik ve mikrobiyolojik bulgularla desteklenmesi gerektiği kanatine varılmıştır. (149). Bu çalışmada sistemik mantar enfeksiyonu olarak sınıflandırılan 52 hastanın klinik örneklerinin kültüründe %60'ında mantar üremesi saptandı. Üremelerin %32'u *Candida* ve %68 'i ise *Aspergillus* türüne aittir. BAL, balgam , endotrekeal aspirat, doku ve kan örneklerinin kültüründe üreme oldu.

Bu kadar mortal seyreden bir hastalık olmasına rağmen klinik radyolojik bulguların spesifik olmaması ve laboratuvarında kullanılan kültür ve mikroskopi gibi konvansiyel yöntemlerinin duyarlılığının düşük olması erken tanıdaki yaşanan en önemli problemlerdir (67). Son zamanlarda konvansiyenel yöntemlerle birlikte daha kolay, daha hızlı ve daha erken sonuç verebilecek serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (150). Kültür dışındaki bu tanı yöntemlerinden en çok kullanılan ve FDA (Food and Drug Administration, USA) tarafından 2003 yılında onaylanmış olan, *Aspergillus* türüne özgül GM antijeninin ELISA ile gösterildiği, Platelia *Aspergillus* (Bio-Rad, Marnes La-Coquette, Fransa) testidir (65) .GM antijen varlığı serum, BAL, plevral mayi, BOS ve akciğer dokusu gibi pek çok örnek kullanılarak araştırılabilir (151).

Yapılan bir meteanaliz çalışmasında GM testinin cut-off değerlerinin yüksek alındığı durumlarda duyarlılığın düşürek özgüllüğün yükseldiği bildirilmiştir (110).

Son yıllarda GM testi ile ilgili pek çok çalışma yapılırken özellikle nötropenik ateşli hasta gruplarında galaktomannan cut off değerinin yüksek değerler yerine düşük

değerlerin alınması önerilmektedir (152). Bu öneriler doğrultusunda üretici firma (Platelia *Aspergillus*; Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) ve FDA önerisi ardışık örneklerde cut -off 0.5 ng/ml olarak belirlenmiştir (109).

Bu çalışmada , IA olarak tanımlanan hastaların GM testi değerlendirilirken üretici firmanın önerisi doğrultusunda cut-off değeri 0.5 ng/ml olarak alındı. Cut off değeri yükseldikçe duyarlılık oranı düşerken testin özgüllük oranının yükseldiği tespit edildi.

İmmünsüpresif hastalarda GM testinin etkinliğini araştırmak amacıyla yapılan metaanaliz çalışmalarının birinde (cut -off değeri 0.5 ng/ml) testin duyarlılığı %78 ve özgüllüğü %81 olarak bildirilmiştir (110).

Prospektif bir çalışmada GM testinin((cut-off 0.5ng/ml) duyarlılığı ve özgüllüğü , sırasıyla %33.3, %98.6 olarak bildirilmiştir (154).

Benzer bir çalışmada Tănase ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serum GM testinin (cut- off 0.5ng/ml) duyarlılığı ve özgüllüğü PPD, NPD sırasıyla %85, %91,%46, %99 olarak bildirilmiştir (155).

Bu çalışmada 42 IA olan hastanın serum örneğinden GM testi çalışıldı ve testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD değeri sırasıyla(cut-off 0.5ng/ml) %47, %89, %83, %60 olarak belirlendi.

Bu hastalarda mantar kolonizasyonunun sistemik enfeksiyondan ayırt edilmesi güç olmakla birlikte kolonizasyonun hızla enfeksiyona dönüşebileceği ve vücuda yayılma eğilimi gösterebileceği dikkate alınarak risk altındaki hastaların serum örneklerinde haftada iki kez antijen aranması önerilmektedir (79). GM testi tanıda kullanıldığı gibi dolaşımdaki GM konsantrasyonu fungal doku hasarı ile uyumlu olduğu için tedaviye cevabın izlenmesinde de kullanılabilir (153).

GM testinin serum çalışmalarının yanısıra BAL örneği ile yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Hematolojik maligniteli hastaların BAL örnekleri ile yapılan bir çalışmada (cut –off 1.1 ng/ml) duyarlılık %100 özgüllük ise %98.1 olarak bildirilmiştir (156). Yoğun bakım hastalarında yapılan bir çalışmada İA olan hastaların BAL ve serum örneklerinin(cut- off 0.5 ng/ml) karşılaştırmasında BAL

örneğin GM değerlerinin serum örneklerine göre duyarlılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (157). Bununla birlikte hematolojik maligniteli hastalarda genellikle aldıkları tedavilere bağlı olarak nötropeni gelişebildiği için BAL örneklerini elde etmek güçtür.

Racil ve ark. (158)İA olan hastaların serum ve BAL örneklerinde yaptığı bir çalışmada diğer çalışmaların aksine GM BAL değerlerinde orta derecede duyarlılık bildirilirken yüksek derecede özgüllük ve pozitif prediktif değer bildirmişlerdir. Aynı zamanda BAL galaktomannan değerlerinin nötropeni ve antifungal tedaviden etkileneceği bildirilmiştir.

Testin yalancı pozitifliği de önemli sorun teşkil etmektedir. Bu sorun daha çok subklinik enfeksiyon, gastrointestinal bölgede kolonizasyon, antifungal tedaviler ve özellikle yenidoğan ve süt çocuklarındaki beslenmeyle ilişkilendirilmektedir. Yapılan pek çok çalışmanın sonucunda yalancı pozitiflik oranı düşünülerek GM testinin seri örneklerle çalışılabileceği bildirilmektedir (159). Yenidoğan çocukların bağırsaklarında bulunan *L.bifidobacterium* 'un lipoteikoik asit yapısının Platelia EIA 'da kullanılan monoklonal antikor moleküler benzerliğinden dolayı pediatrik hastalarda GM testi yanlış pozitifliklere yol açabilmektedir (160).Bununla birlikte IM mantar hastalığı düşünülen hastaların beta laktam antibiyotik kullanımı ve testte kullanılan sıçan monoklonal EB-A2 antikor ile çeşitli küflerin çapraz reaksiyona girmesi yalancı pozitifliklere neden olmaktadır (161,162). Bu çalışmada, kontrol hastalarında çalışılan GM testinde 5 hastanın serumunda (cut-off 0.5ng/ml) pozitiflik saptandı. Bu hastalardan ikisi sefalosporin tedavisi almaktaydı.

Diğer bir serolojik test ise *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki küf ve maya mantarlarının hücre duvarında bulunan komponenti saptayan BG testidir (50). BG testinin temeli denizde yaşayan Horseshoe crab olarak bilinen bir canlıdan izole edilen faktör G ile beta glukanın kimyasal etkileşimine dayanmaktadır (163). BG testi ile yapılan bir metaanaliz çalışmasında 594 kesin ya da yüksek olasılıklı hastanın serumunda BG çalışılmış ve cut-off 80 pg/ml alındığında testin duyarlılığı %76, özgüllüğü %85 olarak bildirilmiştir (164). Transplant hastalarında yapılan bir çalışmada ise 14 kesin ve yüksek olasılıklı hastanın serumlarında BG testinin cut-off

değeri 60 pg/ml alındığında ise duyarlılık %64, özgüllük %9, PPD%14, NPD %50 olarak bildirilmiştir (165).

Odabaşı ve ark (116) İM hastalığı olan 30 hastanın serum örneklerinden çalışılan BG testini değerlendirerek her hastanın en az bir serum örneğinde klinik tanıdan on gün önce testin pozifleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca testin NPD %100, özgüllüğü tek örnekte %96, ardışık örnekte ise %100 bulunmuştu.

Lamoth ve arkadaşları(166) üçüncü Avrupa Lösemi enfeksiyonları konferansında 414 İM enfeksiyonlu (215 kesin yada yüksek olasılıklı) hastaların ardışık serumunda çalıştıkları BG testinin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırasıyla %49, %98,%83,%94 olarak bildirmişlerdir. Testin duyarlılığın yükseltmek için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik bulgularla birleştirilmesi gerektiği rapor edilmiştir.

BG testinin İM enfeksiyonlarının tanısında önemini vurgulamak için yapılmış bir meteanaliz çalışmasında serum BG testinin duyarlılığı%76, özgüllüğü ise %85 olarak bildirilmiştir (167).

Çok merkezli yapılan bir çalışmada BG testinin (cut-off değeri 80 pg/ml)duyarlılığı ,özgüllüğü, PPD, NPD sırasıyla %64,%92 %89, %73 olarak bildirilmiştir (117).

Bu çalışmada invaziv mantar hastalığı olan 52 hastadaki BG testi değerlendirilirken cut –off 80 pg/ml alındı. Testin (cut –off 80 pg/ml duyarlılığı ve özgüllüğü , PPD, NPD sırasıyla %80, %77, %84, %73 olarak saptanmıştır.Bununla birlikte BG testinin duyarlılığı kesin hastada %100, (kesin hasta+yüksek olasılıklı) hastada %78, (kesin +yüksek olasılıklı +düşük olasılıklı) hasta %80 olarak hesaplandı. Cut off değeri yükseldikçe duyarlılık oranı düşerken testin özgüllük oranının yükseldiği tespit edildi.

Çalışmalarda duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olmasından dolayı 2008 EORTC sınıflamasında mikrobiyolojik kriterler arasında yer almakta olan BG testinin sistemik mantar enfeksiyonu olan hastalarda kullanılması gerektiği bildirilmiştir (65).

İA'lu hastalarda da BG testinin önemini vurgulayan literatürde çalışmalar vardır. Senn ve arkadaşları (163)30 kesin veya yüksek olasılıklı(13IA,15IA, ve 2 karışık invaziv mantar

enfeksiyonlu)sınıflandırılan ALL'li hastaların serumlarında çalışılan BG testinin duyarlılığını, özgüllüğünü PPD, NPD'lerini %63, %96, %79, %91 olarak bildirmişlerdir.

Metan ve ark (168) İnvaziv pulmoner aspergilloz(İPA) olarak tanımladıkları 50(kesin+yüksek olasılıklı) hastada BG testininin((cut –off 80 pg/ml) duyarlılık, özgüllük ve PPD, NPD sırasıyla %66, %75.6, %63.4,%77.6 olarak bildirmişlerdir.

IA olarak tanımlanan 42 hastanın serum örneğinden çalışılan BG testinde (cut –off 80 pg/ml) duyarlılık, özgüllük ve PPD, NPD sırasıyla %78, %78, %80, %76 bulunmuştur

Testin dez avantajı beta glukanın belli bir mantar türüne özgül olmamasıdır.(50) Yapılan bir çalışmada bu testte karşılaşılan yalancı pozitiflik durumları mukozit, bakteriyel kolonizasyon, antibiyotik kullanımı eritrosit ve trombosit filtre kan ürünleri, kateter yolu ile tüplere kan toplama olarak bildirilmiştir. Metan ve arkadaşlarının (169)İA' lu Pıp-tazo kullanan hastalarda yaptıkları çalışmada hastaların BG testi değerlerinin yüksekliğinin Pıp-tazo kullanımıyla ilgisi olmadığını bildirmişlerdir. Diyaliz hastalarında kullanılan selüler membranların serum BG seviyelerini yükselttiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (51).

Bu çalışmada kontrol hastalarında BG değeri yüksek olan iki hastanın Pıp –tazo kullanımı , bir hastanın ise diyaliz hastası olduğu tespit edildi.

IM hastalıklarının tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerin gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri ve bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olmaları nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin giderek artan oranlarda uygulanması, bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adımdır. Mantar enfeksiyonlarının moleküler tanısı, ya doğrudan hasta örneği ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilir. Moleküler tanının ilk basamağında öncelikle, hastada varlığından kuşku duyulan mantar hastalığının kanıtlanması, ikinci aşamada ise enfeksiyon etkeni olan mantarın tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

Tanıda pek çok moleküler yöntem kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerle ilgili olarak örnek kullanımı (doku , serum, BAL) ekstraksiyon protokolu, amfifikasyon sistemleri (nested, konvansiyonel) protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve konvansiyonel) yada primer seçimi (*Aspergillus* türleri yada tüm küflere özgül, panfungal) gibi çok sayıda çözülmemiş sorunlar bildirilmektedir (171). Moleküler yöntemlerden rt PZR serum , steril vücut sıvıları ve dokuda da çalışılması kabul gören moleküler yöntemlerdendir (172,173). Fakat henüz standardize edilememiştir. Moleküler tanısal yöntemlerin standardize edilmesi ve rutin uygulama alanına sokulabilmesi için çok merkezli çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Klingspor ve arkadaşlarının (174). yaptıkları çalışmada İM enfeksiyonu düşünülen hastaların hepsinde serum ve farklı örneklerinden rt PZR ile *Candida* PZR duyarlılığı %83, *Aspergillus* PZR duyarlılığı ise %50 olarak bildirilmiştir.

Avni ve ark (175) yaptıkları bir meteanaliz çalışmasında IC olarak tanımladıkları 963 hastanın serum örneğinde PZR çalışıldığını testin duyarlılığını %85 olarak bildirirken bunların %38'inde kültür pozitifliğinin olduğunu bildirilmiştir.

Badiee ve arkadaşlarının 13 kemik iliği transplantlı hastada 94 serum örneğinde yaptıkları bir çalışmada PZR testinin duyarlılığı, özgüllüğü PPD, NPD sırasıyla %86, %82, %96, %49 olarak bildirilmiştir (176).

Bu çalışmada 42 İA rtPZR çalışıldı. Testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD'i sırasıyla %30, %86, %72, %52 iken Ayrıca 10 kesin İK'li hastada r PZR çalışıldı ve testin duyarlılığı özgüllüğü, PPD, NPD'i sırasıyla %44, %81, %36, %85 bulundu.

Schabereiter ve ark (57) İM enfeksiyonu düşünülen hastaların örneklerinden *Candida* PZR ve *Aspergillus* PZR ve kültür sonuçları ile karşılaştırılmasında PZR ve kültür pozitifliği %64,5 saptanırken, altı örnekte ise kültürde üreme görülmezken real time PZR' da pozitiflik saptandığı bildirilmiştir.

Moleküler tanısal testlerde yalancı pozitifliğe dikkat etmek gerekir. Yalancı pozitiflik sıklıkla klinik örneğin kontaminasyonundan kaynaklanabilir. Mantar enfeksiyonlarının tanısında önemli bir hasta örneği olan solunum yolu örnekleri ne yazık ki birçok mantar türü ve bakterilerle karışık olan örneklerdir. Dolayısıyla

mantar nükleik asitlerini yıkabilecek DNaz ve RNaz'ın bol olabileceği bu örneklerden doğru amplifikasyon kolay değildir (178). Bundan dolayı rt PZR testini steril vücut sıvılarında kullanmak gerekir (172).

Son zamanlarda GM, BG, PZR testlerinin ikili veya üçlü beraber duyarlılığının karşılaştırıldığı çalışmalarda farklı oranlarda duyarlılıklar bildirilmektedir. Kawazu ve ark (177) hematolojik malignitesi olan ve İA düşünülen 9 kesin, 2 yüksek olasılıklı 13 düşük olasılıklı hastanın kan örneklerinden GM, PZR ve BG testlerinin duyarlılıklarını sırası ile %100, %55 ve % 55 olarak bildirmişlerdir. Challier ve ark(179) yaptığı *A.fumigatus* 'a spesifik PZR ve GM testlerinin birlikte yapıldığı bir çalışmada 26'sı kesin ve yüksek olasılıklı immünsupresif hastalarda % 84.6'sinde PZR pozitif iken GM testi %76.9'sinde pozitif olduğu rapor edilmiştir.

Kami ve arkadaşları 33 IPA'lı hastanın serumunda çalışılan PZR, ELISA, BG duyarlılığını sırasıyla %79, %58, %67 olarak bildirmişlerdir (122).

Farklı bir çalışma olarak İK tanımlanmış 55 hastada PZR BG ve kan kültürü karşılaştırılmış. PZR testinin duyarlılığı BG testinin duyarlılığından daha yüksek saptanırken BG testi ya da PZR testi ile kültür yönteminin birlikte değerlendirilmesinde kültür yönteminin duyarlılığının yükseldiği saptanmıştır. (114)

Bu çalışmada, IA olarak sınıflandırılan 42 hastanın eş zamanlı çalışılan GM (cut-off 0.5) ve *Aspergillus fumigatus* rt PZR ve BG (cut -off 80 pg/ml) testleri ikili ya da üçlü değerlendirildiğinde testlerin duyarlılığının yükseldiği belirlendi.

6.SONUÇLAR

Özellikle riskli hasta gruplarında gerçek ya da fırsatçı patojen mantarların neden olduğu enfeksiyonların tanısında kültür, halen değerini koruyan standart konvansiyonel yöntemlerdir. Bu yöntemlerin uygulama ve değerlendirmelerinde karşılaşılan bazı sorunlar nedeniyle, günümüzde daha hızlı, kolay uygulanabilir, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip yeni tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu hastalarda hızlı ve özgül tanı için GM, BG ve PZR testleri kullanılabilir.

Bu çalışmada IA hastalarında BG, GM, rtPZR testlerinden BG testinin duyarlılığının , GM testinin ise özgüllüğünün en yüksek olduğu ve üç testin birlikte kullanımının duyarlılığı yükselttiği bulunmuştur.

IM hastalığının tanısında kullanılan rtPZR'ın standardize olması için yeni çalışmalar yapılması gerektiği kanatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal at university hospital. *J Infect* 1996; 33(1): 23-32.
2. Bow EJ, Loewen R, Cheang MS, Schacter B. Invasive fungal disease in adults undergoing remission - induction therapy for acute myeloid leukemia the pathogenic role of antileukemic regimen. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 361-369.
3. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: Predisposing factors and impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1962 -1969.
4. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999; 1(4): 247-261.
5. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect.* 2001:8-24
6. Uzun O, Anaissie EJ. Predictors of outcome in cancer patients with candidemia. *Ann Oncol* 2000; 11(12): 1517-21.

7. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Clin Infect Dis 1999; 28: 1071-1079.
8. Abbasi S, Shenep JL, Hughes WT, Flynn PM. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. Clin Infect Dis 1999; 29: 1210-1219.
9. Wallace JM, Lim R, Browdy BL, et al. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. Chest 1998; 114:131-137.
10. Von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: Early diagnosis improves survival. Respiration 1995; 62: 341-347.
11. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Dugs 2007; 67(11): 1567-601.
12. Arda B. İnvaziv mantar enfeksiyonu tanısında kullanılan radyolojik ve serolojik testlerle ilgili tanımlar. ANKEM Derg. 2009; 23(2): 122-125.
13. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Güneş kitabevi 1999; 1081-6, 1145-8, 1159-1165.
14. Mitchell TG. Kingdom Fungi: Fungal phylogeny and systematics. In: Merz WG, Hay RJ (eds). Medical mycology Topley Wilson's Microbiology and Microbiol Infections(10th). ASM Press. 2005. P:43-68
15. Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Hazen KC, Howell SA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington 2007; p. 1762.

16. DiNubile MJ, Hille D, Sable CA, Kartsonis NA. Invasive candidiasis in cancer patients: observations from a randomized clinical trial. *J Infect* 2005; 50(5): 443-449.
17. Oliveira PM, Mascarenhas RE, Lacroix C et al. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(3): 239-244.
18. Trofa D, Gacser A, Nosachuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4): 606-625.
19. Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(1): 32-45.
20. Tümbay E. *Candida* Türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara Öncü Basımevi Günes Kitabevi 1999; 1081-1086.
21. Koç A.N. Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu 2002 Simpozyum kitabı* S; 37-45 Eskişehir.
22. Warren NG, Shadomy HJ. *Candida, cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (6th edition). Washington DC, ASM Press 1995; 723-737.
23. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends microbiol* 2001; 9(12):591-596.
24. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 2011; 19(5):241-7.

25. Ghannoum MA, Abu El-Teen K, Radwan SS. Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. *Mykosen* 1987; 30(8): 371-378.
26. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(1) 85-93.
27. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 2001; 44(9-10): 361-367.
28. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 452-456.
29. Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 1999; 48: 671-679.
30. Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012; 88(6): 250-65.
31. Welsh O, Vera –Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. *Clin Dermatol* 2010; 4; 28(2): 151-159.
32. Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8(5): 448-456.
33. Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 2012; 30(3): 270-278.
34. Geers TA, Gordon SM. Clinical significance of *Candida* species isolated from cerebrospinal fluid following neurosurgery. *Clin Infect Dis* 1999; 28(5): 1139-1147.

35. Li WY, Wu VC, Lin WC, Chen YM. Renal *Candida tropicalis* abscesses in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Kidney Int* 2007; 72(3): 382.
36. Lefort A, Chartier L, Sendid B. Diagnosis, management and outcome of *Candida* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(4): 99-109.
37. Rammert B, Desiardins A, Lortholary O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses* 2012; 55(3): 74-84.
38. Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candiduria: A review. *Clin Infect Dis* 2001; 32(11): 1602.
39. Bukhary ZA. Candiduria: a review of clinical significance and management. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008; 19(3): 350-360.
40. Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S, Chandy R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses* 2005; 48(5): 347-351.
41. Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP, Doern GV. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35(1): 89-91.
42. Odds FC, Bornaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8): 1923-1929.
43. Dealler, SF. *C. albicans* colony identification in 5 minutes in a microbiology laboratory. *Clin Microbiol* 1991; 29(5): 1081-1082.
44. Heelan JS, Siliezar D, Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11): 2847-2849.

45. Bernal S, Martin Mazuelos E, Chavez M, Coronilla J, Valverde A. Evaluation of the new API Candida system for identification of the most clinically important yeast species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32(2): 217-221.
46. B. L. Zimmer and Glenn D. Roberts. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1979; 10(3): 380-381.
47. Maesaki S. Serpdiagnosis for deep-seated mycoses. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43(4): 233-237.
48. Ohki M, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab. *FEBs Lett* 1980; 120: 217-220.
49. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Tanaka K, Hara K. (1,3) Beta d Glukan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin Lab Anal* 1995; 9:334-339.
50. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1-3)beta d- glukan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33;(12):3115-3118.
51. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1-->3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int.* 2001; 60(1): 319-323.
52. Kato A, Takita T, Furahashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishiada A. Elevation of blood beta D glukan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 2001; 89: 15-19.
53. Mohr JF, Sims C, Paetznick V, et al. Prospective survey of (1→3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol* 2011; 49(1): 58-61.

54. Montagna MT,Coretti C,Lovero G et al. Diagnostic Performance of 1→3-β-d-Glucan in Neonatal and Pediatric Patients with Candidemia. *Int J Mol Sci* 2011; 12(9): 5871-5877.
55. Billee J. New Nonculture –based methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*2010; 16(5): 460-464.
56. Mikulska M, Calandra T, Sanquinetti M, Poulain D,Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia *Crit Care* 2010; 14(6).
57. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 906-914.
58. Fricke S, Fricke C, Schimmelpfenning C. et al. A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J Appl Microbiol* 2010; 109(4): 1150-1158.
59. Ozer S,Yücesoy M. Detection of *Candida* DNA in simulated blood samples by polymerase chain reaction. *MikrobiyolBul* 2007; 41(3): 419-428.
60. Loeffler J. Henke N,Hebart H et all qantification of fungal DNA by using fluorecence resonance enegy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 586-590.
61. PhamA, Tarrand JJ, May Gea. Diagnosis of invasive mold infection by real time qantitative PCR. *Am J Clin Pathol* 2003 119: 38-44.
62. Bretagne S,Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(3): 361-368.

63. White P.L,A.E.Archer ve R.A.Barnes 2005.Comparision of non –culture based methods for detection of systemic fungal infection , with an emphasis on invasive *Candida* infections. J Clin Microbiol 43: 2181-2187.
64. Aşçıgölu S, Rex JH,de Pauw B. et al Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromisedpatients with cancer and hematopoieticstemcell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002 ; 1; 34(1): 7-14.
65. De-Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP.et al. Revised definitions of invasivefungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/InvasiveFungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. ClinInfect Dis 2008 ; 15; 46(12): 1813-1821.
66. Verweij PE and Brandt ME. *Aspergillus*, *Fusarium*, and other opportunistic moniliaceous fungi. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology (9th ed) vol. 2. ASM Press, Washington 2007; 1802–1838.
67. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 781-805.
68. Warris A, Gaustad P, Meis JF, Voss A, Verweij PE , Abrahamsen TG. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. J Hosp Infect 2001; 47; 143-148.
69. Ozyaral O, Germeyan H, Johansson CB. House dust mold in Istanbul. I. Detection of mold flora in bed dust. Mikrobiyol Bul 1088; 22(1): 51-60.
70. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation interim result of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol 43(Suppl.1):49-58.

71. Joseph A, Stephen D. The use of respiratory –tract cultures in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1996; 100: 171-178.
72. Eltem R. Colonial and Morphological Characteristics of some *Aspergillus* Species Isolated from Vineyards in Manisa and İzmir Provinces (Turkey). TUBITAK Turk J Bot 28(2004):287-289.
73. Hong SB, Shin HD, Hong J. New taxa of Neosartorya and *Aspergillus* in *Aspergillus* section Fumigati. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 93(1-2): 87-98.
74. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galaktomannan of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun 1994; 62: 5424-33.
75. Altundal Y. Galaktomannan antijen testi: Tanı ve izlemdeki yeri. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyum Kitabı Bursa 2006; 185.
76. Seen L, Robinson JO, Schmitd S et al (1→3)- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis 2008 ; 15; 46(6): 878-885.
77. Zeichner-Ostrosky L, Alexander BD, Kett DH et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3) β -D-Glukan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis 2005; 41(5): 654-9.
78. Ener B. Fungal enfeksiyonların tanı ve izlemindeki yenilikler. ANKEM Derg 2006; 20(2): 28-32.
79. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: Mikoloji, patogenezi, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. Cerrahpaşa J Med 2003; 34(3): 140-157.
80. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 2009; 22(3): 447-465.

81. Bhabhra R, Askew DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: Role of the fungal nucleolus. *Med Mycol* 2005; 43; 1: 87-93.
82. Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 382 -389.
83. Pihet M, Vandeputte P, Tronchin G. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol* 2009; 9: 177
84. 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.
85. Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, Hortchansky P, Brakhage AA, Hertweck C. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93(2): 467-472.
86. Wasylanka JA, Moore MM. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: Evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect Immun* 2000; 68(6): 3377-3384.
87. Ghannom MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 12: 122-143.
88. Haas H. Iron –A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 2012; 3: 28.
89. Oren I, Goldstein N. Invasive pulmonary aspergillosis. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8(3); 195-200.
90. Thompson GR 3rd, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis: recent advances . *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32(6):673-681.

91. Sherif R, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: Clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(3): 242-250.
92. Ceylan E, Ertuğrul MB. Hematolojik malignitesi olmayan hasta grubunda akciğerin mantar enfeksiyonlarına klinik yaklaşım. *Klimik Derg* 2008; 21(2): 11-22.
93. Del Bono V, Mikulska M, Viscoli C. Invasive aspergillosis: diagnosis, prophylaxis and treatment. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(6): 586-593.
94. Yousem SA. The histological spectrum of chronic necrotizing forms of pulmonary aspergillosis. *Hum Pathol* 1997; 28: 650-656.
95. Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, Jindal SK *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(8): 936-944.
96. Agarwal R, Khan A, Garg M, Aggarwal AN, Gupta D. Chest radiographic and computed tomographic manifestations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *World J Radiol* 2012; 28; 4(4): 141-150.
97. Lee SI, Shepard JA, Chew FS. Pulmonary fungus ball. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170(2): 318.
98. Tierney P, Thomas M, Samuel D, Patel KS, Stafford N. Recurrent aspergilloma of the frontoethmoid sinus in a non-immunocompromised patient. *J R Soc Med*. 1996; 89(39): 165-166.
99. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008; 47(5): 674-683.

100. Nosari A, Anghilieri M, Carrafiello G, et al. Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies. *Haematologica* 2003; 88(12): 1405-1409.
101. Kradin RL, Mark EJ. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(4): 606-614.
102. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A Contribution of 1,3 beta d glukon chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galaktomannan. *J Clin Microbiol* 43(1): 299-305.
103. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* 2003; 188(2): 305-319.
104. Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabanes FJ. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 86(1): 33-49.
105. Hill TW, Loprete DM, Momany M. Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. *Mycologia* 2006; 98(3): 399-409.
106. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(3): 447-465.
107. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJMM, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. Sandwich enzym-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1912-14.
108. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzym-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 497-500.

109. US Food and Drug Administration 2003 Annual report Bringing new product to the market http://www.fda.gov/cdrh/annual/fy_2003/bringing.htm.
110. Leeflang MM, Debets –Ossenkopp YJ, Visser CE, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Cochrane Database Syst Rev 2008 ; 4CD007394.
111. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: Clinical Practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008; 46(3): 327-360.
112. Singh N, Obman A, Husain S, Reactivity of platelet *Aspergillus* galactomannan antigen with piperacillin –tazobactam clinical implications based on achievable concentrations in serum. Antimicrob Agents Chemother 2004 ; 48(6): 1989-1992.
113. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycopathologia 163(4): 191-202.
114. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. Clin Infect Dis 2012; 54(9): 1240-1248.
115. Racil Z, Koçmanova I, Lengerova M. Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. J Med Microbiol 2010; 59(9): 1016-1022.
116. Odabaşı Z, Mattiuzzi G, Estey E et al: Beta D glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation cut off development ,and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Infect Dis 2004; 39(2): 199-205.

117. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3)-beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infection in humans. Clin Infect Dis 2005; 41(5): 654-659.
118. Marty FM, Koo S. Role of (1->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. 2009; 47: 233-240.
119. Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for diagnosis invasive aspergillosis getting closer but still a ways to go. Clin Infect Dis 2006; 42: 487-489.
120. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. J Infect Dis 2002; 185: 1203-1206.
121. Luong ML, Clancy CJ, Vadnerkar A. Comparison of an *Aspergillus* real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. Clin Infect Dis 2011; 52(10): 1218-1226.
122. Kami M, Fukui T, Ogawa S et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1504-1512.
123. Warnock DW. Amphotericin B: An introduction. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 27-38.
124. İnci R. *Aspergillus*, *Pseudallescheria* ve *Mucormycosis* Etkenleri, In: Hakkı DüNDAR İ.ed. Current. Enfeksiyon Hastalıkları tanı ve tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri. 2004; 751-759.
125. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis 2002; 2: 550-563.
126. Mutlu G, Yücesoy M. *Aspergillus* türlerine karşı antifungaller ve direnç mekanizmaları. In: Ener B. ed. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları Ve Klinik Mikoloji Simpozyumu Kitabı Bursa 2006; 251-255.

127. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: Clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 1998; 27(3): 603-618.
128. Meis JF, Verweij PE. Current management of fungal infections. *Drugs* 2001; 61: 13-25.
129. Rex JH, Bennett JE, Sugar AM et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med* 1994; 331(20): 1325-1330.
130. McGinnis MR, Paserelli L, Sutton DA et al. In vitro evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(8): 1832-1834.
131. Groll AH, Walsh TJ. Posaconazole: Clinical pharmacology and potential for management of fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; (4): 467-87.
132. Morris MI, Villmann M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, Part 2. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63(19): 1813-1820.
133. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Resist Updat* 2007; 10(3): 121-130.
134. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362(9390): 1142-1151.
135. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3508-3509.
136. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey LE. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 1; 34(7): 909-917.

137. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009 May;52(3):197-205.
138. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55(7):809-18.
139. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; 48(1): 1-12.
140. 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: 1068-1075.
141. Kristan SS, Kern I, Music E. Invasive pulmonary aspergillosis. *Respiration* 2002; 69: 521-525.
142. Ruhnke M. et al. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003; 82: 141-148.
143. Almirante B. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005;43(4): 1829-1835.
144. Ener B . Fungal enfeksiyonlarda tanı. *Ankem Derg.* 2011; 25: 156-161
145. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
146. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 67-65.
147. Hovath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1996;100(2): 171-178.

148. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(10): 609-622.
149. Rello J, Esandi ME, Diaz E, Mariscal D, Gallego M, Valles J. The role of *Candida* spp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998;114.(1):146-149.
150. Latgé, JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310–350.
151. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004; 39(10): 1467-1474.
152. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E. et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004;126(6):852-860.
153. Ergin Ç. Akciğerin mantar enfeksiyonlarının tanısında kültür ve serolojik testlere güncel yaklaşımlar. *Klimik Derg* 2008; 21(2): 42-46.
154. Buchheidt Hummel M, Schleiermacher D. 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. *Br J Haematol* 2004;125(2):196-202.
155. Tănase AD, Colită A, Mărculescu A. Using the galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53(2): 379-382.
156. Hsu LY. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 44.

157. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 27–34.
158. Racil Z, Kocmanova I, Toskoya M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis* 2011; 15(12): 874-881.
159. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3223-3228.
160. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004; 363(9405): 325-327.
161. Aubry A, Porcher R, Botter, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorder. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 389-394.
162. Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1993(9): 2489.
163. Seen L, Robinson JO, Schmitd S et al (1→3)- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 2008 Mar 15; 46(6): 878-885.
164. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011; 52(6): 750-770.

165. Alexander BD, Smith PB, Davis RD, Perfect JR, Reller LB. The (1,3)-beta-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2010; (11)4083-4088.
166. Lamoth F, Cruciana M, Mengoli C. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: A systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 2012; 54(5): 633-643.
167. Lu Y, Chen YQ, Guo YL, Qin SM, Wu C, Wang K. Diagnosis of invasive fungal disease using serum (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan: a bivariate meta-analysis. *Intern Med* 2011; 50(22): 2783-91.
168. Metan G, Koç AN, Atalay A. What should be the optimal cut-off of serum 1,3- β -D-glucan for the detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies? *Scand. J Infect Dis* 2012; 44(5): 330-336.
169. Metan G, Ağkuş C, Buldu H, Koç AN. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for *Aspergillus* galactomannan and 1,3-beta-D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection* 2010; 38(3): 217-21.
170. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int* 2001; 60(1): 319-323.
171. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006; 44: S163-172.
172. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and Identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1953-1960.

173. Bucheidt D, Baust C, Skladny H, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2 step polymerase chain reaction: clinical result. Clin Infect Dis 2001; 33: 428-435.
174. Klingspor L, Jalala S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2006; 12(8): 745-53.
175. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol 2011; 49(2): 665-70.
176. Badiie P, Alborzi A. Detection of *Aspergillus* species in bone marrow transplant patients. J Infect Dev Ctries 4(8): 511-6.
177. Kawazu. M, Kanda Y, Nannya Y. et. al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2733-41..
178. Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003: 1668-85.
179. Challier S, Boyer S, Abachin E, and Berche P. Development of a serum-based taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 844-846.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Hafize Sav 'a ait “Sistemik mantar enfeksiyonu şüpheli hastaların klinik örneklerinden çeşitli yöntemlerle mantarların araştırılması ” adlı çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 16.12.2012

Onay

Başkan Prof. Dr. A. Nedret. KOÇ

Üye Prof. Dr.Hüseyin KILIÇ

Üye Prof. Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU

Üye Doç. Dr. Orhan Yıldız

Üyey Yrd. Doç.Mustafa Altay Atalay

İmza

İmza

İmza

İmza

İmza