

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİSTEMİK MİKOZ TANISINDA
KÜLTÜR VE KÜLTÜR DIŞI YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE KİTİN ANTİJENİNİN
SAPTANMASI İÇİN
ELISA YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURÇE YALÇIN**

**TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. SEMRA KUŞTİMUR**

**ANKARA
EYLÜL 2010**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİSTEMİK MİKOZ TANISINDA
KÜLTÜR VE KÜLTÜR DIŞI YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE KİTİN ANTİJENİNİN
SAPTANMASI İÇİN
ELISA YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURÇE YALÇIN**

**TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. SEMRA KUŞTİMUR**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2007 – 100 proje numarası ile desteklenmiŐtir

**ANKARA
EYLÜL 2010**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Burçe YALÇIN
Baba Adı	İmam
Doğum Yeri/Tarihi	11.12.1978 MARDİN
Diploma Tarihi/Diploma No	30.06.2002/2881
Mezun Olduğu Fakülte	Erciyes Üniv. Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji
İhtisas Süresi	Yıl : 4 Ay : 6
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniv. Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI : Sistemik Mikoza Tanısında Kültür ve Kültür Dışı Yöntemlerin Karşılaştırılması ve Kitin Antijeninin Saptanması İçin ELISA Yönteminin Geliştirilmesi.

JÜRİ KARARI :

Oy birliği ile tez çalışması başarılı kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ :

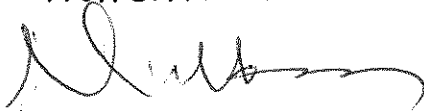


BAŞKAN

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR

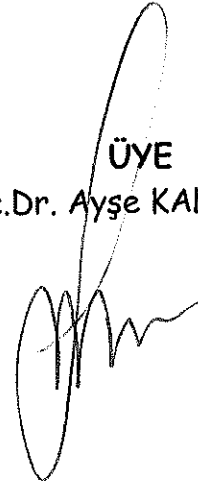
ÜYE

Prof. Dr. Nedim Sultan



ÜYE

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen danıőmanım sayın Prof. Dr. Semra Kuőtımur' a, değerli hocalarım Prof. Dr. Nedim Sultan, Prof. Dr. Turgut İmir, Prof. Dr. Seyyal Rota, Prof. Dr. Meltem Yalınay ırac, Doç. Dr. Kayhan ağlar' a, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ayşe Kalkancı' ya, Doç. Dr. Gölendam Bozdayı, Doç. Dr. Iőıl Fidan, Doç. Dr. Funda Doğruman Al, birlikte çalıőtıđım tım asistan arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme, canım eőime ve oğluma sonsuz teőekkürler.

KISALTMALAR

AIDS: Edinsel Bağışıklık Yetmezlik Sendromu

BAL: Bronko Alveolar Lavaj

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BSA: Bovine Serum Albumin,

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CFU: Colony Forming Unit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EİA: Enzim İmmün Yöntemi

ELİSA: Enzim Bağlanmış İmmünosorbent Yöntemi

EORTC / MSG: Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü / Mantar Çalışma Grubu

FDA: Food and Drug Administration

GMI: Galaktomannan İndeksi

GVHH: Graft Versus Host Hastalığı

HSCT: Hematopoetik Stem Cell Transplantasyonu

İA: İnvaziv Aspergilloz

İK: İnvaziv Kandidoz

İMİ: İnvaziv Mantar İnfeksiyonları

İPA: İnvaziv Pulmoner Aspergilloz

LA: Lateks Aglütinasyon

PA- EIA: *Platellia Aspergillus* – Enzim Immuno Assay

PBS: Phosphate Buffered Saline

pNA: p-nitroanilidin

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RIA: Radyo İmmün Assay

RNA: Ribo Nükleik Asit

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay

Teşekkür

Kısaltmalar

İçindekiler

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İnvaziv mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi.....	4
2.2 Fungal hastalıklarda tanı.....	11
2.3 Galaktomannan antijeni.....	17
2.4 1,3-β-D-glukan (Beta Glukan).....	24
2.5 Mannan ve Antimannan Testleri.....	28
2.6 Moleküler yöntem.....	30
2.7 İnvazif mantar infeksiyonlarda tanıya genel bakış.....	34
2.8 Mantar hücre duvarı.....	35
2.9 Mantar hücre duvarının kitin yapısı.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	41
3.1 Gereçler.....	41
3.1.1 Laboratuvar araçları.....	41
3.1.2 Sarf malzemeler.....	42
3.1.3. Besiyerleri.....	43
3.2. Yöntemler.....	44
3.2.1. Kültür.....	44

3.2.2. Alınan örneklere yapılan işlemler.....	44
3.2.3. ELİSA ile <i>Aspergillus</i> antijeninin aranması.....	44
3.2.4. Beta glukan testinin çalışılması.....	48
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi.....	50
3.2.6. ELİSA ile kitin antijeninin aranması.....	55
3.3 İstatiksel analiz.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Kontrol grubunun sonuçları.....	58
4.2. Hasta grubunun sonuçları.....	58
4.2.1. Hasta grubunun kültür sonuçları.....	58
4.2.2. Galaktomannan antijeni test sonuçları.....	58
4.2.3. Beta glukan test sonuçları.....	59
4.2.4. Gerçek Zamanlı PZR test sonuçları.....	59
4.2.5. Kitin antijeni ELİSA test sonuçları.....	62
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇLAR.....	88
7. KAYNAKLAR.....	90
8. ÖZET.....	109
9. SUMMARY.....	111
10. TABLO LİSTESİ.....	113
11. ŞEKİL LİSTESİ.....	114
12. ÖZGEÇMİŞ.....	115

1. GİRİŞ

Mantar infeksiyonları, 1980' li yıllardan itibaren giderek artan sıklıkta görülmeye başlanmıştır. Özellikle son yıllarda modern tıptaki gelişmelere paralel olarak fırsatçı etkenler olan mantarların önemi oldukça artmıştır. Kemik iliği ve hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulamaları, organ transplantasyonlarındaki artış ve maligniteli hastalarda kemoterapötik ajanların kullanımı, yoğun bakım hastalarının yaşam sürelerinin uzaması mantar infeksiyonlarındaki artışın en önemli nedenleridir. Bunun yanı sıra mantar infeksiyonlarını arttıran diğer nedenler arasında, gelişmiş ülkelerde kronik hastalığı olan ileri yaş popülasyonunun artması gibi değişen demografik özellikler ve Edinsel Bağışıklık Yetmezlik Sendromu (AIDS) pandemisi yer alır (1). Tıpta yeni medikal veya cerrahi invaziv girişimlerin uygulanmaya başlanması, geniş spektrumlu antimikrobiklerin veya sitotoksik kemoterapötiklerin yoğun bir şekilde kullanılması ile konak savunma mekanizmalarının zayıflaması son yıllarda mantar infeksiyonlarının görülme sıklığının artmasına neden olmuştur.

Tedavi ve kemoprofilaksiste flukonazol gibi azollerin, febril nütropeniye ampirik olarak amfoterisin B' nin kullanılması kısmen de olsa yüksek riskli hastalarda gelişen mantar infeksiyonların epidemiyolojisinde belirgin değişikliklere yol açmıştır (2).

Küf infeksiyonları bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda predominant olarak görülmeye devam etmektedir. Hematolojik maligniteli, solid organ ya da kök hücre nakli yapılmış ve kortikosteroid tedavisi alan hastalar küf infeksiyonları

açısından yüksek risk altındadırlar. Küf infeksiyonlarına sebep olan türler içinde en yaygını *Aspergillus* türleridir (2,3).

İnvaziv aspergilloz (İA) bağışıklık yetmezliği olan hastalarda gelişen ve tanı konup sağaltılsa bile sıklıkla ölümlü sonuçlanan fırsatçı bir infeksiyondur (4). İnvaziv kandidoz (İK) ve kandidemi, özellikle Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) olmak üzere nazokomiyal ortamda sık görülmektedir (5,6).

Mantar infeksiyonlarının sayısında ve duyarlı konakların sayısındaki artış sorumlu patojenleri daha hızlı şekilde tanımlayacak tanı testlerine ihtiyaç doğurmuştur. Kültürde üreme ve histopatolojik değerlendirme mantar invazyonunu göstermede hala en standart yöntemlerdir. Ancak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda girişimsel işlemlerin uygulanması nütropeni ve trombositopeni gibi nedenlerden dolayı sorunlu olabileceği için bu yaklaşımlar tercih edilmemektedir (3,7,8). Ayrıca kan kültür sonuçları İK ve fuzaryoz hastalarının sadece % 50' sinde pozitif iken İA' lı hastaların ise çok azında pozitif olabilmektedir. Bu nedenle özellikle bu grup hastalarda invaziv olmayan tanısal yöntemler mantar infeksiyonlarının erken ve hızlı tanısı için çok önemli olmaktadır (3,7-10).

Mantar hücre duvarının bir komponenti olan kitinin varlığının gösterilmesinin in vivo mantar üremesini yansıtabileceği söylenmiştir (11,12). Bu nedenle dokuda kitin ölçümü, bazı çalışmalarda fungal yükün göstergesi olarak kullanılmıştır (13). Buradan yola çıkarak bu çalışmada mantar infeksiyonlarının erken tanısına yönelik olarak sistemik mikoz şüpheli olguların serumlarında kitin

antijeni varlığının gösterilmesine yönelik enzim bağlanmış immünosorbent yöntemi (ELISA) geliştirilmesi planlanmıştır. Ayrıca kültür, galaktomannan, β -glukan ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemlerinin karşılaştırılması, aralarındaki korelasyonun araştırılması ve tanının doğrulanmasına katkılarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İnvaziv mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi

Nötropenik hastalarda mantar infeksiyonları özellikle 1970' li yıllarda ve 1980' li yılların başında dikkati çekmeye başlamıştır. İnvaziv mantar infeksiyonlarındaki (İMİ) artışta son yıllarda tanıda kullanılan görüntüleme ve laboratuvar yöntemlerinin gelişmesinin de payı vardır (14).

Geçen son üç dekat boyunca tıbbi ve cerrahi tedavideki gelişmeler, yatan hastalarda gelişen infeksiyonların etkenlerinde değişikliklere neden olmuştur. Yeni teknolojiler ve tedaviler, kemik iliği ya da solid organ transplantasyonu, kemoterapötik ajanlar birçok tıp merkezinde yaygın olarak uygulanmaktadır ve bu işlemler sonucunda kişilerde immün yetmezlik oluşmaktadır. Aynı zamanda özelleşmiş ünitelerde bakım ve invaziv gözlem aygıtlarının kullanımı, parenteral beslenme, yardımcı ventilasyon cihazları ölümlerle sonuçlanan hastalıklarda yaşam süresini uzatırken beraberinde bağışıklığı baskılanmış, hastanede yatan, ciddi hastalık taşıyan hasta popülasyonunda artışa neden olmuştur. Ayrıca epidemik görülen AIDS hastalığı da bu grup hasta sayısını arttırmaktadır (3,15).

Son birkaç yılda sağlık alanında yapılan gelişmeler gerçek patojenler ve fırsatçı organizmaların oluşturduğu yaşamı tehdit eden infeksiyonların sayısında beklenmedik bir artış olmasına yol açmıştır (16). Bu infeksiyonlar risk altındaki popülasyonun artmasına bağlı olarak giderek yaygınlaşmaktadır. Bu popülasyonda AIDS' li hastalar, transplant alıcıları, kanser hastaları ve immün

baskılayıcı tedavi alan diğer hastalar yer almaktadır. Transplant yapılan veya malignite tedavisi alan hastalarda yoğun ve geleneksel tedaviler daha derin ve daha uzun süren immün yetmezlik durumu oluşturmuştur (16). Benzer şekilde, YBÜ' lerinde invaziv izlem ve agresif tedavilerin kullanıma girmesiyle yaşamı tehdit eden hastalığı bulunan hastaların sağ kalma oranları artmıştır; öte yandan bu gelişmeler, mantar infeksiyonları bakımından risk altındaki insan sayısında artış olmasına da katkıda bulunmuştur (16). Risk altındaki farklı gruplarda mantar infeksiyonlarının insidansında belirgin değişiklikler yaşanmasına yol açan diğer gelişmeler, tedavi ve kemoprofilaksiste azol grubu antifungal ilaçların artan kullanımı ve ampirik tedavi için amfoterisin B' nin yaygın kullanımı olarak sayılabilir (16).

Aspergillus fumigatus ve *Candida albicans* gibi iyi bilinen organizmalara bağlı fırsatçı mantar infeksiyonlarının prevalansında artışa ek olarak, zararsız saprofitler olarak bilinen gitgide artan sayıda mantar da immün yetmezlikli bireylerde ciddi veya öldürücü infeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir. Örneğin, tırnak ve kornea infeksiyonlarının uzun zamandan beri bilinen bir etkeni olan *Fusarium* türlerinin günümüzde nötropenik kanser hastalarında ve kök hücre nakli alıcılarında ölümcül yaygın infeksiyon etkeni olduğu gösterilmiştir (16).

Bu organizmaların önemli patojenler olduklarının ortaya çıkması hem klinik bulguları sık görülen bir hastalık olan aspergillozu taklit edebildiğinden, hem de bu organizmalar, febril nötropenik hastalarda mantar infeksiyonundan

şüphelenildiğinde ampirik olarak kullanılan, amfoterisin B' ye genellikle dirençli olduğundan tanı ve tedavide önemli sonuçlar doğurmuştur (16).

Mantar infeksiyonlarının günümüzdeki seyri gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre birçok yönden oldukça farklıdır. Gelişmiş ülkelerde kombine antiretroviral ilaçların yaygın şekilde kullanımı AIDS ile ilişkili fırsatçı infeksiyonlarda belirgin bir azalma olmasına yol açmıştır. Aksine, gelişmekte olan ülkelerde bu hastalıkların yarattığı sorun giderek büyümekte ve artmaktadır. Tayland' da kriptokokkoz AIDS' li kişiler arasında üçüncü fırsatçı infeksiyondur. *Penicillium marneffe* adı verilen Güneydoğu Asya ve Güney Çin' de endemik olan bir mantar türünün oluşturduğu infeksiyon Tayland' ın kuzey bölgesinde en sık dördüncü fırsatçı infeksiyondur. Afrika'nın birçok bölgesinde kriptokokkozun prevalansı AIDS' li kişiler arasında % 30'u aşmıştır. Bu kıtadan yapılan bildirimlerde, sıklıkla uygun dozda ve sabit saklama koşullarında antifungal ilaçların bulunmadığı lokal şartlarda tedavi edilen infeksiyonla ilişkili yüksek mortalite oranları yer almaktadır (16).

İnvaziv mikozlara bağlı ölüm oranı her geçen yıl artmaktadır. Amerika' da 1980 yılı verilerine göre 828 ölümden etken olarak mantarlar izole edilmişler ve fatal infeksiyon etkenleri arasında onuncu sıradayken, 1997 yılında ölümler 2370' e ve etkenler arasında da yedinci sıraya yükselmişlerdir (17). Fırsatçı mikozlara sebep olarak en iyi bilinen etkenler *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *A. fumigatus*' tur (17). Bu patojenlere bağlı tahmini yıllık invaziv mikoz insidansı, *Candida* türleri için milyonda 72-228, *Cryptococcus* türleri için milyonda 30-66

ve *Aspergillus* türleri için milyonda 2-34 infeksiyondur (17). Bu ajanlara ek olarak diğer fırsatçı mikozların sayısında da artış görülmektedir. Bu fungal patojenler *C. albicans* ve *A. fumigatus* dışındaki diğer *Candida* ve *Aspergillus* türleri, fırsatçı maya benzeri mantarlar (örneğin; *Trichosporon* ve *Rodotorula* türleri), zigomiçetler, hiyalin küfler (örneğin; *Scedosporium* ve *Fusarium* türleri) ve çeşitli dematösiyöz mantarlardır (8,15,18,19). Bu organizmalar kateter ilişkili fungemi ve peritonit, lokalize infeksiyonlar (akciğer, cilt, paranazal sinüsler gibi) ve kan yoluyla yayılarak gelişen infeksiyonlar gibi çeşitli infeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu mantarların birçoğunun önceden patojen olmadıkları bilinirken günümüzde bağışıklığı baskılanmış hastalardaki invaziv mikoz etkenleri olarak tanımlanmışlardır (17).

Maya infeksiyonları sıklıkla mukoza bariyerinin bütünlüğünün bozulmasıyla kazanılmasına rağmen, küf mantarı infeksiyonlarına temel olarak konidyanın inhalasyonu sebep olmaktadır ve sonuç olarak akciğerler sıklıkla primer infeksiyon yeridir. Özellikle kronik graft versus host hastalığında (GVHH) veya mukoza bariyeri yaralanması bulunan hastalarda, bağırsaklarda olası İA infeksiyonu olabileceği bildirilmiştir (20).

Çok çeşitli patojenler İMİ ile ilişkili olabilmesine rağmen, *Candida* türleri geçmişte en sık sebep olan organizmalardır. Bununla birlikte, Avrupa' daki İMİ epidemiyolojisi son yıllarda *Aspergillus* türlerine kaymıştır ve diğer küf mantarları da gittikçe önemi artan patojenler haline gelmiştir.

1990' lara kadar, kandidoz Avrupa' da immün yetmezlikli hastalar arasında en sık görülen İMİ idi. O zamandan beri, İA' nın artan insidansı ile anlaşılabilir gibi, epidemiyolojide belirgin bir kayma olmuştur (21,22). Örneğin bir Alman hastanesindeki otopsi çalışması, 1973 ile 1980 arasında tanı konulan 11 İMİ' nin sebebinin *Candida* türleri olduğunu, 1992 ile 2001 arasında aynı hastanede belirlenen İMİ' lerin % 62' sinden (16/26) *Aspergillus* türlerinin sorumlu olduğunu ve olguların % 35' inde *Candida* türleri tespit edildiğini bildirmektedir (21). Diğer raporlarda günümüzde Avrupa popülasyonlarının bazılarında majör İMİ sebebi olarak *Aspergillus'* un *Candida'* yı geçtiği belirtilmektedir. SEIFEM (Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine nelle Emopatie Maligne) 2004 çalışması, 1999 ile 2003 yılları arasında İtalya' daki hematoloji servislerine yatırılan hematolojik maligniteli hastalarda İMİ' lerin % 64' ünün sebebinin küf mantarları olduğunu belirtmektedir (23). Küf mantarı infeksiyonlarının % 90' dan fazlasına *Aspergillus* türleri sebep olurken, *Zygomycetes* (% 4) ve *Fusarium* türleri (% 4) ise ikinci ve üçüncü sırada gelmektedir (23). Mayalar ise İMİ' lerin % 36' sında etken olarak saptanırken, *Candida* türleri (% 91) maya infeksiyonlarının çoğundan sorumlu bulunmuştur (23). Aynı çalışma, hematopoetik stem cell transplantasyonuna (HSCT) giren hastalar arasında benzer sonuçlar vermiştir. 121 İMİ' den 91 tanesinde (% 75) etken küf mantarları, 30' unda (% 25) ise maya mantarları olarak saptanmıştır (24). Epidemiyolojideki bir başka eğilim, *albicans* dışı *Candida* türlerinin (örneğin *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) sebep olduğu infeksiyonların, özellikle hematolojik maligniteli hastalar arasında, gittikçe artan

şekilde görülmesidir (6,25-28). Önceden nadir olan *Zygomycetes* ve *Fusarium* türleri gibi diğerleri de etiyolojik patojenler olarak ortaya çıkmaktadır ve sıklık coğrafi lokasyona göre değişmektedir (22).

İMİ' nin değişen epidemiyolojisinin sebepleri tamamen bilinmemektedir, ancak büyük olasılıkla HSCT alıcılarında flukonazol profilaksisinin artan kullanımı ve çeşitli risk popülasyonları için tedavi stratejilerindeki değişiklikler gibi pek çok faktörden kaynaklanmaktadır (22). Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri' nden gelen epidemiyolojik çalışmalar, kandidemi insidans oranlarının 1970' lerden 1990' ların başına kadar arttığını göstermiştir. Bazı veriler, bundan sonra 1990' lar boyunca insidans oranlarının sabitleştiğini ileri sürmektedir (29).

İK açısından risk taşıyan hasta popülasyonları, YBÜ hastalarını, solid tümör veya hematolojik malignite bulunan hastaları ve ameliyata giren hastaları içermektedir (25). Sonradan *Candida* türlerine bağlı İMİ gelişimi için müköz membran kolonizasyonu bir ön koşul olarak görülmektedir ve kolonizasyonun meydana gelmesinin geniş spektrumlu antibiyotikler almakta olan kritik hastalar arasında anlamlı şekilde artmış olduğu görülmektedir (25). İK için diğer risk faktörleri, intravasküler cihazların, kateterlerin ve parenteral beslenmenin kullanılması, nütropeni, cerrahi işlemler, böbrek yetmezliği, steroidlerin kullanımı ve YBÜ' lerinde daha uzun kalış süresini içermektedir (25,30). Avrupa Tıbbi Mikoloji Konfederasyonu ve diğer taramalardan gelen veriler, kandidemi olgularının yarısından fazlasında *C. albicans*' in sorumlu olduğunu belirtmektedir

(25,28). Bununla birlikte *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi *albicans* dışı *Candida* türleri etken olarak ortaya çıkmaktadır (6,25,27,28).

Özellikle, *albicans* dışı infeksiyonlar hematolojik maligniteli hastalarda daha sık görülmektedir (25). Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Örgütü / Mantar Çalışma Grubu (EORTC / MSG) tarafından yapılan prospektif, çok merkezli tarama çalışması, *C. albicans*' in solid tümörlü hastalarda olguların % 70' inde ve hematolojik hastalıkları bulunan hastaların ise % 36' sında olduğunu bulmuştur, Oysa *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve diğer *albicans* dışı *Candida* türlerinin her birisi, hematolojik maligniteli hastalar arasında olguların %12 -14' ünde etken olarak saptanmıştır (31).

A. fumigatus aspergillozun önde gelen sebebidir; bununla birlikte *A. flavus* ve *A. terreus* gibi *A. fumigatus* dışındaki *Aspergillus* türleri daha sık görülmektedir (32). İA açısından risk taşıyan hasta popülasyonları hematolojik maligniteli, pulmoner hastalığı olan (örneğin kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım), kök hücre alıcıları ve solid tümörlü hastaları içermektedir. İA için spesifik risk faktörleri nötropeniyi (Polimorfonükleer nötrofil sayımı < 0.5 g/l), antibiyotik tedavisini, kortikosteroid tedavisini, sitotoksik kemoterapiyi, diğer immünespresifleri, *Aspergillus* kolonizasyonunu, *sitomegalovirüs* veya *Pneumocystis jirovecii* infeksiyonunu, kök hücre kaynağını, GVHH' nı, HSCT' de insan lökosit antijeni uyumsuzluğunu, monoklonal antikorların kullanılmasını ve nükleozit analoglarının kullanılmasını içermektedir (33,34,35,36).

Zigomikoz, yüksek mortalite oranıyla karakterize olan gittikçe artan öneme sahip bir İMİ olarak ortaya çıkmıştır (37). Hematolojik maligniteleri bulunanlar, AIDS olanlar, HSCT' ye girenler veya kortikosteroid almakta olanlar gibi nütropenik ve immüsupresyonlu hastalarda artmış zigomikoz riski bulunmaktadır.

Fusarium türleri hematolojik hastalığı olan nütropenik hastalarda ortaya çıkan patojenlerdir ve bu hastalarda insidansın artması beklenmektedir (38).

14 İtalyan hematoloji bölümünün taramasında, mikrobiyolojik olarak belgelenmiş filamentli mantar infeksiyonu bulunan hastaların % 1.7' sinde *Fusarium* infeksiyonu belgelenmiştir (38). Bu çalışmada genel *Fusarium* insidansı 10 yıllık dönem boyunca lösemili yetişkin hastalar arasında 0.06 idi (AML hastalarında ise 0.08). *Fusarium* infeksiyonu için risk faktörleri, HSCT, hematolojik kanserler (akut lösemi dahil), yanıklar, kortikosteroidlerin kullanımı, nütropeni, ciddi immüsupresyon, lenfopeni ve GVHH' yi içermektedir (39). İmmün yetmezlikli hastalarda % 50' den neredeyse % 90' a kadar değişen yüksek mortalite oranları bulunmaktadır (23).

2.2 Fungal hastalıklarda tanı

Fırsatçı mantar infeksiyonlarının tanısı hala zor ve sorunludur. Bu infeksiyonlarda görülen klinik bulgular etkene özgü olmadığından tanıya katkıları sınırlı olmakta, histopatolojik ve radyolojik bulgular tanıya ilişkin önemli ipuçları sağlayabilmekte, kesin tanı ise mikrobiyolojik yöntemlerle konmaktadır.

Günümüzde fırsatçı mantar infeksiyonlarının rutin tanısındaki algoritmayı konvansiyonel yöntemler ve bu yöntemlere eşlik edecek şekilde uygulanması önerilen serolojik ve moleküler yöntemler oluşturmaktadır (40).

Konvansiyonel yöntemler, direk mikroskopik inceleme ve kültürü kapsamaktadır. Klinik örneğin direk mikroskopik incelemesi, hızlı olası ön tanı sağlaması ve özellikle daha sonra kültürde bir küf mantarı üremesi durumunda kültür sonucunun değerlendirilmesine yardımcı olması nedeniyle değerli bir yöntemdir. Bu amaçla, çini mürekkebi, potasyum hidroksit gibi ıslak preperat hazırlama yöntemlerinin yanı sıra, gram ve kalkoflor beyazı gibi boyama yöntemleri kullanılarak mantarlara ait çeşitli yapılar görülebilir. Konvansiyonel yöntemlerin temelini oluşturan kültür ise, kesin tanı için altın standarttır. En önemli avantajları, cins ve tür düzeyinde tanımlama ve olası direnç tahmini şansını tanıması ve o infeksiyonda etken suş için antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Kültürün ve direk mikroskopik incelemenin bu infeksiyonların tanısındaki duyarlılığı, her zaman istenilen düzeyde olmayabilmektedir. Hem direk mikroskopik inceleme, hem de kültür için klinik örneğin seçilmesi, tanıdaki başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bununla ilgili en tipik örnek, İnvaziv Pulmoner Aspergillozlu (İPA) olgularda tanı için en başarılı örneğin balgam değil, doku örneği olmasıdır. Ancak bu olgularda uygun ve steril örneklerin alınması, çeşitli nedenlerden ötürü her zaman mümkün olmamakta, örnekteki mantar miktarının azlığı ve bilgi ve deneyim eksikliği gibi faktörler de konvansiyonel yöntemlerin tanıdaki duyarlılığını düşürebilmektedir (41). Benzer şekilde, fırsatçı mantarlara bağlı gelişen fungemilerin tanısında kan

kültürünün duyarlılığı da sınırlı olabilmekte, en gelişmiş tekniklerle bile, örneğin kandidemili olgularda, kan kültürünün duyarlılığı %50-70' in üzerine çıkamamaktadır (40). Bunun dışında, kültürün, özellikle küf mantarlarına bağlı gelişen infeksiyonlarda uzun inkübasyon süresi gerektirmesi ve erken tanıya yardımcı olamaması ve yine küf mantarları için kontaminasyon sorunu nedeniyle kültürün özgüllüğünün düşük olabilmesi, konvansiyonel tanı yöntemleri ile ilgili en önemli dezavantajları oluşturmaktadır (41). Günümüzde mikrobiyolojide kullanılan konvansiyonel tanı yöntemleri, invaziv fırsatçı mikozların kesin tanısındaki yerini korumakta, erken tanıya yardımcı olabilecek bazı serolojik testlerin (galaktomannan testi, β -glukan testi) ve moleküler yöntemlerin (PZR) rutinde konvansiyonel yöntemlere eşlik edecek şekilde uygulanması önerilmektedir (40).

Tanı genelde klinik bulgularla laboratuvar tanısının birleştirilmesine dayansa da, klinik belirtiler çoğunlukla özgül olmadığı ve başka hastalıklarla karışabildiği için zordur. Bu nedenle mantar yükü artmadan ve hasta ölmeden önce nadiren tanı konulabilir. Erken laboratuvar tanısı ise genellikle zor konulmaktadır (42). Günümüzde İMİ' lerin erken tanısı açısından gerek serodiagnostik yöntemler gerekse görüntüleme yöntemleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (43). Galaktomannan antijen testi, β -glukan testi ve PZR testleri üzerinde en çok çalışılan yöntemlerdir (43).

İK tanısını kolaylaştırmak için mannan antijenemisini kullanılması önerilmiştir. Bu testlerin rutin kullanımı, erken tanıyı artırmak için değerli olabilir fakat tek başlarına tanı için kesin bir çözüm sunmamaktadır (44).

Erken tanı konulmasındaki önemli gecikme, başarılı İA tedavisi için büyük bir sorun oluşturmaktadır (45). İPA düşündürülen belirti ve semptomlar bulunabilmesine rağmen, İA tanısı infeksiyonun spesifik klinik belirtilerinin bulunmaması nedeniyle zor olmaktadır (45,46). Ayrıca, İPA' nın diğer pulmoner mikozlardan ayırt edilmesi zordur (47). Klinik, radyolojik, mikrobiyolojik ve serolojik parametreleri bir araya getiren, İA için standardize tanı kriterlerinin en son ortaya konulmasıyla ilişkili önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen, *Aspergillus* infeksiyonlarının üçte birinden fazlası halen ante-mortem dönemde tanısız kalmaktadır (48).

Histoloji ve kültür dayanan geleneksel yöntemler, İA kesin tanısını koymada önemli rol oynamaktadır (45). Yüksek çözünürlü bilgisayarlı tomografinin (BT) sistemik kullanımı, İPA erken tanı ve tedavisinde önemli bir ilerleme olmuştur (45). Göğüs yüksek çözünürlü BT taramaları, tipik olarak İA' nın erken evrelerinde ara oluşum (halo belirtisi) ile çevrelenmiş küçük kama biçimli subplevral lezyonları veya nodülleri gösterebilir (49). Önemli olarak, halo belirtisi İA hastalarında erken tanı ve gelişmiş sonuçlar ile ilişkili bulunmuştur (50).

Halo işareti, akciğerde nodüler bir infiltrasyon ve bunu çevreleyen kanama ve ödeme bağlı daha az yoğunluktaki buzlu cam manzarası olup İPA' nın erken

dönemlerinde ortaya çıkar. Erken dönemde yapılan BT, pulmoner mantar infeksiyonların erken tanısında yardımcı olabildiği ve erken dönemde antifungal başlanmasıyla bu olgularda prognozun daha iyi olduğu gösterilmiştir (43). Aspergillozların tanısında etkenin doğada yaygın olarak bulunması nedeniyle kolonizasyon, infeksiyon ayırımının iyi yapılması gereklidir (51). Kesin tanı için mikroskopik bulguların kültürle doğrulanması gereklidir ancak kültürler çok başarılı olmamaktadır (51). Son dekat boyunca dolaşımdaki fungal antijenlerin, metabolitlerin veya *Aspergillus* Deoksiribo Nükleik Asit' inin (DNA) tespitine dayanan testlerin geliştirilmesi önemli bir ilerleme olmuştur. Bugüne kadar, erken klinik çalışmalarda en fazla ümit veren iki yaklaşım, antijenlerin tespiti ve PZR kullanarak *Aspergillus* nükleik asitlerinin ölçümüdür (52).

Kandidiyaz tanısı halen YBÜ' nde büyük bir zorluktur ve sıklıkla infeksiyonun geç döneminde konulur. Bu birkaç faktörle açıklanabilir: klinik belirtiler non-spesifiktir, kan kültürleri genellikle infeksiyon seyrinde geç döneme kadar pozitifleşmez, kan kültürlerinden ayrı olarak serolojik testler ve kültürler non-spesifiktir ve bunların tanısallığı halen tartışmalıdır (53). Sonuç olarak, klinisyenler sıklıkla kandidoz için potansiyel tanıyı değerlendirir. Ek bir tanısal engel, YBÜ hastalarının profilaktik flukonazol dozlarını (örneğin 100 mg) almış olmalarıdır. Bu durum test sırasında numunelerin negatif olmasına sebep olmaktadır (44).

Tanıdaki temel özelliklerden birisi, infeksiyon için risk faktörlerinin değerlendirmesidir (54). İnvaziv *Candida* infeksiyonları için risk faktörleri tablo 1’ de özetlenmiştir (6).

Önceden bahsedildiği gibi, İK ve kandidemi tanısı semptomların ve belirtilerin genellikle non spesifik olması, mikrobiyolojik kültürlerin analizinin zor olması ve histolojik numunelerin invaziv işlemler gerektirmesi nedeniyle büyük zorluklar yaratmaktadır (55,56).

Tablo 1 İnvaziv *Candida* infeksiyonları için risk faktörleri

Risk faktörleri
Nötropeni
Kanser kemoterapisi
<i>Candida</i> spp. ile kolonizasyon
Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı
Santral venöz kateter varlığı
Hemodiyaliz veya böbrek yetmezliği
Hastalık şiddeti (Apache skoru)
Parenteral beslenme
Mekanik ventilasyon
Geçirilmiş ameliyat
Yaş

Mantar infeksiyonlarının erken tanısı ve uygun tedavinin başlanması klinisyenler için çok önemlidir. Doku örneklerinde mikroorganizmaların

histopatolojik olarak gösterilmesi veya kültürde fungal ajanın üretilmesi hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Hematopoetik kök hücre transplantasyonuna giden veya hematolojik malignitesi olan hastalarda fungal organizmalara ait hücre duvar elementlerinin, serum veya diğer vücut sıvılarında serolojik yöntemlerle araştırılması tanının konulmasında kullanılmaktadır (57).

İmmündefüzyon, presipitasyon, veya kompleman fiksasyon testleri gibi standart teknikler immün yetmezlikli hastalarda İMİ' nin tanısında yeteri kadar duyarlı olmamaları ve özgüllüklerinin yetersiz olmasından dolayı kullanılmamaktadır (57).

2.3 Galaktomannan antijeni

Galaktomannan antijen testi birçok merkezde rutin kullanıma girmeye başlamıştır. Galaktomannan, *Aspergillus* türlerinde içinde olduğu *Hyalohyphomycetes* grubu küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür (43).

Galaktomannan *A. fumigatus*' un hücre duvarı yapısına katılan, İA' lı hastalarda mantar tarafından dokuda büyüme esnasında seruma salınan, 35-100 kDA moleküler ağırlığında olan bir hücre duvar polisakkaritidir. ELISA, Radyo İmmün Assay (RIA) ve Lateks Aglütinasyon (LA) testlerini içeren çok sayıda teknik İA' lı hastaların vücut sıvılarında galaktomannan antijenini tespit etmek için değerlendirilmiştir, ancak düşük tespit limitleri (5-15 ng/ml) nedeni ile rutin kullanımları sınırlı kalmıştır (8,42). Stynen ve arkadaşlarınca geliştirilen sandviç

ELISA yöntemi rat monoklonal antikoru EB-A2' yi kullanmaktadır (Platelia Aspergillus Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) (58). ELISA testi serolojik bir test olup işaretli katı faz yöntemlerinden biridir. Ortak mekanizma reaktiflerden birisinin (antijen veya antikör) katı bir faza bağlanarak hareketsizleştirilmesi ve daha sonra özgül birleşmenin işaretli bir reaktif (konjugat) kullanılarak gösterilmesidir. Konjugatı işaretlemek içinde enzimler kullanılır. Yöntemin saptama sınırı, sandviç enzim immün assay ile 0,5-1 ng galaktomannan / ml serum şeklindedir. Bu test 2003 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından tanı amacıyla kullanılmak üzere onaylanmıştır. Sonuçlar Galaktomannan İndeksi (GMI) olarak belirtilir. Amerika Birleşik Devletleri' nde onaylandığı şekliyle GMI değeri 0,5 ve üzerinde ise pozitif kabul edilir. Avrupa ve diğer ülkelerde bu sınır (eşik) 0,5-1,5 arasında değişmekte olup, bu ülkelerde de son yıllarda 0,5 ve üzerindeki indeks değeri daha çok kabul görmektedir. Bu yöntemde en az % 90 doğruluk elde edebilmek için riskli hastalarda testin en az haftada iki kez yapılması gerektiği bildirilmiştir (59). *A. fumigatus* ile deneysel olarak enfekte edilen veya *A. fumigatus* ekstraktları ile hiperimmünize olan tavşanlarda bu polisakkarite karşı direkt antikorların varlığı gösterilmiştir. İA' lı hastaların diğer biyolojik vücut sıvılarında da molekülün dolaştığı saptanmıştır. Serolojik tanı Bronko Alveolar Lavaj (BAL), idrar, serum gibi sıvılarda galaktomannan aranmasına dayanır. Çünkü İA için riskli olan ağır immün yetmezlikli hastalar *A. fumigatus*' a karşı yeterli antikör cevabı oluşturamazlar. Dolaşımdaki antijenleri araştırmak için galaktomannana karşı oluşmuş poliklonal antikorlar veya monoklonal antikorlar kullanılır (57).

Sistemik mantar infeksiyon varlığında bu antijenler kanda geçici süre bulunurlar ve karaciğerde kupfer hücreleri tarafından endositoz yoluyla immünkompleksler şekliyle elimine edilirler (57).

İA' nın tanısında serumda dolaşan galaktomannan antijenlerinin saptanması çok önemlidir. Galaktomannan oldukça immunolojik bir antijendir. *A. fumigatus* ve diğer *Aspergillus* türlerinde (*A.flavus*, *A.niger*, *A.versicolor*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.oryzae*) varlığı gösterilmiştir (57).

İnvivo ortamda galaktomannan salınımının kinetiği ve kandaki varlığı ile ilgili hala yeterli bilgi olmayışından dolayı etkisini belirlemek zordur. Dolaşımdaki antijenlerin değişken paternleri bazı özel hastalarda saptanır. Renal yolla kandan temizlenmesi hastanın renal fonksiyonlarına ve dolaşan antijenlerin miktarına bağlıdır. Ayrıca infeksiyon odağında beslenme içeriğinin yetersizliği veya yokluğunda invivo ortamda salınan antijen miktarının hissedilebilir derecede azalabileceği gösterilmiştir. Düşük galaktomannan seviyeleri ayrıca anti-*Aspergillus* antikorlarının var olduğu hastalarda da gözlenebilir (57).

Her ne kadar erken nötropeni fazında yüksek antikor titresinin varlığı gösterilmiş ise de *Aspergillus* antikorlarının tesbitine dayalı İMİ' lerin immün tanısı sık kullanılmamaktadır.

Galaktomannan varlığının araştırılmasına dayalı, kültür dışı tanı metodlarından mümkün olan iki yöntemden biri, Platellia *Aspergillus* – Enzim Immuno Assay (PA- EIA) (platellia *Aspergillus* – bio – rat, Fransa) ve diğeri de

LA' dır (LA, pastorex *Aspergillus*, bio-rat). Çalışmaların sonuçları, LA yöntemleriyle karşılaştırıldığında 1mL kandaki galaktomannanın 10 kat daha düşük konsantrasyonlarını tesbit edebilen PA- EIA yönteminin daha faydalı olduğunu göstermiştir (57).

PA- EIA platellia *Aspergillus* testi Avrupa' da yıllardır kullanılmaktadır (57). Onkoloji ve hematoloji hastalarında İA tanısında bu testin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü araştırmacıların dikkatini çekmiştir.

Allojenik kök hücre transplantasyonuna giden hastalarda haftada 2 defa galaktomannan varlığı araştırılır. Birbirini takip eden iki pozitif sonucun varlığı İA için doğrulayıcı olmaktadır.

Bu durumda duyarlılık ve özgüllüğü yaklaşık % 90' dır. İnfeksiyonların 2 / 3' ünde, pozitif galaktomannan sonucu klinik semptomların, radyolojik değişikliklerin veya diğer tanı yöntemlerince pozitif sonucun elde edilmesinden önce saptanır. Diğer taraftan bazı çalışmalarda, galaktomannan tesbitinde PA- EIA platellia *Aspergillus* testinin yüksek özgüllüğüne rağmen, bazı zamanlarda düşük duyarlılık göstermesinin altı çizilmektedir (57).

PA- EIA platellia *Aspergillus* testi sistemik vücut sıvılarında infeksiyon olmamasına rağmen yalancı pozitif reaksiyon vererek (% 1-18) *Aspergillus* antijeni saptayabilir. Yalancı pozitif sonuçlar özellikle intestinal bariyerlerinin bütünlüğünün tam gelişmemiş olmasından dolayı yeni doğanlar ve bebeklerde antijen ile kontamine yiyeceklerden galaktomannanın alınması ile olur. Anne

sütünde ve formül mamalarda yüksek konsantrasyonda bulunan *Bifidobacterium bifidum*' un çarpaz reaksiyonu ile de yalancı pozitiflik olabilmektedir. Erişkinlerde ise kemoterapi alanlarda gastrointestinal sistemin hasarlanması sonucu diyetteki galaktomannanın absorpsiyonunun artması ile de yalancı pozitiflik gözlenebilir. Ayrıca fungal orjinli ilaçlar örneğin; antibiyotikler (ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit) yalancı pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Platelia *Aspergillus* galaktomannan ile *Penicillium* spp arasında da çarpaz reaksiyon gösterilmiştir. Fakat *Penicillium* türleri nadir insan patojenlerinden olduğundan klinikle çok az ilgili olarak görülmektedir. *Paecilomyces variotii* ve *Alternaria* türleri gibi diğer mantarlarla da çarpaz reaksiyon gözlenmiştir. Aynı zamanda bakteriyemili hastalar ve otoreaktif antikorları olan hastalarda da yanlış pozitif reaksiyonlar gözlenmiştir (7,42). Bunları önlemek için haftada iki kez serumdan test çalışılmalıdır (57).

Galaktomannan antijen testlerinde yalancı negatif test sonuç oranı % 5' in altındadır. Yalancı negatif sonuç için sebeplerden biri anti- *Aspergillus* antikorlarının yüksek titresidir. Bu antikor yüksekliği antijenin EbA 2' e bağlanmasını engelleyerek maskeleyerek yapmaktadır. Bu yüzden serumun immün komplekslerinin inaktive edilmesi için 100°C' ye ısıtılması önemlidir. Bu olgularda testin eşik değerinin düşürülmesi yalancı negatifliği azaltmaktadır (43).

Pinel ve arkadaşlarının, dahiliye YBÜ ve hematoloji ünitesinden İA olduğu bilinen 807 kişilik hasta grubunda yaptıkları çalışmada galaktomannan testi % 50 duyarlılığa sahip bulunmuştur. Yüksek riskli hastalarda, hematolojik

maligntelilerde yapılan çalışmalarda sınır değer 0,5-0,6 olarak alındığında duyarlılık % 76-100, özgülük % 65,7-97,5 olarak bildirilmiştir. ELİSA' nın galaktomannanın tesbitindeki kullanışlılığı ve faydası kan dışındaki BAL, Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) gibi diğer vücut sıvılarında da gösterilmiştir (57,60). Serum için FDA onayı alan bu test, BAL örneklerinde de kullanılmış ve özgülük % 87 olarak belirlenmiştir. Bu örnek grubu için onay alınmamış olmasına karşın, araştırma sonuçlarına göre, İA riskli immün süprese hastalarda bronkoskopi yapılması durumunda, BAL' da da bu testin çalışılması önerilmektedir (59).

Galaktomannan varlığı için birbirini takip eden iki pozitif sonucun varlığı İA için teyid edici olmaktadır. İA tanısının dışlanması ise negatif sonucun birkaç yeni testle gösterilmesine dayanır.

Klinikte kandan galaktomannan taranması İA riski çok yüksek olan hastalara uygulanır. Bu yüksek riskli grupta Akut lösemi, myelodisplastik sendrom, HSCT alıcıları, solid organ transplant alıcıları ve GVHH için tedavi gören hastalar bulunmaktadır.

EORTC / MSG kılavuzu, klasik mikolojik testler negatif olsa bile kanda galaktomannanın varlığının İA tanısında major bir kriter olduğunu kabul etmektedir (57).

Hastaların % 96' sında İA tanısından (histo / sitokimyasal / veya mikrobiyolojik olarak) 2-110 gün önce galaktomannan antijenemisi tesbit edilmektedir. Hastaların % 90' ında pozitif kültür sonuçlarından ortalama 10,5

gün önce galaktomannanın var olduğu gösterilmiştir. Galaktomannan tesbitinin duyarlılığı infeksiyonun durumuna bağlıdır. İPA gibi lokalize infeksiyonlarda sistemik infeksiyonlara göre dolaşan antijenlerin saptanmasında duyarlılık düşer. Galaktomannan seviyelerindeki düşme iyi prognazla ilgilidir. Fakat antijenin yokluğu infeksiyonu dışlamaz. Galaktomannan varlığı antifungal tedaviye cevap ile de koreledir. Serum örneklerinin devamlılığı antifungal tedavide kullanılan ilaçlara cevabın değerlendirilmesi gerektiğinde alternatif tedavilerin gerekip gerekmediği konusunda faydalıdır. Nötropenik hastalarda İA taranması için araştırmacılar antijenin kandaki geçici varlığından dolayı günde bir ve haftada en az iki defa bakılmasını önerirler. Aspergilloz tedavisi altındaki hastalarda da antijenin iki haftalık aralıklarla takibi önerilir. Pratikte aspergilloz için yüksek riskli hastaların takibinde haftada iki kez galaktomannan bakılmalıdır (GVHH veya uzamış kortikosteroid tedavisi gibi ilave risklerin varlığında) (57,60).

BT ile tesbit edilen ve etyolojisi belirlenemeyen nötropenik pnömoni hastalarında alınan BAL sıvıları test edildiğinde tüm pulmoner aspergilloz olguları galaktomannan pozitif bulunurken, ardışık serum testi takiplerinde pulmoner aspergillozlu olguların sadece yarısında galaktomannan testi pozitif bulunmuştur (43). Özellikle BAL sıvısı olmak üzere, serum dışındaki sıvılarda galaktomannan tespiti yüksek derecede duyarlı olmasına rağmen özgüllük problem olabilir (61). Örneğin, idrarda galaktomannan tespiti uygundur ve bununla birlikte bu yöntem kontaminasyona yatkındır (61). BOS' da galaktomannan tespiti daha duyarlı olduğunu ve merkezi sinir sistemi İA' sını

bulunan hastalarda kültürlerden daha önce İA açısından pozitifleştiğini gösteren küçük olgu serileri bulunmaktadır (61).

Nötropenik olmayan hastalarda testin duyarlılığı tipik olarak düşüktür (%15-30). Bu durumun dolaşımdaki galaktomannan düzeyinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Profilaktik ve ampirik olarak kullanılan antifungal ilaçlarda fungal yükü azaltarak antijen düzeyini düşürmektedir (62,63). Galaktomannan testi yüksek oranda özgül bir tanı aracı olarak görülmektedir. Ancak sonuçların yorumlanmasıyla ilgili sıkıntılar nedeniyle bazı araştırmacılar eşik değerinin düşürülmesini önermişlerdir (51). Hayvan modelleri ve insanlardaki çalışmalar, galaktomannan değerlerinin *Aspergillus* fungal yükü ile korele olduğunu ve İA seyri açısından prognostik marker olarak işlev görebileceğini göstermiştir (64). *Aspergillus fumigatus* olmayan türlerinin sebep olduğu infeksiyonlarda galaktomannan tahlilinin performansı kapsamlı şekilde çalışılmamıştır. Son olarak, numune alma oranı, galaktomannan tahlilinin eşik değeri ve istatistiksel analiz yöntemi (test başına veya hasta başına), bu testin performansını belirgin şekilde etkileyen değişkenlerdir (65).

2.4 1,3-β-D-glukan (Beta Glukan)

β-glukan sistemik mikozların tanısında sık kullanılan bir belirteçdir. β-glukanlar doğada yaygın bulunurlar. Örneğin mantarlarda, mayalarda, alglerde ve bitkilerde bulunurlar. Fungal β-glukanlar hem çözünebilir hem de partiküllü formda olabilirler. Çözünebilir formdaki β-glukan, monositlerin fagositozunu inhibe edebilir. Bunu fagositler üzerinde β-glukanlar için bulunan reseptörleri

bloke ederek yaparlar. Miyaseki ve arkadaşları bunu mantar infeksiyonu gelişiminin muhtemel mekanizması olarak yorumlamışlardır (66).

Kanıtlanmış İMİ olan hastalarda, antifungal tedavi alsın ya da almasınlar glukanların mantar hücre duvarından dolaşıma salındığı bilinmektedir. Kanda veya diğer vücut sıvılarında glukanların varlığı fungemili hastalar için serolojik bir belirteç olarak kabul edilebilir (66).

Tanı sistemi Horseshoe crab' dan (Kuzey Amerika Atlantik sahilindeki bir artropod) pürifiye edilen proteolitik koagülasyon kaskadının aktivasyonuna dayalıdır. β -glukanın gösterilmesi için renk esaslı yöntem tanımlanmıştır (67).

Tanıda kullanılabilen tüm ticari testlerin (Fungitec-G; GlucateLL; β -glukan test Wako WAKO; β -glukan Test Maruha) duyarlılık ve özgüllükleri farklıdır. Geliştirilen bu testlerin ilki (Fungitec-G Test) Limulus faktör G' nin glukana afinitesini kullanır. Koagülasyon kaskadının Faktör-G' sini aktive edebilme yeteneği sayesinde tespit edilir. G-faktörün özellikle α subunitine bağlanır, ve serin proteaz β subunitini aktive eder. Bu testte kromojenik substratdan p-nitroanilidini (pNA) açığa çıkarır. Salınan pNA 450 nm absorpsiyonda saptanır. Yapılan çalışmalarda *C. albicans*' in miçelyal formunun yüksek Limulus faktör-G aktive edebilme yeteneği ve insan kanında β -glukanın gösterilmesinin derin yerleşimli mikozların erken tanısı için önemli olduğu gösterilmiştir (66,67). Testin duyarlılığı % 90, özgüllüğü % 84-100 arasında bulunmuştur ve 20 pg/mL ve üstü düzeyde β -glukan varlığı pozitif olarak kabul edilmiştir (67).

Fungitec-G' dekinе benzer olarak GlucateLL metodu da Limulus enzimini kullanır. Bu yöntem Limulus ameobocyte lysate (LAL)' dan β -glukan için spesifik olan bakteriel endotoksin faktör-C' nin ayrıştırılması esasına dayanır (67). 2004 yılında FDA onayı almış GlucateLL testi için önerilen sınır değеr 80 pg/ml olup, yayınlarda 60 pg/ml kabul edilmekle birlikte, bazı çalışmalarda bu değеr 120 pg/ml olarak belirlenmiştir. 60 pg/ml'nin sınır değеr olarak kabul edildiği çalışmalarda, örnek sayısı ile değışmekle birlikte, testin duyarlılığı % 65-100, özgülüğü ise % 87-96 dır. Bu testin duyarlılığı *Candida* türleri için % 83, *Aspergillus* türleri için % 80, *Fusarium* türleri için ise % 100 olarak belirlenmiştir (68). İA şüphesi olan hastalarda haftada 2 defa çalışıldığında duyarlılık ve özgülüğün arttığı bulunmuştur. Araştırmacılar β -glukan ve galaktomannanın beraber tespitinde özgülüğün % 100' e ulaştığını bildirmektedirler. Eş zamanlı çalışıldığında her iki antijenin pozitif olması İA için değerliyen testlerden sadece birinin pozitif olması yalancı pozitiflik olarak kabul edilmelidir (67). β -glukan için yalancı pozitifliğe neden olan bazı nedenler tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2: Yalancı pozitif β -glukan sonuçlarının sebepleri

<ul style="list-style-type: none">• Selüloz membranlar kullanarak yapılan hemodiyaliz• Albümin• İntravenöz immün globülin• İntravenöz uygulama için selüloz derinlik filtrelerinin kullanılması• Serozal yüzeylerin gazlı bezle kapatılması• İntravenöz amoksisilin-klavulanik asit

Özellikle hematolojik maligniteli hastalarda mantar infeksiyonu olmamasına rağmen β -glukan için yalancı pozitif sonuçlar görülebilir.

Kemoterapiyi takiben immun sistemin toparlanması sonucu spontan olarak temizlenen geçici fungemi ve *Aspergillus* antijenemisinin olduğunu destekler (67).

β -glukan testi, galaktomannan testine göre daha geniş spektrumdaki küf mantarlarını tespit ettiği için, İMİ' ler açısından yüksek riskli hastalarda koruyucu tedavi stratejilerine katılma potansiyelleri bulunmaktadır (69). *Zygomycetes* veya *Cryptococcus neoformans* hariç pek çok patojen maya ve filamentli funguslarda hücre duvarının ayrılmaz bir bileşeni olan β -glukan, İA ve kandidozda ayrıca, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ve *Acremonium* türlerinin sebep olduğu, daha az görülen fakat bağışık engelli hastalarda önemli olan türlerin tespitinde etkili bulunmuştur (8,70).

Serum β -glukan düzeyi tespiti özellikle akut myeloid lösemi, akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, non-hodgkin lenfoma, endojen fungal endoftalmitis, *P. jirovecii* pnömonisi ve İPA' lı hastalarda faydalıdır (67).

İA' lı hastalarda hastaların serum β -glukan konsantrasyonlarında 5 gün içinde anlamlı bir artış olur. Salınan bu antijenin kinetiğinden dolayı serum örneklerinin haftada iki kez çalışılması gerekir. Yapılan çalışmalarda radyolojik bulgulardan 9.3 gün önce İA olması muhtemel hastaların %100' ünde β -glukan saptanabilmiştir. Odabaşı ve arkadaşları klinik tanıdan ortalama 10 gün önce β -glukanın serumda pozitif olduğunu bildirmişlerdir (60) .

β -glukan tespitini sağlayan ticari olarak mevcut yöntemlerin adaptasyonu konusunda büyük beklenti vardır. Çünkü İMİ tanısı onun kanda ve steril diğer

vücut sıvılarındaki varlığına dayanır. β -glukan antijeninin takibi hastalığın yaygınlığını ve tedaviye cevabın belirlenmesi için faydalıdır (67).

2.5 Mannan ve Antimannan Testleri

Glukanlar gibi mannanlar da *C. albicans* hücre duvarının majör bileşenidir, fakat glukanların aksine, mannanlar hücre yüzeyine non-kovalan şekilde bağlanmıştır (71). İmmün modülatör özellikleri olan oldukça immünojenik bir polisakkarit antijendir. Mannan, kandidanın hücre duvarının kuru ağırlığının %30' unu oluşturur. Maya mannoproteinleri golgi kompartmanında sentez edilir. Daha sonra hücre duvarına getirilir. Oligomannoz epitopu humoral cevaba neden olabilir (60).

İK infeksiyonlarının tanısının zor olması, klinik bulgularının özgün olmaması ve kan kültürlerinin düşük duyarlılığı nedeniyle tanıda kullanılabilecek ticari olarak geliştirilmiş iki test bulunmaktadır. Bunlar temel bir hücre duvar antijeni olan mannanın ve antimannan antikörlerinin ELISA ile saptanmasıdır (72). Sistemik kandidoz için riskli hastalarda dolaşan mannan antijeni ve anti mannan antikörlerinin takibi tanıda önemlidir (60).

İK tanısını kolaylaştırmak için mannan antijenemisinin kullanılması önerilmiştir; en önemli sınırlılık hastanın serumundan antijenin hızlı temizlenmesidir (73).

Sendit ve arkadaşları kanıtlanmış İK olan hastalarda mannan tesbit edilebilme olasılığının % 40 olduğunu göstermişlerdir. Antikörlerin varlığı ise

hastaların % 53' ünde gösterilmiştir. Her iki belirtecin paralel tesbiti ise yüksek duyarlılık (% 80) ve özgüllük değerlerine (% 93)' e ulaşır (57,60).

Ayrıca nötropenik hematoloji hastalarında mannanemi ve anti-*Candida* antikorlarının paralel izlenmesinin de değerli olduğu gösterilmiştir. Yera ve arkadaşları hastaların % 73' ünde, pozitif kan kültüründen 2-15 gün önce pozitif serolojik testleri elde etmişlerdir. Pozitif kan kültürü ile anti mannan antikorunun tesbiti arasında ortalama 7, mannan antijeninin tesbiti ile de 6 gün olduğunu bulmuşlardır (57).

Mannan ve antimannan araştırılmasının İK için yüksek riskli olguların erken tanısında özellikle kültürlerin ve histopatolojinin negatif olduğu veya örneklerin alınamadığı olgularda kullanılabileceği belirtilmiştir (72).

Riskli hastalarda kültür metodlarıyla kombine olarak her üç günde bir mannan ve anti- mannan antikorunun sürekli ölçülmesi yoluyla takip edilir. *Candida* infeksiyonu sırasında anti- mannan antikorlarının kontrolü özellikle hastaların immün durumlarını saptamak açısından önemlidir. Ancak antikorların varlığının gösterilmesi kandidozun invaziv ve yüzeysel formların birbirlerinden ayrılmasına izin vermez. Kalıcı antijenemiye rağmen antikor üretiminin olmaması kötü prognostik faktördür. Antikor seviyesindeki ani artış aktif infeksiyon lehinedir (57,60).

Düşük antijenemili ve erken dönem infeksiyonlarının tanısında tavsiye edilen test immünoenzimatik Platellia Candida Ag (Bio- Rad) ve paralel olarak anti- mannan antikor testidir (Platelia – Candida – Ab/Ac/Ak; Bio – Rad) (57).

Bu iki testin İK tanısında güvenilirliği genelde sınırlı kalmaktadır. Birden fazla örneğin alınması İK saptama olasılığını arttıracaktır (57).

Yakın zamanda bir immün enzimatik yöntem (Down-flow immuno assay) kullanılmaya başlanmıştır. Bu test İK' nın (mannan antijenleri) erken tanısında kullanışlıdır ve Unimedi Candida Monotest (Unitica) olarak adlandırılır (57). Bu testlerin rutin kullanımı, erken tanıyı artırmak için değerli olabilir fakat tek başlarına tanı için kesin bir çözüm sunmamaktadır (44).

2.6 Moleküler yöntem

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri içerisinde hedef amplifikasyon yöntemlerinin ilk ve en önemlisi PZR' dir. Nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. Hedef DNA / Ribo Nükleik Asit' in (RNA) selektif olarak amplifikasyonuna olanak sağlar. Isıya dayanaklı DNA polimeraz enzimi yardımıyla genomun spesifik bölgelerinin kopyalanması gerçekleştirilir (74).

Son yıllarda İMİ' lerin tanısında kullanılacak panfungal veya fungusu özgü PZR teknikleri geliştirilmiştir. Bunların direk bakı ve kültüre göre duyarlılığı daha yüksek olmasına rağmen, kolonizasyon veya subklinik infeksiyonlarda da pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Bunun yanında geliştirilen kalitatif ve kantitatif

PZR yöntemlerinin protokollerindeki farklılık göz ardı edilememekte, bu da standardizasyon sorununu ortaya çıkarmaktadır. Bu yöntemlerde hedef bölge olarak mantar nükleer rRNA' sından üç gen bölgesi seçilebilmektedir. Bunlar 26S veya 28S, 18S ve 5.8S geni ile aralarındaki ITS bölgeleridir. Amplifikasyon ürünlerinin belirlenmesinde DNA probları, mikroarray, floresan in situ hibridizasyon ve pirosekanslama kullanılabilir. Bunların yanında hızlı amplifikasyon ve kantitatif değerlendirme sağlayan gerçek zamanlı PZR de uygulamaya girmiştir (75). Bu yöntemlerin tanıya katkısı olabilmekle birlikte tanı algoritmasından yerini alabilmesi için daha standart ve geniş kapsamlı araştırmalara ve ciddi validasyon çalışmalarına gereksinim söz konusudur (75).

Bu konuda geliştirilen ve deneme sürecinde olan birçok PZR yöntemi olmasına rağmen henüz pratik kullanıma giren standart bir PZR protokolü yoktur. Panfungal primerler (örn. 18S ribozomal DNA) ya da *Aspergillus* gibi belli bir mantar türüne yönelik primerler aracılığıyla hasta serumu veya BAL sıvısında fungal infeksiyon araştırması yapılabilmektedir (43)

Bu yöntem ile özellikle pulmoner aspergilloz tanısına yönelik çalışmalarda testin duyarlılığı % 75-100, özgüllüğü ise % 90' ların üzerinde bulunmuştur (43). Bu çalışmalarda galaktomannan antijen testinde olduğu gibi haftada iki kez veya daha fazla alınan serum örnekleri ile düzenli test edildiğinde klinik infeksiyon başlamadan ortalama 9 gün önce testin pozitifleşmeye başladığı gösterilmiştir. Test açısından en önemli handikap ise yüksek yalancı pozitiflik ve buna bağlı düşük pozitif prediktif değerleridir (% 42-44). Yalancı pozitiflik değerleri

özellikle BAL sıvısı test edildiğinde fungal kolonizasyon riski nedeniyle daha sık olmaktadır (43). Kemik iliği nakli hastalarında BAL sıvılarında aspergilloz tanısına yönelik olarak galaktomannan ve PZR testlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada galaktomannan testinin duyarlılığı % 76, özgüllüğü % 94 bulunurken, PZR testinin duyarlılığı % 67, özgüllüğü ise % 100 bulunmuştur (43).

Aspergillus nükleik asitlerinin PZR yöntemi ile erken İA tanısı için gittikçe artan şekilde değer görmektedir. Diğer kültür dışı yöntemlerin aksine, PZR' nin cins seviyesinde *Aspergillus*' un yanı sıra fırsatçı küf mantarlarını hızlı saptama ve moleküler tanımlama olasılığı vardır (76,77). Standardizasyon eksikliği ve ticari olarak hazır bir sistemin olmayışı, İA tanısında PZR' nin rolünün gösterilmesinde önemli sorunlardır. Ek olarak, infeksiyonun erken evresinde dolaşımdaki *Aspergillus* DNA' sı saptanabilmesine rağmen, infeksiyon yerinden hangi formdaki DNA' nın nasıl serbestleştirildiği ve *Aspergillus* DNA serbestleşmesinin kinetiği üzerine antifungallerin uygulanmasının etkisi bilinmemektedir. Son olarak, DNA serbestleşmesi için fungal nekroz gerektiğinden, PZR' nin antijen serbestleşmesini saptayan testlerle kıyaslandığında erken İA tanısı için gerçekten daha duyarlı olup olmadığı sorusu akla gelmektedir (78). Buraya kadar, tam kan kullanarak PZR sonuçlarının erken İA tanısı ve tedavi yanıtının takibi için yeterince duyarlı olduğu görülmektedir, bununla birlikte, PZR' de serum kullanılması galaktomannan ve β -glukan gibi diğer biyolojik markerlerin eş zamanlı tespiti gibi avantaj sunabilir (76,77). Ayrıca, 18 S ribozomal alt ünitelerin yüksek derecede korunmuş çoklu kopya sekanslarının amplifikasyonunun yüksek duyarlılıkla patojen mantarların tespitine

olanak sağladığı görülmektedir (76,77). Önemli olarak, gerçek zamanlı PZR teknolojileri, fırsatçı mantarların genus ve türlere özgül olarak tanımlanması için spesifik DNA sekanslarının amplifikasyonu sonrasında hızlı ve etkili bir yöntem sunmaktadır (örneğin 18S ribozomal alt ünitelerin ITS1 bölgeleri) (76,77). Ayrıca kontaminasyona daha az yatkın olan gerçek zamanlı PZR protokolleri, DNA ekstraksiyonu için otomatik sistemlerle birlikte mevcut PZR testlerinin güvenilirliğinin standardizasyonuna ve gelişmesine yönelik önemli bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır (77). Gerçek zamanlı PZR dolaşımdaki fungal DNA miktarının saptanmasına olanak sağlaması nedeniyle, antifungal ilaçlarla tedavinin izlemi sırasında fungal yükün indirekt bir parametresi olarak da kullanılabilir.

PZR testi ile genomik sekansların amplifikasyonu, çoğunlukla İA için geliştirilmiş olup İK' da rutin olarak kullanılmamaktadır (79).

Kan, serum, BOS ve diğer klinik örneklerde *Candida* DNA' sının tespit edilmesi için çok sayıda PZR bazlı metod geliştirilmiştir. *Candida* genomu üzerinde birçok bölge tesbit için hedef bölgeler olmak üzere değerlendirilmiş ancak bu çabaların çoğu ribozomal DNA gen kompleksi üzerine odaklanmıştır. Hem nested hemde panfungal PZR formatları ve kantitatif PZR metotları geliştirilmiştir. Moleküler tanı yöntemleri doğrudan dokudan veya vücut sıvısı örneklerinden *Candida* infeksiyonunun hızlı bir şekilde teşhis edilmesi için ümit verici görünmektedir ancak yanlış pozitif sonuçlar oluşabilir ve standardize ticari metodlar mevcut değildir (16). Yakın zamandaki bir çalışma, non-nötropenik YBÜ hastalarında prospektif olarak üç adet TaqMan bazlı PZR testini

değerlendirerek ve bu yöntemin % 90.9 duyarlılık ve % 100 özgüllük gösterdiğini bildirmiştir (44). Bu sonuçlar ileri değerlendirmeyi gerektirir.

2.7 İnvazif mantar infeksiyonlarda tanıya genel bakış

İnvaziv mikozlar son yıllarda önemli tehlikeli toplumsal sağlık problemleri içinde ön plana çıkmaktadır. Bu hastalıkların insidansında beliren dramatik artış risk altındaki popülasyonda görülen belirgin artışa bağlanmıştır. Bu popülasyon grubunda AIDS' li hastalar, solid organ ya da kök hücre nakli alıcıları, hematolojik maligniteli hastalar ve diğer bağışık engelli bireyler bulunmaktadır (10,80,81).

İMİ tanısı genelde klinik bulgularla laboratuvar tanısının birleştirilmesine dayanır. Ancak klinik belirtiler çoğunlukla özgül değildir ve başka hastalıklarla karışabilir. Erken laboratuvar tanısı ise genellikle zor konulmaktadır (82). Kesin laboratuvar tanısı, etkenin klinik örnekte direk mikroskopi ve histopatolojik olarak görüntülenmesi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde tanımlanması ile konulmaktadır. Ancak mikroskobik inceleme ve kültür için bu örnekler, invaziv işlemlerle temin edilebilir ve bu işlemler çoğu zaman hastaların sitopenilerinden veya kritik durumlarından dolayı yapılamaz. Bu nedenle mantar yükü artmadan ve hasta ölmeden önce nadiren tanı konulabilir. Tanı için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerden yararlanılmaya çalışılmaktadır (9).

Mortalite ve morbiditenin düşürülmesi açısından erken tanı ve tedaviye başlanması konusu çok önemlidir. Bu yüzden çalışmalar, erken tanı koyarak bu

hasta grubunda yüksek mortalitenin düşürülmesi amacıyla yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (9).

2.8 Mantar hücre duvarı

Mantar hücre duvarı, mantar hücresinin çevreyle ilişkisini sağlarken hücreyi osmotik basınçtaki değişiklikler ve diğer çevresel streslere karşı koruyan dinamik bir yapıdır. Hücre duvarı eskiden etkisiz bir dış iskelet olarak kabul edilirken, artık çevresel stres ve kültür ortamlarının modifikasyonu sonucunda sürekli değişim gösteren dinamik bir yapı olarak kabul edilmektedir (83,84).

Hücre duvarının polisakkarit yapıdan zengin 3 boyutlu bir yapısı vardır. Çalışmalarda mantar hücre duvarının primer olarak kitin, glukanlar, mannanlar ve glikoproteinlerden oluştuğu gösterilmiştir (85).

Mantar hücre duvarının yapısı ve biyosentezi duvarının biyolojik rolü, kendine has biyokimyasal ve yapısal organizasyonu ve içeriğindeki çoğu komponentin memeli hücrelerinde olmayışı gibi sebeplerle antifungal ilaçların geliştirilmesi için mükemmel bir hedeftir (85).

Mantar hücre duvarı, hem koruma hem de saldırı fonksiyonları içermektedir. Konak çevresi ile mantarın karşılaşmasında ilk bariyer olarak görev almasından dolayı koruyucudur. Hücre duvarı hem çevreden kaynaklanan osmotik basınç değişikliklerine karşı hücrenin yeterli mekanik sağlamlığının elde edilmesini sağlamak, hem de hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve mantarın

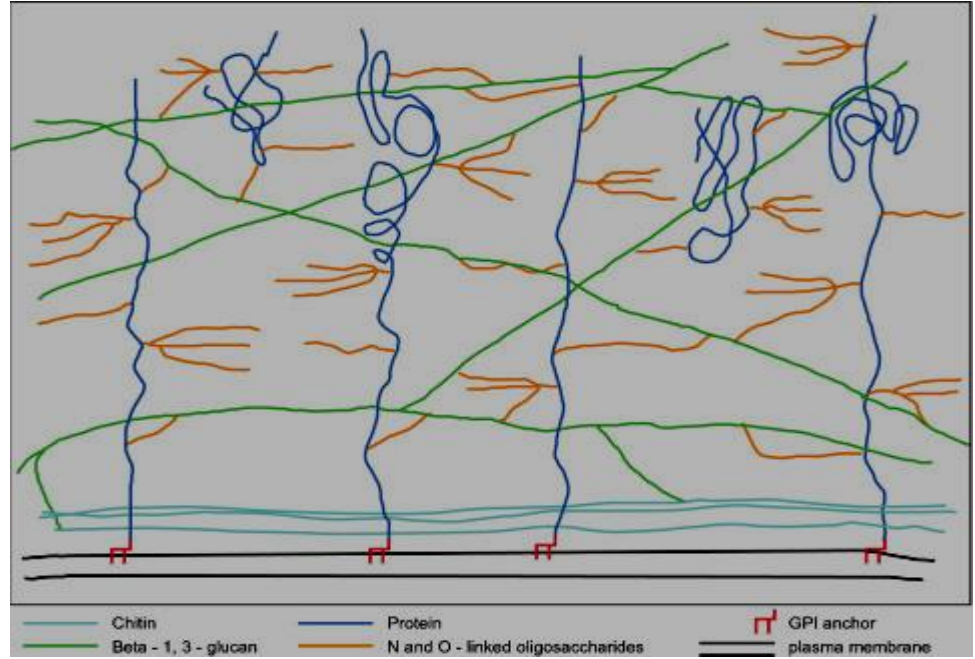
yaşam siklusu boyunca farklı hücre formasyonlarına izin vermek için yeterli esnekliği sağlamak zorundadır. Hücrenin şeklini koruması ve çevresel strese uyum için hücre duvarı mantar hücresinin çevresiyle ilişkisine izin vermek zorundadır. Ayrıca saldırı fonksiyonunda içerir, mantar hücre duvarının hidrolitik ve toksik molekülleri, mantarın ekolojik ortamına yerleşmesi için gereklidir. Hücre duvarı bir hücrenin diğerine veya substratına tutunmasına aracılık eder. Hücre duvarı sert yapısı sayesinde penetrasyon için ek bir güç sağlarken, ayrıca hücre içine doğru sinyal transdüksiyonunu aktive eden bir sinyal merkezi olarak da görev alır (85).

Hücre duvar yapısının hasarlanması sıklıkla lizis ve ölümle sonuçlanan fungal hücre morfolojisi ve bütünlüğünde derin etkiler oluşturur (85).

Fungal hücre duvarı esas olarak içerdiği glukan, kitin, glikoprotein yapılarının dışında, mantar hücre türüne göre değişiklik gösteren ilave minör hücre komponentleride (melanin deriveleri, inorganik elementler, fosfatlar ve aminopolisakkaritler) içerir. Hücre duvarında bulunan glikoproteinler, yaygın olarak hem N- hem de O- bağlı karbonhidratlarla değişikliğe uğramıştır. Ve çoğu durumda glikozil- fosfotidil- inositol (GPI) bağları içerir. Glukan komponenti esas olarak uzun lineer β 1,3 bağlı glukozdan yani β 1,3 glukandan (β -glukan) oluşur. Kitin, duvarın glukan ve glikoprotein kısımlarına göre daha az miktarda yer alır ve β 1,4 bağlı rezidü N- asetil glikozamin zincirlerinden meydana gelir (85).

Glikoprotein, glukan ve kitin komponentleri, hücre duvarı yapısının temelini oluşturan kompleks bir ağ oluşturmak üzere sıkı çapraz bağlarla bir arada olan komponentlerdir.

Çoğu mantarda hücre duvarının en merkezinde β -1-4 bağı ile kitine bağlanan dallı, β -1,3 1,6 glukan (kor yapı) bulunmaktadır. Bu yapısal merkez farklı mantar türlerine bağlı olarak farklı dekorasyonda olabilir, genellikle fibrilerdir ve alkali uygulaması sonrası ortadan kalkan amorf bir yapı içerisine gizlenmiştir (85).



Şekil 1: Mantar hücre duvarının yapısı

2.9 Mantar hücre duvarının kitin yapısı

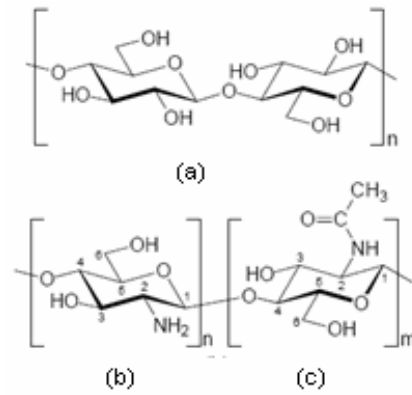
Kitin, mantar hücre duvarının göreceli olarak minör, yapısal olarak lineer homopolimer β -1,4 bağılı N-asetil glukozaminden oluşan önemli bir

komponentidir. Kitin maya hücre duvarı kuru ağırlığının % 1-2' sini oluşturur. Oysaki *Neurospora* ve *Aspergillus* gibi filamantöz mantarların hücre duvarlarında kitin miktarı %10-30 olarak belirtilmektedir.

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir (86). Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde de bulunmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi kitosandır (86). 1894' de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C' de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan kitosanı elde etmiştir (86). Kitosan günümüzde tıptan gıdaya, ziraatten kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilir. Kitosan, medikal tekstiller alanında oldukça önem kazanmıştır. 1960' ların ortalarından beri Japonya başta olmak üzere pek çok Asya ülkesinde bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle yara tedavisinde doku sağlanması için kitosan oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, yapay kan damarları, , kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi gibi malzemelerin yapımında kullanılmaktadır. Kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), tümör inhibitörü, antifungal, antibakteriyal, ve hemostatik etki göstermesi gibi faydaları da bulunmaktadır. (87).

In-vivo testler, kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını göstermiştir. Kitosan, yara iyileşmesi prosesinde; polimorfonükleer hücre ve makrofajların aktivasyonu, fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, dev

hücre migrasyonu ve kollajen sentezinin stimülasyonu gibi aşamalarda önemli rol oynamaktadır. Kitosan, çeşitli ilaç formülasyonlarında uygun bir matriks olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli ilaçlar, kitosan matrisi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmekte ve böylece kontrollü ilaç salınımını sağlamaktadır.



Sekil 2: Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları

Hem mayalar hem de filamantöz mantarlarda kitin mikrofibrilleri zincirler arası hidrojen bağlarından oluşur. Bu kristal polimerler büyük bir gerilim kuvvetine sahiptir ve hücre duvarının tümünün bütünlüğünü sağlar. Kitin sentezi bozulduğunda duvarın yapısı bozulur, büyümekte olan hif erimeye başlar ve mantar hücresi malforme olarak osmotik açıdan stabil olmayan bir hal alır ve üzerinde baloncuklar gelişir (85).

Hastalık sırasında yoğun olarak miçel gelişiminden ve akciğerde germinasyonunu tamamlamamış konidiyaların uzunca bir süre kalabilmesinden dolayı Colony Forming Unit (CFU) ölçülerine göre fungusun kantitasyonu

hastalığın şiddetini belirlemede iyi bir belirteç olarak kabul edilmemektedir. Bunun için fungal biyokütle ile uyumlu olan kitinin gösterilmesinin in vivo üremeyi daha uygun olarak yansıtabileceği açıklanmıştır (11,12).

Bu çalışmada, İMİ şüphesi ile takip edilmekte olan nötroopenik hastaların klinik örneklerinde kültür, galaktomannan antijeni, β -glukan düzeyleri, *Aspergillus* ve *Candida* için PZR sonuçlarının karşılaştırılması ve kitin antijeninin gösterilmesine yönelik ELISA yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 15/11/2009 – 15/05/2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' nde İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji bilim dalında yatmakta olan 46 hasta alındı. Çalışmamıza sistemik mikoz şüpheli nötroopenik ateşli (en az bir gün süreyle nötrofil sayısının $500/\text{mm}^3$ ' ün altında olması ve antibiyotik tedavisine rağmen 38°C ' nin üzerinde ısrarcı ateş) hastalar dahil edildi. Trombositopeni nedeniyle kan alınamayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Hastalardan ve 46 sağlıklı gönüllüden alınan serum örnekleriyle kültür, β -glukan testi, galaktomannan, *Candida* PZR, *Apergillus* PZR testleri çalışıldı ve kitin antijenin aranmasına yönelik ELISA testi geliştirildi. Çalışmamızla ilgili etik kurul kararı Ankara 1 No' lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun 11/11/2009 – 106 tarih ve numarası ile alınmıştır.

3.1 Gereçler

3.1.1 Laboratuvar araçları

Etüv (Elektro-mag, Türkiye)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Pastör fırını (Elektro-mag, Türkiye)

Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Işık mikroskobu ve dijital fotoğraf makinesi CX31 (Olympus, Japonya)

ELISA okuma cihazı (Elx800, BioTek, ABD)

İnkübatörlü ELISA okuma cihazı (BioTek Synergy HT, ABD)

Santrifüj cihazı (HERMLE Z380, Almanya)

Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

Platelia® *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa)

Fungitell™ (CAPE COD, ABD)

Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Cam eşyalar, özeler, kuru blok (Bio TDB-100, Almanya)

Light Cycler® 2.0 (Roche, Almanya)

3.1.2 Sarf malzemeler

96 kuyucuklu, steril, yüksek bağlanma kapasiteli ELISA çalışma plağı
(costar, USA)

Tween-20 (Amresco, Kanada)

Sodyum azide (NaN₃) (SIGMA, ABD)

Bovine Serum Albumin, (BSA) (Amresco, Kanada)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biological Industries ,İsrail)

Sample buffer solution

CDA2 (Kitin antijeni) peptid (Gen Script, ABD)

Anti-CDA2 pürifiye antikor (Gen Script, ABD)

Pre-immün serum (Anti-CDA2' ye bağlanan spesifik antikor) (Gen Script, ABD)

Keçide üretilmiş HRP işaretli anti – tavşan Ig G

Tetra Metil Benzidin (TMB)

3.1.3. Besiyerleri

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Oxoid, İngiltere)

Besiyeri (pH = 5.6)

1 litre SDA için: 47 g SDA toz, 5 g agar, 1 L distile su 121°C' de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş, sonra petri plaklarına dağıtılıp, oda ısısında katılaşmaya bırakılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kültür

İMİ şüpheli hastalardan alınan kan örnekleri otomatik kan kültür şişelerine eklenmiştir. Kültürler yedi gün takip edilmiştir. Üreme sinyali veren şişelerden rutinde kullanılan SDA plaklarına ekilerek 24°C ve 37°C' de inkübe edilmiştir. Üreme olan plaklardaki koloniler önce gram boyama ile boyanarak mikroskopta maya hücreleri görülmüştür. Daha sonra maya kolonileri tür ayrımı için mısır unu agara ekilmiş ayrıca germ tüp testi ve ID-32-C sistemiyle maya tiplendirilmesi yapılmıştır.

3.2.2. Alınan örneklerle yapılan işlemler

Etilen Diamin Tetra Asetik Asitli (EDTA) tüplere alınan kan örnekleri *Aspergillus* DNA' sının aranması için PZR işlemi yapılmak üzere ayrılmıştır. Heparinli tüplere alınan kan örneklerinin serumu β -glukan ve galaktomannan varlığının araştırılması için saklanmıştır. Bütün örnekler uygun ambalajlar içinde, işlem gününe kadar -20°C' de saklanmıştır.

3.2.3. ELISA ile *Aspergillus* antijeninin aranması

3.2.3.1-Testin prensibi

Platelia® *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa) serumda galaktomannanı saptayabilen immünoenzimatik sandviç mikrokaplama yöntemidir. Testte tavşan monoklonal antikorları EBA-2 kullanılır. Monoklonal antikorlar ELISA

çukurlarında kaplanmış ve peroksidazla işaretlenmiş olarak bulunur. Test 0.5-1 ng/ml galaktomannanı saptayabilecek hassaslıktadır.

3.2.3.2-Testi uygulamadan önce yapılan işlemler

a- ELISA çukurcukları paketinden çıkarılarak ve oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir.

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

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

d- Konjugat (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikorları) % 0.01 metiolat içerir ve kullanılmaya hazırdır.

e- Serum işleme solüsyonu (EDTA asit solüsyonu) kullanılmaya hazırdır.

f- Substrat buffer (sitrik asit, sodyum asetat, pH 5.2, % 0.009 hidrojen peroksid ve % 4 dimetilsülfoksit) kullanılmaya hazırdır.

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

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

3.2.3.3. Testin uygulanışı

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

b- 10000 rpm' de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üstteki sıvı bölüm çalışılmıştır.

c- Aynı işlemler kontrol serumları için de yapılmıştır.

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

e- ELISA plağının üzeri yapışkan film ile kaplanmıştır.

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

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

h- ELISA plağında yıkama solüsyonunun kalmamasına dikkat edilmiştir.

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

j- Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir.

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

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

3.2.3.4. Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

a- Eşik (cut-off) değeri eşik kontrol serumunun optik dansitesi olarak belirlenmiştir.

b- Her serum için indeks hesaplanmıştır:

İndeks = örneklerin optik dansitesi / eşik serumun optik dansitesi

İndeks \geq 0.5 pozitif olarak değerlendirilmiştir.

c- Testi geçerli saymak için aşağıdaki sonuçların gerekleşi gerekleşimediğine bakılmıştır.

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

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

Negatif indeks = OD negatif serum / OD kontrol eşik serum < 0.5

3.2.4. Beta glukun testinin çalışılması

Mantarların hücre duvarında bulunan β -glukunun araştırılması için Fungitell™ (CAPE COD, ABD) glukun ölçüm kiti kullanılmıştır. Bu kit proteaz zimojen temelinde dayalı olarak çalışır ve kinetik olarak ölçüm yapılabilen kolorimetrik bir işlem içermektedir.

Standartın dışında hiçbir malzeme glukun içermemektedir. Ayrıca testte kullanılacak diğerk malzemelerde glukundan uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla cam malzemeler 235°C’ de 7 saat tutulmuş, plastik malzemeler ise kullanımdan önce RGW solüsyonu ile çalkalanmıştır.

3.2.4.1-Test uygulanmadan önce yapılan işlemler

a- Glukun standartlarının hazırlanması:

Standart 1: Bir şişe glukun 2.9 ml RGW solüsyonu ile karıştırılmıştır (100 pg/ml glukun içermektedir).

Standart 2: 400 μ l solüsyon 1 + 400 μ l RGW (50 pg/ml glukun)

Standart 3: 400 μ l solüsyon 2 + 400 μ l RGW (25 pg/ml glukun)

Standart 4: 400 μ l solüsyon 3 + 400 μ l RGW (12.5 pg/ml glukun)

Standart 5: 400 μ l solüsyon 4 + 400 μ l RGW (6.25 pg/ml glukun)

Standart 6: RGW solüsyonu (glukun içermemektedir).

b- Serum işleme solüsyonunun hazırlanması

400 µl, 0.25 M KOH ile 400 µl, 1.2 M KCl cam tüp içinde karıştırılmıştır.

c- Fungitell ayırıcının bir tanesi önce 2.8 ml RGW ile karıştırılmış, sonrasında 2.8 ml pirozol (yeniden yapılanma tamponu) eklenmiştir.

3.2.4.2.-Testin uygulanışı

a- Kuyucuklara örneklerden 5' er µl dağıtılmış (serum ve BAL örnekleri) ve üzerlerine 20 µl serum işleme solüsyonundan eklenmiştir. İmalatçı firmanın önerisine uyularak dış kuyucuklar kullanılmamıştır.

b- Plate 5 saniye çalkalandıktan sonra 10 dk 37°C' de bekletilmiştir.

c- Standartlardan 25' er µl dağıtılmıştır.

d- Standartlar ve örneklerin üzerine hazırlanmış Fungitell ayırıcından 100' er µl dağıtılmıştır.

e- Plate 5 saniye çalkalanmıştır.

f- İnkübatörlü ELISA okuyucusunda, 37°C' de, 405 nm dalga boyunda birer dakikalık aralıklarla 40 dakika okuma yaptırılmıştır (Synergy HT, BioTek, ABD).

3.2.4.3.- Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

Veriler toplandıktan sonra analizleri yapılmıştır. 0-40 dakika arasındaki her nokta için optik dansite değişiminin ortalama hızı hesaplanmış ve test edilen her örneğin glukoz konsantrasyonu kaydedilmiştir ($R^2=0,8982$).

Fungitell değerlendirmede sonuçlar pg/ml olarak ifade edilmektedir. Bu testle 31.25-500 pg/ml arasındaki değerler saptanabilmektedir. 500 pg/ml' nin üzerindeki değerler için örneğin seyreltildikten sonra tekrar test edilmesi önerilmiştir.

60 pg/ml altındaki değerler negatif, 80 pg/ml üzeri pozitif, 60-79 pg/ml arası şüpheli sonuç olarak yorumlanmıştır.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

3.2.5.1. DNA' nın eldesi

Alınan serum örneklerinden mantarlara ait DNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edilmiştir.

EDTA' lı tüplerdeki kan örnekleri saflaştırmaya alınmadan önce eritrositlerin uzaklaştırılması için kırmızı kan hücresi (Red Blood Cell) lizis solüsyon protokolü uygulanmıştır.

1. Örneklerden 300 µl alınıp 1.5 ml' lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.
2. Üzerlerine 1.2 ml kırmızı kan hücresi lizis solüsyonundan eklenmiş ve pipetaj ile iyice karıştırılmıştır. Sonra 5 dakika -20°C ' de bekletilmiştir.

3. Üç dakika oda sıcaklığında 10000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
4. Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle alınmıştır.
5. Çökelek rengi kırmızı ve daha koyu ise 2. ve 3. basamaklar tekrar edilmiştir.

3.2.5.2.- Saflaştırma basamakları

1. Yaklaşık 100 µl' lik örnekler üzerine 400 µl DNA lizis bağlama solüsyonundan eklenmiş ve vortekslenmiştir.
2. Karışım 65°C' de 10 dakika , +4°C' de 2 dakika bekletilmiştir.
3. Spin santrifüj yapıldıktan sonra üzerine 500 µl DNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.
4. Onbeş dakika 13000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
5. Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.
6. Beş dakika 13000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
7. Üst kısım pipetle tamamen alınmış ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.

8. 20 µl DNA dilüsyon solüsyonundan konulmuş, vortekslenip spin santrifüj edilmiştir.

9. Tüm DNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar –20°C’ de bekletilmiştir.

3.2.5.3. DNA’ nın çoğaltılması ve gösterilmesi

Elde edilen DNA’lar hedeflenen primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. *Aspergillus* DNA’ sının gösterilmesi için *Aspergillus*’ a özgül primer - probe karışımı ile *Candida* DNA’ sının gösterilmesi için *Candida*’ ya özgül primer-probe karışımı ile gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 3: PZR için kullanılan primer ve prob dizileri

Primer	5’-3’ yönünde dizi
<i>Candida</i> primer forward	CCT-GTT-TGA-GCG-TCR-TTT
<i>Candida</i> primer reverse	TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT
<i>Candida</i> probe	6FAM – CAT-TGC-TTG-CGG- CGG-TA – TMR
<i>Aspergillus</i> primer forward	CTG-TCC-GAG-CGT-CAT-TG
<i>Aspergillus</i> primer reverse	TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT
<i>Aspergillus</i> probe	6FAM – AGC-CGA-CAC-CCA- ACT-TTA-TTT – TMR

Tablo 4: Mantar primerleri kullanarak hazırlanan PZR karışımı

KARIŞIM	1X	15X
Su	2 µL	30 µL
MgCl ₂ (25mM)	1 µL	15 µL
Fw primer	1 µL	15 µL
Rev primer	1 µL	15 µL
Probe	0.5 µL	7.5 µL
Enzim	2 µL	30 µL
Toplam Hacim	7.5 µL	112.5 µL

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µl, DNA' dan ise 2.5 µl kapillere eklenmiştir. Amplifikasyon kontrolü için sadece karışımdan 10 µL bir kapiller içerisine konularak (içinde DNA yoktur) buna negatif kontrol denmiş ve sadece bu kapillerin kapağı karışım odasında (temiz oda) kapatılmıştır. Diğerleri ise kurşun bloğun içinde ekstraksiyon odasında bulunan biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye) içine götürülmüş ve orada DNA örneği eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler ® 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir.

Prob kullanıldığı zaman amplifikasyon TaqMan teknolojisi ile gerçekleştirilmiştir; Isı döngüsü aşağıda verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu sonrasında, “absolute quantification” analizi incelenmiştir.

Tablo 5. Çoğaltma protokolü safhaları

Denaturasyon

Siklus	1
Analiz Modu	Yok
<i>Isı değişimleri</i>	<i>1. segment</i>
Hedef ısı (°C)	95° C
İnkubasyon zamanı	10 dakika
Isı değişim oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedef ısı(°C)	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0
Step gecikmesi	0
Okuma modu	Yok

Amplifikasyon

Siklus	50	
Analiz Modu	Kantitasyon	
<i>Isı Değişimleri</i>	<i>Segment 1</i>	<i>Segment 2</i>
Hedef ısı (°C)	95	60
İnkubasyon zamanı (h:min:s)	10	40
Isı değişim oranı (°C/s)	20.0	20.0
İkinci hedef ısı (°C)	0	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0	0.0
Basamak gecikmesi (Siklus)	0	0
Okuma modu	Yok	Tek

Soğutma

Siklus	1
Analiz Modu	Yok
<i>Isı Değişimleri</i>	<i>Segment 1</i>
Hedef ısı (°C)	40
İnkubasyon zamanı	30
Isı değişim oranı (°C/saniye)	20.0
İkinci hedef ısı (°C)	0
Basamak uzunluğu (°C)	0.0
Basamak gecikmesi (Siklus)	0
Okuma modu	Yok

3.2.6. ELISA ile kitin antijeninin aranması

3.2.6.1 ELISA testi uygulama yöntemi

a- Antikitosan poliklonal antikorun sulandırılarak hazırlanması:

b- Antikitosan poliklonal antikor 0.6 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 15 ml PBS (içerisine % 0.02 sodyum azide eklenen) ile sulandırılmıştır. Yavaş yavaş karıştırılarak beş altı kez çevrilmiş, 3000 devirde 10-15 dakika santrifüj yapılarak süpernatantı yeni bir tüpe aktarılmıştır.

c- Preimmün serumun (Antikitosan poliklonal antikorun spesifik antikorunun) hazırlanması:

0.5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde PBS ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

d- Keide üretilmiş HRP işaretli anti – tavşan Ig G, hazırlanması:

0.5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 1/2500 PBS ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

e- Standart antijen dilüsyonlarının hazırlanması:

CDA2 (kitin antijeni) peptid 1ml blocking buffer içerisinde sulandırıldıktan sonra sekiz kez ½ kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

f- ELISA testinin uygulanması:

Antijen belirlenen yarışmalı sandwich ELISA yöntemi çalışılmıştır. 96 çukurlu polistren mikrotitrasyon plaklarının her biri PBS' de hazırlanan antikitosan poliklonal antikorla kaplanmıştır. Kaplama işlemi için, hazırlanan antikor fraksiyonlarından çukurcuk başına 100' er µl konulmuş, üzeri iyice kapatılarak bir gece +4°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası plak boşaltılmış ve % 0,05 Tween 20 içeren PBS ile 300 µl kuyucuklara koyularak yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Non-spesifik bağlanmayı önlemek için % 1 BSA içeren PBS eklenerek (Blocking buffer) ve üzeri kapatılmış iki saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Plaklar PBS-T ile üç kez yıkanmış ve sonra standart antijen dilüsyon serileri blocking buffer içinde hazırlanmıştır. Antikor kaplı kuyucukların üzerine 100 µl standart antijen dilüsyon serileri ve hasta serumları eklenerek, ve iki saat daha fazla oda ısısında inkübe edilmiştir. Plaklar hafifçe vurularak üç kez PBS ile yıkanmıştır. Kuyucukların üzerine 100 µl antikitosan poliklonal antikorun spesifik antikoru eklenerek ve oda ısısında iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası plak boşaltılmıştır. Daha sonra keçide üretilmiş HRP işaretli anti – tavşan Ig G antikor solüsyonundan kuyucuklara 100 µl eklenerek yeniden PBS-T yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Üzerine 100 µl subsrat solüsyonu eklenerek bir saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Reaksiyon, her çukura 100 µl 4N H₂SO₄ eklenerek durdurulmuştur.

g- Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması:

Sonuçların değerlendirilebilmesi için, deneyin başında boş bir çukura sadece konjugat, substrat ve sülfürik asit konulmuştur, yapılan körleme ile tüm çukurların absorbanısı 450 nm' lik filtre ile spektrofotometrede okutulmuştur.

3.3 İstatiksel analiz

Veriler SPSS 11.5 istatistik paket programına girilmiştir. Bağımlı gruplar arasındaki uyum Pearson korelasyon analizi testi ile yapılmıştır. $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Deney grupları

1- Grup I: Sağlıklı kontrol grubu (46 gönüllü kişi)

2- Grup II: Sistemik mikoz şüpheli hasta grubu (46 nütropenik hasta)

4.1. Kontrol grubunun sonuçları

Sağlıklı kontrol grubundan alınan kan örneklerinden yapılan kültürlerde hiçbir mantar üremesi olmamıştır. PZR uygulanan kan örneklerinde *Aspergillus* ve *Candida* DNA' sı saptanmamıştır. galaktomannan (serum) ve β -glukan (serum) düzeyleri negatif olarak hesaplanmıştır. Kitin ELISA' sında hafif bir aktivite tesbit edilmiştir (ortalama: 2.478).

4.2. Hasta grubunun sonuçları

4.2.1. Hasta grubunun kültür sonuçları

İMİ şüpheli 46 hastadan alınan kan örneklerinden 7'sinde (% 15,2) üreme olmuştur. Bu 7 hastanın birisinde *Candida guilliermondi* kolonisi, altısında *Candida albicans* kolonileri izole edilmiştir (Şekil 2).

4.2.2. Galaktomannan antijeni test sonuçları

Galaktomannan antijen testi 46 serum örneğinde çalışılabilmiş ve 8' inde pozitif bulunmuştur (% 17.4). Pozitifliğe, indeks değerinin 0,5' in üzerinde olması durumunda karar verilmiştir.



Şekil 3: *Candida albicans* kolonileri

4.2.3. Beta glukan test sonuçları

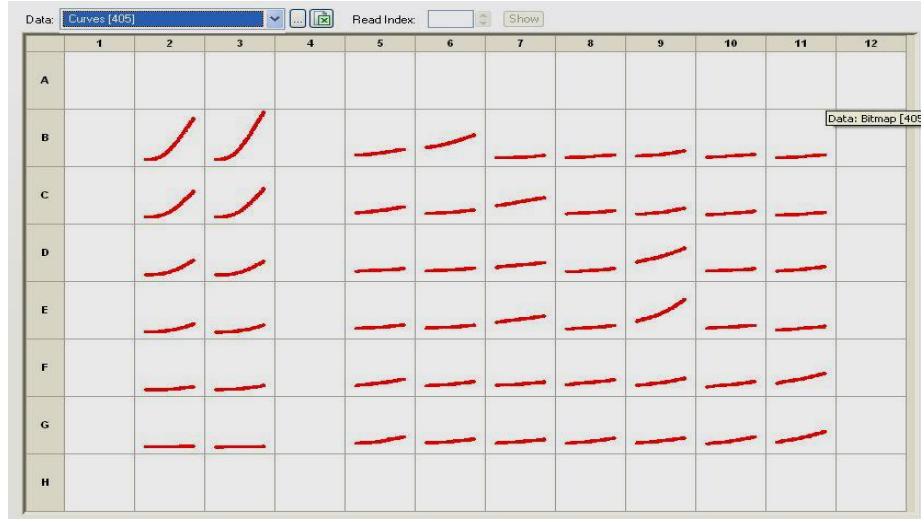
β -glukan aktivitesi 46 serum örneğinde araştırılmıştır. Serum örneklerinin beşinde pozitif sonuç elde edilmiştir (% 10.9). Hasta örneklerinin glukan konsantrasyonları şekil 3'de gösterilmiştir. β -glukana ait okuyucu ekranında görülen aktivite eğrisi şekil 4'de ve β glukana ait standart eğri (korelasyon katsayısı sonucu) şekil 5' de gösterilmiştir.

4.2.4. Gerçek Zamanlı PZR test sonuçları

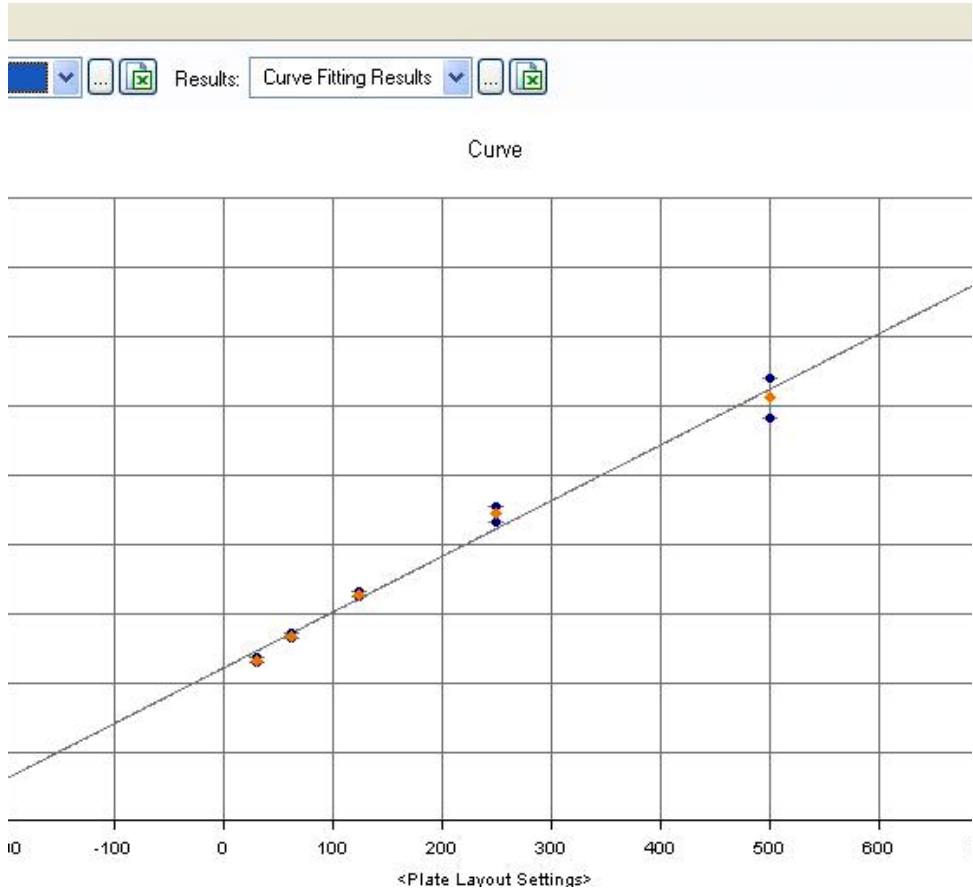
PZR ile tam kan örneklerinde *Aspergillus* ve *Candida* DNA' sını araştırılmıştır. 46 tam kan örneğinin bir tanesinde *Aspergillus* DNA' sını (% 2,2) pozitif bulunmuştur. 46 tam kan örneğinin altısında *Candida* DNA' sını pozitif bulunmuştur (% 13). Hasta grubuna ait gerçek zamanlı PZR amplifikasyon eğrileri şekil 6' da gösterilmiştir.

Name	Well	Conc:Dil	Mean V [405]	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
	B5		1,044	38,543	2	39,884	1,322	3,315
	C5		1,086	41,188				
	D5		0,512	5,630	2	10,406	4,878	46,857
	E5		0,889	15,282				
	F5		1,080	40,805	2	45,046	4,241	9,415
	G5		1,217	48,287				
	H5		2,283	115,474	2	66,296	49,178	74,179
	C6		0,899	17,118				
	D6		0,532	6,806	2	6,580	0,228	3,429
	E6		0,625	6,354				
	F6		0,759	20,883	2	19,306	1,577	8,167
	G6		0,708	17,729				
	H7		0,421	<0,000	2	<31,846	!31,846!	!100,000!
	C7		1,443	63,291				
	D7		0,776	21,900	2	30,659	8,758	28,587
	E7		1,058	39,417				
	F7		0,599	10,932	2	12,283	1,331	10,857
	G7		0,842	13,595				
	H8		0,478	3,307	2	6,249	2,942	47,078
	C8		0,571	9,191				
	D8		0,802	11,153	2	11,916	0,782	6,399
	E8		0,827	12,678				
	F8		0,838	25,774	2	29,252	3,477	11,887
	G8		0,860	32,729				
	H9		0,861	32,763	2	37,644	4,882	12,968
	C9		1,108	42,528				
	D9		2,433	124,770	2	188,378	41,608	25,008
	E9		3,774	207,986				
	F9		1,227	48,904	2	40,667	9,236	22,712
	G9		0,929	31,431				
	H10		0,537	7,103	2	8,901	1,798	20,202
	C10		0,595	10,899				
	D10		0,430	0,478	2	3,223	2,747	85,227
	E10		0,519	5,970				
	F10		0,937	31,908	2	41,648	9,741	23,388
	G10		1,251	51,389				
	H11		0,572	9,258	2	8,157	1,102	13,506
	C11		0,536	7,055				
	D11		0,828	25,144	2	20,828	4,216	20,145
	E11		0,892	16,712				
	F11		1,860	76,758	2	82,433	5,875	6,894
	G11		1,842	88,107				

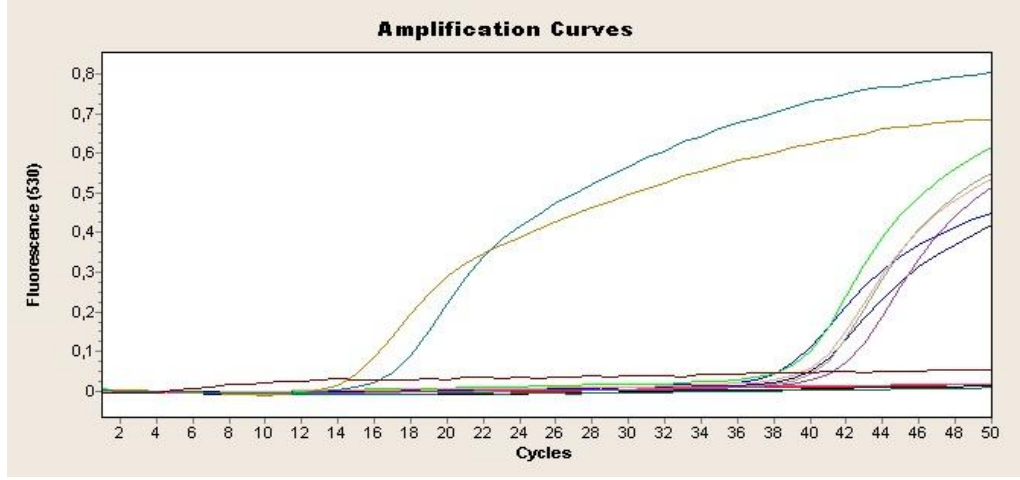
Şekil 4: Hasta örneklerinin glukon konsantrasyonları



Şekil 5: β glukana ait okuyucu ekranında görülen aktivite eğrisi



Şekil 6: β glukana ait standart eğri (korelasyon katsayısı sonucu)



Şekil 7: İnvaziv mikoz şüpheli hastaların amplifikasyon eğrileri.

4.2.5. Kitin antijeni ELISA test sonuçları

Konjugat ve sülfirik asit koyduğumuz negatif kontrol kuyucukların değeri nk: 0.721, Standart antijen dilüsyonlarının okutulan değeri pk: 3.283 olarak saptanmıştır.

Kitin antijen testi 46 serum örneğinde 1/1, 1/5 ve 1/10 dilüsyonlarında çalışılmış ve tüm örneklerde sonuç pozitif bulunmuştur (% 100). Hasta serumlarının sonuçları standart antijen dilüsyonlarının aktivite değeri ile yakındı (ortalama: 2.874).

Hasta gurubuna ait örneklerle ilgili çalışmamızda kullanılan tüm yöntemler sonuçları ve yüzdeleri ile birlikte tablo 5' de toplu olarak verilmiştir.

Kültür sonucunda *Candida* üreyen 7 hastanın üçünde (%43) *Candida* PZR sonuçları da pozitif bulunmuştur. Kültür sonuçları ile *Candida* PZR sonuçları

arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (p=0.01). Kültür sonucu negatif olan 39 hastanın üçünde *Candida* PZR sonucu pozitif saptanmıştır.

Tablo 6: Mikoza tanısı için çalışılan yöntemler ve hasta grubunun sonuçları (n: sayı)

	Kültür	Galaktomannan	Glukan	Candida PCR	Asper PCR	Kitin
negatif	n:39 % 84.8	n:38 % 82,6	n:41 % 89.1	n:40 % 87	n:45 % 97.8	n:0
pozitif	n:7 % 15.2	n:8 % 17.4	n:5 % 10.9	n:6 % 13	n:1 % 2.2	n:46

Çalışmaya alınan 46 hastanın 8' inde (% 17.4) galaktomannan ELISA sonucu pozitif bulunmuştur. Çalışmaya alınan 46 hastanın birinde *Aspergillus* PZR (% 2.2) sonucu pozitif bulunmuştur. *Aspergillus* PZR sonucu pozitif olan hastanın galaktomannan ELISA' sı da pozitif. Ancak galaktomannan ELISA' sı pozitif olan hastaların hepsinin *Aspergillus* PZR sonuçları pozitif değildi. *Aspergillus* PZR ile galaktomannan ELISA sonuçları arasında kısıtlı ancak anlamlı bir uyum gözlenmiştir (p=0.028).

β -glukan testi 46 hastanın 5' inde (% 10.9) pozitif bulunmuştur. *Candida* PZR testi ise hastaların 6' sında (% 13) pozitif bulunmuştur. β -glukan testi pozitif çıkan 5 hastanın ikisinde *Candida* PZR sonucu pozitif saptanmıştır ancak β -glukan ve *Candida* PZR sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (p=0.060).

β -glukan testi pozitif çıkan 5 hasta ile galaktomannan testi pozitif çıkan 8 hasta arasında sonuçlar açısından uyum gözlenmemiştir. Galaktomannan pozitif olan hastaların hiçbirinde β -glukan pozitif bulunmamıştır.

Çalışmaya alınan 46 hasta serumundan çalışılan tüm yöntemler ve bu yöntemlerin birbirleri ile korelasyonu tablo 6’ da verilmiştir.

Tablo 7: Mikoza tanısı için kullanılan yöntemler ve bunların birbirleri ile korelasyonları (p değerleri)

	Kültür	Aspergillus	Candida	Beta glukan	Galaktomannan
Kültür	-	0.677	0.010	0.326	0.195
Aspergillus	0.677	-	0.703	0.731	0.028
Candida	0.010	0.703	-	0.060	0.237
Beta glukan	0.326	0.731	0.060	-	0.287
Galaktomannan	0.195	0.028	0.237	0.287	-

5. TARTIŞMA

Sistemik mantar infeksiyonları kemik iliği ve organ transplantasyonu hastaları, immün yetmezlikli bireyler, cerrahi olarak tedavi edilenler, travma geçirenler, yanık hastaları ve yenidoğan YBÜ' lerindeki bebeklerde sık görülen komplikasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (88). Sistemik mantar infeksiyonlarının tanısı hala zor ve sorunludur. Bu infeksiyonlarda görülen klinik bulgular etkene özgü olmadığından tanıya katkıları sınırlı olmakta, histopatolojik ve radyolojik bulgular tanıya ilişkin önemli ipuçları sağlayabilmekte ancak kesin tanı ise mikrobiyolojik yöntemlerle konmaktadır. Fakat konvansiyonel yöntemler yeterli duyarlılığa sahip değildir. Altın standart olarak kabul edilen histopatolojik inceleme ve derin dokulardan alınan kültür yöntemlerinin uygulanması çoğunlukla bu hastaların genel durumlarındaki bozukluklardan veya trombositopeniden dolayı mümkün olamamaktadır. Kan örneklerinin kültür sonuçları nadiren pozitif çıktığı için hastaların kanlarından mantar saptamada yüksek duyarlıklılı yöntemler gerekli hale gelmiştir. Konvansiyonel yöntemlerin temelini oluşturan kültür, kesin tanı için altın standart olmakla beraber bazen zor ve zaman alıcı olmaktadır. Kültürün en önemli avantajları, cins ve tür düzeyinde tanımlama ve olası direnç tahmini şansı tanınması ve o infeksiyonda etken suş için antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlamasıdır.

Kültürün ve direk mikroskopik incelemenin bu infeksiyonların tanısındaki duyarlılığı, her zaman istenilen düzeyde olmayabilmektedir. Hem direk mikroskopik inceleme, hem de kültür için klinik örneğin seçilmesi, tanıdaki

başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bununla ilgili en tipik örnek, İPA' lı olgularda tanı için en başarılı örneğin balgam değil, doku örneği olmasıdır. Ancak bu olgularda uygun ve steril örneklerin alınması, çeşitli nedenlerden ötürü her zaman mümkün olmamakta, örnekteki mantar miktarının azlığı, bilgi ve deneyim eksikliği gibi faktörler de konvansiyonel yöntemlerin tanıdaki duyarlılığını düşürebilmektedir (41).

Kültür dışı tanı yöntemlerinde, özellikle son dekat boyunca dolaşımdaki fungal antijenlerin, metabolitlerin veya mantar DNA' sının tespitine dayanan testlerin geliştirilmesinde önemli gelişmeler olmuştur. Son yıllarda, İMİ' lerin tanısına yönelik girişimler galaktomannan, β -glukan ve DNA gibi mantar bileşenlerinin tespiti yoluyla erken, güvenilir markırlara dayanan kültür dışı tanı yöntemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Her ne kadar kültür dışı serolojik ve moleküler yöntemlerde duyarlılık ve özgüllük problemleri olabilmekte ise de, pozitif çıkması için fazla miktarda örnek gerektiren, enfeksiyon süresince geç döneme kadar pozitif sonuç vermeyebilen ve nadiren pozitif çıkan kültür gibi konvansiyonel yöntemlere göre mantar enfeksiyonlarının erken tanınması ve komplikasyonlar ortaya çıkmadan önce erken dönemde tedaviye başlanmasına olanak sağlamasından dolayı önem kazanmaktadırlar. Bahsi geçen kültür dışı yöntemlerin her biri enfeksiyonların farklı zaman noktalarında pozitifleştiği ve bu yöntemlerin hiçbirisi İMİ' li hastaların kesin tanısı için tek başına yeterince hassas olmadığından, bu testlerin performanslarını artırma girişi olarak bunların kombinasyonunun kullanılması etkileyici görünmektedir (69).

EORTC / MSG 2008 yılında İMİ tanısıyla ilgili olarak kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı şeklindeki tanımlamalarını yenilemişlerdir (89). Tanı teknolojilerindeki gelişmeler bu yeni dökümanın yayınlanmasına sebep olmuştur. Yeni tanımlamalarda da İMİ tanısı için kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı sınıflamalarına sadık kalınmıştır. Kesin İMİ tanımı steril materyalden direk mikroskopik yöntemler, steril materyalin kültürü veya kan kültürü pozitifliğine dayandırılmıştır. Bu revizyonda yüksek olasılıklı İMİ tanımı için galaktomannanla beraber kültür dışı metodlardan β -glukan testi de ilk defa dahil edilmiştir (89). Çünkü bu test *Aspergillus* dışındaki diğer mantar türlerini tespit edebilmektedir ve bu yöntemle ilgili bir ticari test (Fungitell™ (CAPE COD, ABD) FDA tarafından onaylanmıştır. Ancak yenilenen EORTC tanımlamalarına PZR gibi klinik örneklerden mantar taranmasında kullanılan moleküler yöntemler dahil edilmemiştir. Bunun nedeni olarak da henüz yeterli standarda sahip olmaması ve bu tekniklerin hiçbirinin klinik olarak onaylanmamış olması gösterilmiştir (89).

Kolay ve tekrarlı numune alınmasına olanak vermesi nedeniyle farklı testlerin kombinasyonlarının çalışılması açısından mantıksal olarak en iyi yöntem serum numunelerinin taranmasıdır. Biz de çalışmamızda bu sebeple serum örneklerinden çalışmayı uygun bulduk.

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da

bulunmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi kitosandır. Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyo uyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok endüstri dalı için uygun bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır (86).

Kitin ölçümü ile ilgili yöntem ilk olarak 1975 yılında Lehman ve ark. tarafından geliştirilmiştir (12). Mantarlarda hücre duvarının yapısal elemanlarından biri olan kitin, infeksiyon sırasında dokuda dağılmaktadır (90). Kitinin dokuda ölçülmesi ise yeni bir yöntem olmamakla birlikte diğer polisakkaritler gibi mantar infeksiyonu tanısında kullanılmamaktadır. Bu güne kadar yapılmış olan çalışmalarda, kitin düzeyi daha çok hayvan modellerinde infeksiyonun şiddetinin gösterilmesinde ve antifungal tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmıştır (11,91).

Çalışmamızda çoğunun immün yetmezlikli olduğu sistemik mikoz şüpheli hastalarda İMİ tanısı için oldukça invaziv bir yöntem olan doku biyopsisi ile kitin ölçümü yerine, daha önce denenmemiş olması, tekrarlanabilir olması ve daha az invaziv olması sebebi ile serumda kitin varlığını ELISA yöntemi ile araştırmayı planladık. Bu sayede aynı serumdan eşzamanlı olarak çalıştığımız diğer yöntemlerin sonuçları ile uyumunu araştırmayı da amaçladık..

Hif içerisinde bulunan fakat konidya içerisinde bulunmayan kitin, dokuda bulunan bağıl hif kütlesinin göstergesidir. Çeşitli gruplar, fungal yük göstergesi olarak dokuda kitin ölçümü yöntemi kullanmışlardır (91,92). Kitin aktivitesi dokunun 130°C’de KOH içinde bekletilmesi ile ortaya çıkan kitosanın, HNO₂ ile aldehit oluşturması ve oluşan aldehitin Fe⁺³ bileşiği ile reaksiyonunun, spektrofotometrede okunduktan sonra glukozamine oranlanması ile hesaplanmıştır (12). Yararlı olmasına rağmen, bu yöntemin birkaç çekincesi bulunmaktadır. Protokol basamaklarının sayısı ve kitosani ekstre etmek için gereken sert kimyasallardan dolayı sıkıntı yaşanmaktadır (93). Ayrıca, canlı olmayan hifin tespit edilen kitin miktarına katkı yapması olasılığı nedeniyle, kitin tahlilinin canlılığı belirtmeyeceği ileri sürülmüştür (93). Kuştimur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada deneysel olarak aspergilloz ve kandidoz oluşturulan hayvan modellerinde dokudan kitin varlığı spektrofotometrik yöntemle sayısal olarak gösterilmiştir (94).

Çalışmamızda kitin antijen testi 46 serum örneğinde 1/1, 1/5 ve 1/10 dilüsyonlarında ayrı ayrı çalışılmış ve tüm örneklerde sonuç pozitif çıkmıştır (% 100). Standart antijen dilüsyonlarının okutulan değeri pk: 3.283 olarak saptanmıştır. Hasta serumlarının sonuçları standart antijen dilüsyonlarının aktivite değeri ile yakın bulunmuştur (ortalama: 2.874). Kontrol grubunun kitin ELISA’ında hafif bir aktivite saptanmıştır (ortalama: 2.478).

Bilgilerimize göre ELISA yöntemi ile serumda kitin aranması daha önce denenmemiştir. Kitinin karmaşık peptid yapısından dolayı ELISA yöntemi için

gerekli olan monoklonal antikor elde edilememiştir. Çalışmamızda kitosana karşı elde edilmiş poliklonal antikorlarla ELISA plağı kaplanmıştır. Bundan dolayı non-spesifik bağlanmalar meydana gelmiş olabilir. Bunun çalışmamızda tüm örneklerde sonucun pozitif çıkmasına sebep olduğu düşünülmüştür. Bağlanmayı engellemek için inkübasyon sürelerinin kısaltılması, hasta serumlarının dilüe edilmesi ve plağın yıkanması sırasında yıkama solüsyonuna BSA ekleyerek yalancı pozitifliğe neden olabilecek maddelerin uzaklaştırılması gibi birçok işlem uygulanmasına rağmen tüm hasta sonuçları pozitif çıkmıştır. Bu yöntemde kitinin eşik (cut-off) değeri belirlenemediği için hastalarla hasta olmayanlar arasında uyum yoktur. İMİ erken tanısında kitin ELISA yönteminin tanıda kullanılması konusunda uzak bir noktada olduğumuzu düşünmekteyiz. Serumda kitin ELISA yöntemi geliştirilmesi için non-spesifik bağlanmayı engelleyen ek protokollerin uygulanması gibi zaman alıcı optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

ELISA plağı tarafımızdan hazırlanmıştır. Antikor poliklonal olduğu için beklenenin üzerinde bağlanma sağlanmıştır. Kontrol grubundaki sonuçların da pozitif yakın çıkmasının sebebi olarak antikorun istenenden daha çok plağa bağlanması olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca poliklonal antikorlar kullanılırken çapraz reaksiyon oluşma durumları da göz önünde bulundurulmalıdır. Yeni bir alanda çalışma yapılırken monoklonal antikorlarla çalışmanın yapılması tercih edilmelidir.

Walker ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada *P. jirovecii*' de immüno histokimyasal kitin tespitine yönelik olarak *P. jirovecii*' yi boyamak için, kitin ve

kitin oligomerlerine karşı poliklonal antiserumlar kullanmışlardır. Tüm olgularda antiserumlar *P. jirovecii*' ye bağlanmış fakat konakçı doku bileşenlerine bağlanmamıştır. Antiserumlar kist ve aynı zamanda intrakistik cisimlere ve trofik formlarada bağlanmıştır. Pürifiye kitinle muamele edilmiş anti-kitin antiserumu kullanıldığında *P. Jirovecii*'de boyanma gözlenmemiştir. Buna dayanarak, *P. jirovecii*' nin infekte insanlarda yaşam döngüsünün birden fazla evresinde kitin ürettiği sonucuna varmışlardır (95).

Pneumocystis jirovecii gittikçe artan sıklıkta fırsatçı bir patojen haline gelmiştir. Günümüzde, AIDS' li hastaların tahminen % 60 ile 80' i hastalığın seyri boyunca *P. Jirovecii* pnömonisi geçirmektedirler (96). Çalışmamıza alınan hastaların *P. jirovecii* ile infekte olup olmadıklarını bilinmemektedir Ancak, immün yetmezlikli hastaların yaklaşık % 80' inde hastalığın seyri boyunca *P. jirovecii* pnömonisi geçirildiği bilindiğinden bizim hastalarımızın da yüksek oranda kitin ürettiği bilinen *P. jirovecii* infeksiyonu geçirdikleri düşünülebilir. Bu durum bizim hasta grubumuzdaki kitin ELISA' sındaki yüksek pozitifliği açıklayacak bir faktör olabilir.

Kültür sonucunda *Candida* üreyen 7 hastanın üçünde *Candida* PZR sonuçları da pozitif bulunmuştur. Kültür sonuçları ile *Candida* PZR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (p=0.01). Kültür sonucu negatif olan 39 hastanın üçünde *Candida* PZR sonucu pozitif saptanmıştır. Bizim çalışmamızda antifungal tedavinin kullanılıp kullanılmadığı

bilinmemekteydi. Bu nedenle antifungal kullanımına bağı olarak kültür pozitif olan hastaların oranının etkilendiğı düşünölmüştür.

Kandidoz tanısı için PZR yönteminin incelendiğı bir çalışmada kan kültürü pozitifliğı saptanan örneklerin % 58' inde *Candida* PZR sonucu pozitif bulunurken kan kültürü negatif olan 460 örneğın 28' inde pozitif PZR sonucu elde edilmiştir (97). Bizim sonuçlarımızla benzerlik gösteren bu çalışmada kandidoz tanısı için PZR yönteminin kültüre göre hızlı sonuç verdiğı ve komplikasyonların önlenmesini sağlayacak antifungal tedavinin gecikmeden başlanabilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (97).

Başka bir çalışmada farelere intravenöz yolla *C. albicans* inokülasyonunu takiben 72 saat sonra kan örneğinden bakılan *Candida* PZR sonuçlarının kültüre göre çok daha duyarlı bulunduğı bildirilmiştir (% 100' e karşılık % 67) (98).

Yaptığımız çalışmada β -glukan testi 46 hastanın 5' inde (% 10.9) pozitif bulunmuştur. *Candida* PZR testi ise hastaların 6' sında (% 13) pozitif bulunmuştur. β -glukan testi pozitif çıkan 5 hastanın ikisinde *Candida* PZR sonucu pozitif saptanmasına rağmen, β -glukan ve *Candida* PZR sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (p=0.060).

Sakai ve arkadaşlarının PZR ve β -glukan testi ile inceledikleri 24 hastanın sonuçlarında PZR pozitifliğini %75, β -glukan pozitifliğini ise % 54 oranında bulmuşlardır. Çalışmalarında PZR ve β -glukan sonuçlarının anlamlı bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (99). Bizim çalışmamızda PZR ve β -

glukan testlerinin pozitiflik oranlarının düşük olması ve bu iki test arasında korelasyon bulamayışımız hasta popülasyonlarının farklı klinik özellikler içermesine bağlı olabilir. Çünkü Sakai ve arkadaşları endotrakeal entübasyon yapılmış, intravenöz yolla beslenen ve uzun süredir yoğun bakımda tedavi gören mantar infeksiyonu açısından daha yüksek riske sahip ağır klinik özelliklere sahip hastaları çalışmalarına dahil etmişlerdir.

Aynı çalışmada PZR yöntemi, β -glukan yöntemine göre daha duyarlı ancak iki yöntem birbiri ile korele bulunmuştur (99). Her ne kadar İMİ tanısında serum β -glukan tespiti faydalı olsa da bu çalışmada 5 örnekte PZR pozitifken β -glukan seviyesinin negatif olması bu testin yalancı negatif sonuç verebileceğini ortaya koymuştur (99). Bizim çalışmamızda da PZR pozitif 6 olgunun sadece 2'sinde β -glukan pozitif çıkmıştır.

Yapılan bir çalışmada kemik iliği ve organ transplantasyonu yapılan hastalardan çalışılan 197 serum örneğinden β -glukan ve *Candida* PZR çalışılmış ve sonuçlar %56 oranında uygunluk göstermiştir (100). Kültür dışı farklı yöntemlerin İMİ tanısı için birlikte kullanılması gerektiği ve hiçbir testin tek başına yeterli olmadığı vurgulanmıştır (100).

PZR erken tanı ve antifungal tedaviye karar açısından kullanışlı ve faydalıdır. PZR yöntemi az miktarda kana ihtiyaç duyması ve sonuçların çabuk elde edilmesinden dolayı özellikle yeni doğanlarda faydalı bir tanı yöntemi olarak kullanılabilir. Ancak PZR daha pahalı olması nedeniyle ve genel kullanımda

standardize edilmiş bir yöntem olmadığı için İMİ' lerin tanısı için kullanımı ümit kırıcı ve sınırlıdır (101).

Çalışmamıza alınan 46 hastanın 8' inde (% 17.4) galaktomannan ELISA sonucu, birinde ise *Aspergillus* PZR (% 2.2) sonucu pozitif bulunmuştur. *Aspergillus* PZR sonucu pozitif olan hastanın galaktomannan ELISA' sı da pozitif olarak saptanmıştır. Ancak galaktomannan ELISA' sı pozitif olan hastaların hepsinin *Aspergillus* PZR sonuçları pozitif bulunmamıştır. Çalışmamızda *Aspergillus* PZR ile galaktomannan ELISA sonuçları arasında kısıtlı ancak anlamlı bir uyum gözlenmiştir (p=0.028).

Son yıllarda, ELISA testiyle serum galaktomannan seviyelerinin izlenmesi, rutin uygulamada standardizasyon ve uygulanabilirlik nedeniyle İA erken tanısı için yaygın kullanılabilir hale gelmiştir (102).

EORTC / MSG 2008 yılında İMİ tanısıyla ilgili yaptığı tanımlamalarda FDA tarafından onaylanmış olan galaktomannan testinin kullanımını kriterler arasına almışken belli bir standardizasyonu olmadığı gerekçesiyle PZR yöntemini tanımlamalarında kullanmamıştır. Bizim çalışmamızda da galaktomannan testi ile pozitiflik saptadığımız hastaların sadece birinde *Aspergillus* PZR sonucunun pozitif çıkması PZR yönteminin standardizasyonla ilgili eksiklikleri olduğunu desteklemektedir.

White ve arkadaşlarının sistemik mantar infeksiyonları ile ilgili yaptıkları çalışmada aspergilloz olduğu bilinen yedi hastanın dördünde pozitif PZR, ikisinde

pozitif galaktomannan sonucu elde edilmiş, ancak PZR pozitif saptananların hiçbirinde galaktomannan pozitif bulunmamıştır (103). Bizim çalışmamızda ise tek bir hastada *Aspergillus* PZR sonucu elde edilmiştir. Ancak o hastanın galaktomannan testi de pozitif olduğu için her iki test arasında kısıtlı bir uyum gözlemlenmiştir.

Genel olarak serumda galaktomannan saptanması, küf mantarlarına karşı aktif antifungal profilaksiye maruz kalmamış olan hematolojik maligniteli nötropenik hastalarda çok yararlıdır (65,104).

İA, kök hücre nakli hastalarının yaklaşık % 10' unda ve solid organ nakli hastalarının % 5' inde meydana gelir. Tanısı sıklıkla zordur ve ateş ile göğüs BT analizinde anormal bulgulara dayanarak antifungal tedavi genellikle ampirik olarak başlatılır (105). Tipik olarak, histopatoloji veya kültür yoluyla tanı kanıtlanamaz. Eğer tedavi İA' yı hedefliyorsa ve hastada zigomikoz veya bir başka küf mantarı infeksiyonu bulunuyorsa, etkili olmayabilir. Bu nedenle, İA' nın doğru tanısına yardımcı olacak testlerin kullanılması sonucu iyi yönde değiştirebilir (106). Üstelik, İA' nın olmadığını belirten bir test, hekimin tedaviyi düzenlemesi veya ek tanısal işlemlere başvurması konusunda uyarıcı işaret olabilir. *Aspergillus* hücre duvarındaki galaktomannanı tespit eden bir enzim immün testi bu görevlerde yardımcı olabilir. Bu test, birincil olarak, İA için erken markır olan galaktomannan antijenemisi gelişimi açısından immün baskılanmış hastaların izleminde, ayrıca İA şüpheli olgularının tanısı için de

kullanılabilmektedir. İPA tanısı açısından duyarlılık, BAL örnekleri test edilerek arttırılabilir (101).

İA tanısında galaktomannan tahlilinin rolünü değerlendiren çalışmalar, baskın olarak lösemi için kemoterapi almakta olan belirgin nütropenik hastalar veya flukonazol profilaksisi alan HSCT alıcıları ile gerçekleştirilmiştir (65). Bu çalışmalar, % 67-100 arasında hassasiyet oranları ve % 86-99 arasında özgüllük oranlarını belgelemiştir. Ayrıca, hayvan modelleri ve insanlardaki çalışmalar, galaktomannan değerlerinin *Aspergillus* fungal yükü ile korele olduğunu ve İA seyri açısından prognostik marker olarak işlev görebileceğini göstermiştir (64). Bir başka çalışmada, belirli aralıklarla çalışıldığında, galaktomannan yöntemi İA tanısında ortalama 6-14 gün süreyle diğer yöntemlere göre daha önde ve üstün bulunmuştur (107).

Galaktomannan testi hematolojik maligniteleri bulunan hastaların takibinde büyük bir ilerleme sağlamıştır. Bununla birlikte, her bir merkez bu testin kullanılabilirliğini kendi koşullarında değerlendirmelidir. Hastaların *Aspergillus* türlerine maruziyetinin artması, piperasilin-tazobaktamın kullanımı, anti-*Aspergillus* antikorlarının görülmesi erken tanı için bu önemli serolojik markerin verimini belirgin şekilde etkileyebilir (102).

İA dışındaki fungal infeksiyonlar pozitif galaktomannan sonuçları verebilir. *Histoplazma*, *Penicillium*, *Cryptococcus*, ve *Blastomyces*, yalancı pozitif sonuçlara sebep olduğu bildirilmiş olan mantarlar arasındadır (108-110). Hastaların % 57' si takip süresince en az bir ishal atağı yaşadığı için,

gastrointestinal mukozanın bütünlüğünün bozulmasının da yalancı pozitifliğe yol açtığı bildirilmiştir (111). *Aspergillus*'un hastane ve laboratuvar ortamında sık görülmesi, örneklerin alınması, işlenmesi veya taşınması sırasında kontaminasyona dolayısıyla yalancı pozitifliğe sebep olabilir (101). Ayrıca Plasmalyte® elektrolit çözeltisinin intravenöz uygulamasının da yalancı pozitif antijenemiye sebep olduğu bildirilmiştir (112,113).

Bazı araştırmacılar nötropenik olmayan hastalarda düşük duyarlılığı nedeniyle dolaşımda galaktomannan tespitinin değerinin sınırlı olduğunu ve bu hastalarda, İPA tanısı için BAL sıvısı yerine serumda çalışılmasının daha uygun olabileceğini bildirmişlerdir (114).

Becker ve arkadaşları İA olgularının % 47' sinde seruma kıyasla BAL' da % 100' lük galaktomannan pozitif sonuçlar bildirmişlerdir (115).

YBÜ hastalarında yapılan bir çalışmada, *Aspergillus* açısından olguların % 60' ında kültür veya direkt inceleme pozitif, % 42' sinde serum galaktomannan antijeni pozitif, hastaların % 88' inde BAL' da galaktomannan antijeni pozitif olarak saptanmıştır. BAL' daki antijen tespiti açısından özgüllük (% 87), kültür ve direkt inceleme özgüllüğünden (% 70) daha yüksek bulunmuştur (114).

Sistemik mikoz şüpheli hastalarda yapılan bir çalışmada kan kültürü ile kanıtlanmış İA' lı olguların tamamına yakınında BAL galaktomannan sonuçları pozitif bulunurken % 44 'ünde serum galaktomannan değeri pozitif ve % 58' inde BAL kültür sonuçları pozitif bulunmuştur (114). BAL' daki galaktomannan

saptanmasının duyarlılığı % 88 ve özgülüğü % 87 olarak belirlenmiştir. Genel olarak İA tanısını koymada BAL sıvısı ile yapılan galaktomannan testi, serum ile yapılan galaktomannan testi ve BAL kültürüne göre daha anlamlı sonuç vermiştir (114). Bu çalışmada aynı zamanda nötropenik ve nötropenik olmayan iki grup hastada serum ve BAL galaktomannan testleri çalışılmış ve BAL galaktomannan sonuçları her iki grupta eşit bulunurken serum, galaktomannan seviyeleri nötropenili hastalarda anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar nütrofillerin mannoz bağlayıcı reseptörleri yoluyla kandan galaktomannanı temizleyebildiği hipotezinden yola çıkarak İA riski bulunan çoğu YBÜ hastasının nötropenik olmadığını ve *Aspergillus* konidyasının primer giriş yerinin akciğer olduğunu düşünmüşler ve bu hastalarda serum örneği yerine BAL örneği ile galaktomannan çalışmanın daha uygun olacağı kararına varmışlardır (114,116).

Aspergillus Platelia® kitiyle serum galaktomannan ölçümlerinin bildirilen duyarlılık ve özgüllük değerleri literatürde çok fazla değişmektedir. Bunun en büyük sebebi çalışmalar arasındaki heterojenliktir (117). Testin uygulanmasındaki bu farklılıklar hasta popülasyonlarının ve kullanılan numunelerin farklılığına, numunenin taşınması veya işlenmesi sırasında kontrol edilemeyen değişkenlere ve farklı hastalık tanımları ile eşik (cut-off) değerlerine bağlı olabilir. Ayrıca düzenli olarak haftada iki kez örneğin alınmadığı hastalarda pozitif değerler kaybedilebilmektedir (118). Bir başka faktör, şüpheli İA olgusu düşünülen veya akciğerde kaviter lezyonlar bulunan durumlarda ampirik antifungal ilaç kullanımının molekülün kanda serbestleşmesinin azalmasına yol açarak yalancı

negatif sonuçlara neden olabilmesidir (119). Ayrıca anti- *Aspergillus* antikorları olan hastalarda yalancı negatiflik görülmektedir.

Bizim çalışmamızda da tek örnekle çalışıldığı ve hastaların antifungal aldıkları düşünüldüğünde galaktomannan sonuçlarında pozitif değerleri atlanarak yalancı negatiflik gelişmiş olabilir.

İMİ şüpheli hastalarda yapılan bir çalışmada serum galaktomannan antijenemi testi, serum β -glukan testi ile karşılaştırıldığı zaman duyarlılık % 100'e karşı % 55 olarak bildirilmiştir (120). Yapılan başka çalışmada ise bu iki yöntem için benzer duyarlılık bildirilmiştir (121). Bununla birlikte, β -glukan testi İA için spesifik değildir. İA riski bulunan hastalarda kandidoz sıktır ve β -glukan testi iki mikoz arasında ayırım yapmaz. β -glukan testi, bakteriyemi, hemoliz, plazma proteinlerinin veya koagülasyon faktörlerinin intravenöz uygulanması, belirli ilaçlarla tedavi, selüloz membranlar kullanarak hemodiyaliz yapılması, pamuklu bandajlara maruziyet durumlarında yalancı pozitif sonuç verebilir (122,123). Bazı antibiyotiklerin (kolistin, sefazolin, trimetoprim - sulfametoksazol, sefotaksim, sefepim ve ampisilin-sulbaktam) yüksek konsantrasyonda kullanımı β -glukan testinde pozitif sonuçlara sebep olabilir (124). Bu gibi nedenlerle, İA tanısı için galaktomannan antijenemi testi tercih edilmektedir (101).

Kami ve arkadaşları hematolojik maligniteli 215 hastada İA tanısı için β -glukan ile galaktomannan yöntemini karşılaştırmışlardır. Galaktomannan testinde % 44 duyarlılık ve % 94 özgüllük, β -glukan testinde ise % 63 duyarlılık ve % 76 özgüllük bulmuşlardır (125).

Kawazu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hematolojik maligniteleri bulunan 96 hastanın İA tanısı ve taraması için, β -glukan yöntemi ile galaktomannan ELISA yöntemini karşılaştırmışlardır. Dokuzu kanıtlanmış, ikisi olası olmak üzere İA tanısı koydukları 11 hastada iki ardışık pozitif galaktomannan testinin iki ardışık β -glukan testinden daha iyi tanısallık performans gösterdiğini bildirmişlerdir (120).

Yapılan bir diğer çalışmada İA seyrinde, β -glukan testinin galaktomannan antijen testine kıyasla daha sonra pozitifleştiği bildirilmiştir (120). Bununla birlikte yakın tarihli bir çalışmada hematolojik maligniteli yüksek riskli nötroopenik hastalarda, serum galaktomannan ve β -glukan testlerinin birlikte kullanılmasının, her bir testin duyarlılık ve özgüllüğünü belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir (121). β -glukan yöntemini, galaktomannan yöntemine göre daha geniş spektrumdaki küf mantarlarını saptadığı için, İMİ açısından yüksek riskli hastalarda, koruyucu tedavi stratejisine katılma potansiyeli bulunmaktadır.

Çalışmamızda ise β -glukan ve galaktomannan sonuçları arasında anlamlı bir uyum bulunamamıştır. β -glukan pozitif olan hiçbir hastanın galaktomannan değeri pozitif saptanamamıştır. Bu durum bizim diğer çalışmalardaki kadar fazla sayıda hasta ile çalışmamızdan kaynaklanmış olabilir.

Yakın zamandaki bir çalışma, kanser hastalarında İK, İA ve diğer küf mantar infeksiyonlarının tanısında galaktomannan ve β -glukan yöntemlerinin kullanımını karşılaştırmıştır. Yazarlar, galaktomannanın İA tanısı için daha özgül, β -glukanın ise İMİ tanısı için daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (126).

Son zamandaki bir çalışma da, β -glukan yönteminin çok yüksek negatif prediktif değere sahip olduğunu (% 97.8) ve yüksek riskli hastalarda İA dahil İMİ' leri ekarte etmek için en kullanışlı yöntem olabileceğini bildirilmiştir (122).

β -glukan, İA dahil İMİ tanı ve tedavisinde yararlı bir yardımcı yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bunun optimal kullanımı, konakçının risk faktörlerinin, hastanın başvuruındaki durumunun ve İA dahil çeşitli mantar infeksiyonlarının radyolojik değerlerinin tümünün birlikte değerlendirilmesini gerektirir. İMİ için birkaç çalışmada, infeksiyon klinik olarak bariz hale gelmeden önce ve uygun antifungal tedavi başlanmadan önce β -glukanın yükseldiği görülmektedir (67). β -glukan testi özellikle yüksek negatif prediktif değeri sayesinde çoğu vakada İMİ' nin ekarte edilmesinde yararlı olabilir. β -glukan ve galaktomannan testlerinin birlikte kullanılmasının ise İA tanısında bunların tek başlarına kullanımlarından üstün olabileceği ileri sürülmüştür (121).

Çalışmamızda sistemik mikoz şüpheli hastalardan β -glukan yöntemi ile sonuçları negatif çıkan hastaların bir kısmında diğer yöntemlerin sonuçları pozitif bulunmuştur. Dolayısı ile bizim çalışmamızın sonuçlarına göre β -glukan yönteminin negatif prediktif değerinin yüksek olduğunu söylememiz mümkün değildir. Negatif β -glukan sonuçlarının yüksek riskli hastalarda İA dahil İMİ' leri her zaman ekarte ettiremeyebileceği düşünülmüştür.

Aspergillus tespiti için ilk PZR 1990' ların başında bildirilmesine rağmen bu teknik halen deneysel olarak kabul edilmektedir. *Aspergillus* PZR' nin ümit verici yararları olduğu ve galaktomannan antijen tespiti gibi diğer biyolojik

testlerin özelliklerini tamamlayabildiği görülmektedir. *Aspergillus* DNA' sı, sıklıkla İMİ' nin klinik belirti ve semptomlarının bulunmadığı çok erken dönemlerde tespit edilebilir (127). Ayrıca, antifungal ilaçlara maruziyet, galaktomannan yönteminin aksine, bu testin duyarlılığını artırabilir (128). Ticari bir format halen eksik olmasına rağmen, birçok araştırmacının katıldığı uluslararası bir girişim, klinik olarak kullanıma olanak sağlayan, *Aspergillus* PZR için bir standart tasarlamayı amaçlamaktadır (129). PZR için böyle bir standart, PZR' nin mikolojik kanıt göstergesi olarak kabul edilebilmesi amacıyla, EORTC / MSG tanımlarının bir sonraki düzenlemelerinden önce hazır olmalıdır.(130).

İA' nın tanısında, kanda *Aspergillus* DNA'sının saptanması için PZR' nin uygunluğunu gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Duyarlılık % 36' dan % 98' e ve özgüllük % 72' den % 100' e kadar değişmektedir (122,131). Bununla birlikte, kıyaslandığı zaman, PZR galaktomannan antijenemi testinden daha duyarlı değildir. Yapılan bir çalışmada PZR (% 45), antijen saptanmasından (% 93) daha az duyarlı bulunmuştur (120).

Challier ve arkadaşları, 41 immün yetmezlikli hastadan alınan 207 serum numunesi ile PZR ve galaktomannan testi çalışmışlardır. Kanıtlanmış veya olası İA bulunan hastalarda iki yöntemden en az birisi ile pozitif sonuçlar elde edilmiştir. PZR sonuçları açısından yetişkinler ile çocuklar arasında hiçbir farklılık bulunmamakla birlikte, olası İA olguları bulunan birçok çocukta yalancı pozitif galaktomannan sonuçları bildirmişlerdir (132).

İmmatür veya hasar görmüş intestinal epitelle galaktomannan içeren besin alımı ve yeni doğanlarda kullanılan bebek mamalarının yalancı galaktomannan pozitifliklerinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (133). Bu nedenle araştırmacılar PZR yönteminin daha özgül olduğunu ve iki yöntemin aynı zamanda çalışılmasının İA tanısını güçlendirdiğini savunulmuştur (134).

Çalışmamızda da galaktomannan, PZR den daha duyarlı bulunmuştur, 8 galaktomannan pozitif hastanın sadece bir tanesinde PZR pozitif bulunmuştur. Biz de bunu diğer çalışmalarda bahsedildiği gibi *Aspergillus* DNA' sını yakalamak için optimize edilmiş bir amplifikasyon yönteminin olmamasına bağladık. Galaktomannan ELISA yöntemi daha ucuz ve daha kısa sürede sonuç verdiği için asıl olarak, İA için erken belirteç olarak immün baskılanmış hastaların izleminde kullanılır. Bu test, İA şüpheli olgularının tanısı için de kullanılmaktadır.

Hayvanlarda deneysel olarak akciğer aspergillozu oluşturulan bir çalışmada tüm hayvanların akciğer doku kültürlerinde *A. fumigatus* kolonileri izole edilmiş, ancak aynı hayvanlarda kandan PZR ile araştırılan *Aspergillus* DNA' sı örneklerin %58 inde pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada yazarlar kan dışında solunum yollarından bir örnek seçilmiş olması halinde PZR için pozitiflik oranının daha yüksek bulunabileceğini ileri sürmüşlerdir (131).

Çalışmamızda hastalarımızın bir kısmının lokal aspergilloz olduğunu varsayarak serum örneği yerine BAL örneği kullanmış olsaydık *Aspergillus* PZR sonucundaki pozitiflik oranını daha yüksek bulabilirdik. Biz birçok parametreyi birden çalıştığımız için örnekten ziyade yöntemleri karşılaştırmayı amaçlamıştık.

Aspergillus nükleik asitlerinin PZR ile gösterilmesi, erken İA tanısında gittikçe artan şekilde değer kazanmaktadır. Diğer kültür dışı yöntemlerin aksine, PZR' nin tür seviyesinde hızlı tespit ve tanımlanması açısından önemi vardır (76,77). Bazı araştırmacılara göre PZR duyarlılığı iyidir, fakat invaziv infeksiyonlar için düşük seviyedeki özgüllüğü problem olabilir ve yalancı pozitif sonuçlar sık görülebilir (76,77).

Standardizasyon eksikliği ve ticari olarak hazır bir sistemin olmayışı, İA tanısında PZR' nin rolünün tespitinde önemli sorunlardır. Ek olarak, infeksiyonun erken evresinde dolaşımdaki *Aspergillus* DNA' sı tespit edilebilmesine rağmen, infeksiyon yerinden hangi formdaki DNA' nın nasıl serbestleştiği bilinmemektedir. DNA serbestleşmesi için fungal nekroz gerektiği düşünülürse, PZR' nin antijen serbestleşmesini tespit eden yöntemlerle kıyaslandığında erken İA tanısı için gerçekten daha duyarlı olup olmadığı sorusu akla gelmektedir (78). Örneğin, *A. fumigatus* üremesi olan yakın zamanlı in vitro çalışmalarda, β -glukan ve DNA birlikteliğine kıyasla galaktomannan antijeninin daha erken ve daha yüksek miktarlarda serbestleştiği gösterilmiştir (78). Ancak buna rağmen kontaminasyona daha az yatkın olan gerçek zamanlı PZR protokolleri, DNA ekstraksiyonu için otomatik sistemlerle birlikte mevcut PZR testlerinin güvenilirliğinin standardizasyonuna ve gelişmesine yönelik önemli bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır (77). Gerçek zamanlı PZR dolaşımdaki *Aspergillus* DNA miktarının saptanmasına olanak sağlaması nedeniyle, antifungal ilaçlarla tedavinin izlemi sırasında fungal yükün indirek bir parametresi olarak da kullanılabilir (69).

EORTC / MSG tarafından yapılan tanımlamalarda, PZR bir kriter olarak kabul edilmemiş ve benzer nükleik asit saptama yöntemlerinin ancak standardizasyonlarının iyileştirilmesinden sonra daha kullanışlı olacakları vurgulanmıştır (89).

Kontrol grubumuzun sonuçları incelendiğinde kitin dışındaki tüm yöntemler negatif sonuç vermiştir. Bu da tüm testler yapılırken laboratuvarımızda mantara ait herhangi bir yapı ile kontaminasyonun olmadığını göstermektedir.

Güncel olan kültür dışı yöntemlerin hiçbirisi İA' lı hastaların tespiti için yeterince hassas olmadığı için ve her bir yöntem infeksiyonun farklı bir zaman noktasında pozitifleştiği için, bu testlerin kombinasyonunun kullanılması uygun olacaktır (42,135). Yakın zamanda, Florent ve arkadaşları antifungal profilaksi almakta olan hematolojik maligniteli 167 hastada serum PZR yöntemini tek başına ve serum galaktomannan ile kombine şekilde prospektif olarak değerlendirmiştir (136). Elli beş tanımlanmış İA olgusunda, PZR ve galaktomannan yöntemlerinin kombine kullanımı ile duyarlılık % 83.3' e ve negatif prediktif değer de 97.6' ya yükselmiştir. Bununla birlikte, bu testlerin kombinasyonu azalmış özgüllük ve pozitif prediktif değer ile sonuçlanmıştır (136).

Ek olarak, İA' lı 11 hastayı içeren hematolojik maligniteli 40 yüksek riskli hastada yapılan küçük bir retrospektif çalışmada, galaktomannan ve β -glukan kombinasyonunun duyarlılık ve negatif prediktif değeri etkilemeden her

iki testin özgülük ve pozitif prediktif değerini % 100' e yükselttiği bildirilmiştir (121).

Hem *Aspergillus* galaktomannan hem de *Aspergillus* DNA, BAL ve BOS' da gösterilebildikleri için, serum dışındaki örneklerin değerlendirilmesinde, farklı yöntemlerin kombine edilerek çalışılması değer taşıyabilir (65). Bununla birlikte, kolay ve tekrarlı örnek alınmasına olanak vermesi nedeniyle farklı testlerin kombinasyonlarının çalışılması açısından mantıksal olarak en uygun materyal serum örnekleridir (69).

EORTC / MSG 2008 yılında İMİ' lerin tanısıyla ilgili olarak kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı şeklindeki tanımlamalarını yenilemişlerdir (89). İnfeksiyonların tanımlarının sade ve net bir şekilde belli standartlar içinde olması, yapılan çalışmaların kalitesini arttırmak ve bu çalışmaların uyumunu ve tekrarlanabilir olmasını güçlendirmek için faydalı olabilir. Biz çalışmamızda dahil ettiğimiz hastaların klinik ve radyolojik özelliklerini göznetmeden seçtiğimiz için bu tanımlama kriterlerini kullanmadık.

İMİ bulunan hastaların son yıllardaki sağkalım oranlarındaki artışlara rağmen, epidemiyolojideki ve direnç gelişmesindeki değişikliklerle ilgili zorlukları karşılamak için tanıya yönelik araştırmaların süreklilik göstermesi gerekir. PZR, galaktomannan ve β -glukan gibi kültür dışı yöntemlerin tanısal amaçlı kullanımı ile daha doğru sonuçlar elde edilebilmektedir. Erken tanı ile artmış sağkalım ilişkili olduğu için bu konu önemlidir. Doğru tanı ve in vitro duyarlılık testleri, değişen epidemiyoloji kapsamında ve antifungal ilaçlara karşı

kazanılmış direncin ortaya çıkması nedeniyle tedavi için önemli hale gelmektedir (130).

Daha doğru tanı yöntemleri ve etkili antifungal ilaçlar, yüksek İMİ riski taşıyan hastalarda prognozu iyileştirmiştir. Bununla birlikte, girişimlerimiz direnç gelişmesinin ve fungal patojenlerin epidemiyolojisindeki daha az sıklıkta görülen küf mantarlarına doğru geçişin tehdidi altındadır. Yakın gelecekte İMİ ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi aşmamızı beklemek mantıksız olacaktır. Bununla birlikte, immün sistemi baskılayıcı tedavilerin neticesinde fungal komplikasyonların geliştiği hastaların sağkalımını artırmaya devam etmek için her tür çabanın gösterilmesi gereklidir (130).

Çalışmamızda, erken tanının değerine inanarak, mantarların hücre duvarında bulunan ve infeksiyon sırasında konakçı dokusunda dağıldığını bildiğimiz kitin antijenini sistemik mikoz şüpheli hastaların serumlarında ELISA yöntemi ile aramayı amaçladık. Sonuçta kontrol grubu dahil tüm hastalarda pozitif değerler elde etmemiz nedeniyle, bu aşamada rutin tanıda kullanılabilirlik noktasından uzakta olduğumuza ancak bu yöntemle ilgili olarak ek protokoller ve uygun optimizasyon çalışmalarının yapılması gerektiği kanısına varmış bulunuyoruz. İMİ tanısında kitin ELISA yönteminin kullanımı, bu iyileştirmeler sonrasında diğer yöntemlerle birlikte çalışılarak tanısal değer kazanabilecektir.

6. SONUÇLAR

1. İMİ şüpheli 46 hastadan alınan kan örneklerinden 7' sinde (% 15,2) üreme gerçekleşmiştir. Bu 7 kan örneğinden birinde *Candida guilliermondi*, altısında *Candida albicans* kolonileri izole edilmiştir.
2. Galaktomannan antijen testi 46 serum örneğinin 8' inde pozitif bulunmuştur (% 17.4).
3. β -glukan testi 46 serum örneğinde çalışılmıştır. Serum örneklerinin 5' inde pozitif sonuç elde edilmiştir (% 10.9).
4. 46 serum örneğinin bir tanesinde *Aspergillus* DNA'sı (% 2,2) pozitif bulunmuştur. 46 tam kan örneğinin 6' sında *Candida* DNA' sı pozitif bulunmuştur (% 13).
5. Kitin antijen testi 46 serum örneğinde 1/1, 1/5 ve 1/10 dilüsyonlarında çalışılmış ve tüm örneklerde pozitif sonuç (ortalama: 2.874) elde edilmiştir (% 100).
6. Sağlıklı kontrol grubundan alınan kan örneklerinden yapılan kültürlerin hiçbirinde mantar üremesi olmamıştır.
7. PZR uygulanan kontrol grubu kan örneklerinde *Aspergillus* ve *Candida* DNA' sı saptanmamıştır.
8. Kontrol grubundan çalışılan serum galaktomannan ve β -glukan testlerinin sonuçları negatif bulunmuştur.
9. Kontrol grubundan çalışılan kitin ELISA' sında hafif bir aktivite (ortalama: 2.478) saptanmıştır.

10. Kültür sonucunda *Candida* reyen 7 hastanın 3 tanesinde *Candida* PZR sonuçları da pozitif bulunmuştur. Kültür sonuçları ile *Candida* PZR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (p=0.01).

11. *Aspergillus* PZR ile galaktomannan ELISA sonuçları arasında kısıtlı ancak anlamlı bir uyum gözlenmiştir (p=0.028).

12. β -glukan ve *Candida* PZR sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (p=0.060).

13. β glukan testi pozitif çıkan 5 hasta ile galaktomannan testi pozitif çıkan 8 hasta arasında sonuçlar açısından uyum gözlenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Hajjeh RA, Warnock DW. Epidemiology of systemic fungal diseases: Overview. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD editors. *Clinical Mycology*. Oxford: University Press, 2003; 23-30.
2. Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:569-74.
3. Kauffman CA. The changing landscape of invasive fungal infections: Epidemiology, diagnosis and pharmacologic options. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1-2.
4. Richardson MD, Kokki M. *Aspergillus*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003; 273-96.
5. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309–17.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:133–63.
7. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43:15-27.

8. Pasqualotto AC, Denning DW. Diagnosis of invasive fungal infections-current limitations of classical and new diagnostic methods. *Eur Oncol Rev* 2005; 1-11.
9. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis* 2002; (Suppl. 3):32-7.
10. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol* 2004; 126:289-97.
11. Hayashi R, Kitamoto NY, Iizawa Y, Ichikawa T, Itoh K, Kitazaki T, et al. Efficacy of TAK-457, a novel intravenous triazole, against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 283-7.
12. Lehmann Paul F, White Les O. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect Immun* 1975; 12: 987-92.
13. Sarfati J, Diaquin M, Debeaupuis JP, et al. A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced virulence *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43:203-13.
14. Wheat JL, Goldman M, Sarosi GA. Fungal Infections in immunocompromised host. In: Rubin RH, Young Lowell S, editors . *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host*. 4th ed. NY. USA: Kluwer Academic Pres, 2002; 215-47.

15. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 499-511.
16. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management 3rd ed. Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2003; p 1-13.
17. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. Clin Infect Dis 2006; 43:3-14.
18. Bouza E, Munoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (Suppl. 1):76-85.
19. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. Med Mycol 2005; 43 (Suppl 1):139-145.
20. Labbe AC, Su SH, Lavardiere M et al. High incidence of invasive aspergillosis associated with intestinal graft-versus-host disease following nonmyeloblastic transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13: 1192-2000.
21. Koch S, Hohne FM, Tietz HJ. Incidence of systemic mycoses in autopsy material. Mycoses 2004; 47:40-6.
22. Sanz Alonso MA, Jarque RI, Salavert LM, Peman J. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes. Clin Microbiol Infect 2006; 12:2-6.
23. Pagano L, Caira M, Candoni A et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica 2006; 91:1068-75.
24. Pagano L, Caira M, Nosari A et al. Fungal infections in recipients of

- hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study - Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. Clin Infect Dis 2007; 45:1161-70.
- 25.** Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. Int J Antimicrob Agents 2006; 27:359-66.
- 26.** Girmenia C, Pizzarelli G, Cristini F. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. J Clin Microbiol 2006; 44:2458-64.
- 27.** Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2004; 42:4419-31.
- 28.** Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:317-22.
- 29.** Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. Clin Microbiol Infect 2008; 14(5):487-94.
- 30.** Jorda-Marcos R, varez-Lerma F, Jurado M. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. Mycoses 2007; 50:302-10.

31. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A. 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; 28:1071-9.
32. Lass-Flörl C, Griffl K, Mayr A. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 2005; 131:201-7.
33. O'Brien SN, Blijlevens NMA, Mahfouz TH, Anaissie EJ. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 1:438-72.
34. Cornillet A, Camus C, Nimubona S. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006; 43:577-84.
35. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; 100:4358-66.
36. Post MJ, Lass-Flörl C, Gastl G, Nachbaur D. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transpl Infect Dis* 2007; 9:189-95.
37. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:215-29.
38. Girmenia C, Pagano L, Corvatta L. The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. *Br J Haematol* 2000; 111:272-6.

39. Nucci M. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and *Zygomycetes* in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 607-12.
40. Mean M, Marchetti O, Calandra T. Bench to bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 2008; 12:204.
41. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kaufmann CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. Mycoses Study Group. Impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1824-33.
42. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:609-22.
43. Odabaşı Z. İnvaziv fungal infeksiyonlarda görüntüleme yöntemleri ve serodiyagnoz. Arman D, Odabaşı Z, editörler. *Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi, İnfeksiyon hastalıklarında tedavi dizisi-12* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2009; 19-27.
44. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009; 35(1):55-62.
45. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 161-172.
46. Gerson SL, Talbot GH, Lusk E. Invasive pulmonary aspergillosis in adult acute leukemia: clinical clues to its diagnosis. *J Clin Oncol* 1985; 3:1109-16.
47. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Pulmonary aspergillosis, zygomycosis and candidiasis. In: Fishman AP, editor. *Fishman's Pulmonary Diseases and*

Disorders. 4th ed, New York: McGraw-Hill, in press.

48. Subira M, Martino R, Rovira M, et al. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003; 82:80-82.
49. Caillot D, Couaillier JF, Casasnovas O, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* 2001; 19:253-259.
50. Greene RE, Schlamm HT, Stark P, et al. Impact of halo and air-crescent signs on initial identification of invasive pulmonary aspergillosis: prevalence, variability of diagnosis and utility. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow, UK, 13 May 2003: Oral Presentation O397.
51. Aydoğan S. Deneysel hayvan modelinde oluşturulan invaziv aspergiloz infeksiyonu tanısında kültür dışı tanı yöntemlerinin değeri. Uzmanlık tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2007.
52. Young RC, Bennett JE. Invasive aspergillosis. Absence of detectable antibody response. *Am Rev Respir Dis* 1971; 104:710-6.
53. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr (2006) Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 42:244–51.
54. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH (2005) Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care

unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Med Mycol* 43:235–43.

55. Fluckiger U, Marchetti O, Bille J, Eggimann P, Zimmerli S, Imhof A, Garbino J, Ruef C, Pittet D, Tauber M, Glauser M, Calandra T. Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med Wkly* 2006; 136:447–63.
56. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ;49:3640–5.
57. Wheat LJ. Non culture diagnostic methods for invasive fungal infections. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9(6):465-71.
58. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immnosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 497-500.
59. Wheat LJ, Walsh TJ, Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:245-51.
60. Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk J, Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)-beta-D-glucan antigens. Review *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(11):755-66.
61. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004;

39:1467-74.

62. Silveira F, Paterson DL. Pulmonary fungal infections. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:242-6.
63. Wingard JR, Leather HL. Diagnosis and therapy of invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Current Treatment Options in Infect Dis* 2003; 5:517-27.
64. Tomee JF, Mannes GP, van der Bij W, et al. Serodiagnosis and monitoring of *Aspergillus* infections after lung transplantation. *Ann Intern Med* 1996; 125:197-201.
65. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:349-57.
66. Acramicne D, Kondratas A. Effects of β glucans on the immune system. *Medicina* 2007; 43: 8-20
67. Odabaşı Z, Mattiuzi G, Estey E. β -D glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections, validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogeneous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39:199-205.
68. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1-3) – beta-D glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections- a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1864-70.
69. Chamilos G, Kontoyiannis PD. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology* 2006; 44:163-72.

70. Verweij PE, Meis JFGM. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000; 2:80-87.
71. Fukazawa Y (1989) Antigenic structure of *Candida albicans*. immunochemical basis of the serologic specificity of the mannans in yeasts. *Immunol Ser* 47:37-62.
72. Prella M, Bile J, Pugnale M. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:95-101.
73. Poulain D, Robert R, Mesnard F, Sendid B, Lepage G, Camus D. Clearances of *Candida albicans* derived alpha- and beta-linked mannose residues in sera from patients with candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:16-20.
74. Aktaş E. Multipleks, broad-range ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin mikrobiyolojide kullanımı. Durmaz R, IV. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu, kurs kitabı Malatya: Eylül 2007; 106-24.
75. Shea YR. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA, editörs. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2007; 1745-61.
76. Chen SC, Halliday CL, Meyer W. Review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40:333-357.

77. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45:361-368.
78. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasei N, et al. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuran antigens, 1,3- β -D-Glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1711-18.
79. Arishima T, Takezawa J Use of PCR based diagnosis for common invasive fungal infections in the intensive care unit. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47:283-8.
80. Pfaller MA, McGinnis MR. The laboratory and Clinical Mycology. In: Anaissie, McGinnis, Pfaller, editors. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003; 67-79
81. Allan EK, Jordanides NE, McLIntock LA, et al. Poor performance of galactomannan and mannan sandwich enzyme-linked immunosorbant assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Bri J Haematol* 2005; 128: 578-9.
82. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect Dis Clin N Am* 2003; 17: 135-58.
83. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioassays*. 2006; 28(8):799-808.
84. Jean Paul Latge. The cell wall. A carbohydrate armour for the fungal cell. *Micro Review*. *Molec Microbiol* 2007; 66:(2) 279-90.
85. Beth Din A, Specht CA, Robbins PW, Yarden O. A class IV

chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. Chs-4. Mol Gen Genet 1996; 250:214-222.

86. Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. Tekstil Teknolojileri Elektr Derg 2009; cilt 3:(2) 92-103.
www.teknolojikarastirmalar.com
87. Montazer, M, Afjeh, G. Simultaneous X-linking and antimicrobial finishing of cotton fabric, Journal of Applied Polymer Science 2007; 103:178-85.
88. Walsh TJ, Francesconi A, Casai M, Chanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J Clin Microbiol 2005; 34: 2464-8.
89. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/ MSG) consensus group. Revised definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer/Invasive Clin Infect Dis 2008 15; 46(12):1813–21.
90. Ram FJA, Arentshorts M, Damveld RA, van Kuyk PA, Klis FM, Hondel van den AMJJC. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate aminotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall. Microbiol 2004; 150:3315-26.
91. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in

- experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 2005; 73: 494-503.
92. Schmidt A. Animal models of aspergillosis also useful for vaccination strategies? *Mycoses* 2002; 45: 38-40.
93. Clemons KV, Stevens DA. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. *Medical Mycology* 2009;47:(Suppl 1),132-7.
94. Kuştimur S, Aydoğan S, Kalkancı A, Berk E, Yalçın B, Bolat S. Dokuda kitin varlığı ile mantar infeksiyonları arasındaki ilişkinin hayvan modellerinde gösterilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2008; 22 (2): 97-101.
95. Walker AN, Garner RE, Horst MN. Immunocytochemical detection of chitin in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1990; 58(2):412-5.
96. Hughes, W. T. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Philadelphia: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1987; 73-93.
97. Wellinghausen N, Siegel D, Winter J, Gebert S. Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1106–11.
98. Van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Vliet HJ, van Etten EW, Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3):625-8.
99. Sakai T, Ikegami K, Yoshinaga E, Uesugi-Hayakawa R, Wakizaka A. Rapid, sensitive and simple detection of *Candida* deep mycosis by amplification of 18S ribosomal RNA gene; comparison with assay of serum beta-D-glucan

level in clinical samples. *Tohoku J Exp Med* 2000; 190(2):119-28.

100. Chryssanthou E, Klingspor L, Tollemar J, Petrini B, Larsson L, Christensson B, Ringdén O. PCR and other non-culture methods for diagnosis of invasive *Candida* infections in allogeneic bone marrow and solid organ transplant recipients. *Mycoses* 1999; 42(4):239-47.
101. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(4):245-51.
102. Tanriover MD, Ascioğlu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses* 2010; 53(1):16-25.
103. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5):2181-7.
104. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190:641-9.
105. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(4):230-40.
106. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based

preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (9):1242–50.

107. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186:1297-306.
108. Dalle F, Charles PE, Blanc K et al. *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2929-31.
109. Huang YT, Hung CC, Liao CH, Sun HY, Chang SC, Chen YC. Detection of circulating galactomannan in *Penicillium marneffei* infection and *cryptococcosis* among patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 2007; 49:2858-62.
110. Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the *Pastorex Aspergillus* antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2489-90.
111. Subira M, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Serrano D, De La Ca'mara R. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy-confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003; 82:80-2.
112. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous plasmalyte as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):3141–2.

113. Surmont I, Stockman W. Gluconate-containing intravenous solutions: another cause of false-positive galactomannan assay reactivity. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1373.
114. 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.
115. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der SC, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003; 121(3):448–57.
116. Roilides E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in infant and children. *Medical Mycology* 2006; 44:199-205.
117. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1417-27.
118. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97:1604-10.
119. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2184-6.
120. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective Comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, duple-

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)- β -D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2733–41.

121. Pazos C, Ponton J, Palacio AD. Contribution of (1-3)- β -d-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):299–305.
122. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1-3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):5957–62.
123. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D. Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(5):882–5.
124. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR. Reactivity of (1–3)- β -d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(10):3450–3.
125. Kami M, Tanaka Y, Kanda Y, et al. Computed tomographic scan of the chest, latex agglutination test and plasma (1-3)- β -D-glucan assay in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study of 215 patients. *Haematologica* 2000; 85:745-752.
126. Hachem RY, Boctour M, Daugherty T, et al. The utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1-3)- β -D-glucan in the diagnosis of invasive

fungal infections in cancer patients (M-161). In: 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC, 2005; 415.

- 127.** Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 379-84.
- 128.** Morrissey CO, Chan AL, Campbell AE, Kidd SE, Kularatne G, Slavin MA. Use of PCR on the combination of serum (S) and whole blood (WB) specimens for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis (IA) in haematology patients. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL Abstract 2009;M-1721.
- 129.** Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 89-96.
- 130.** Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jul;15(7):625-33.
- 131.** White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA .The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis* 2006; 42(4):479–86.

- 132.** Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 844-6.
- 133.** Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzymelinked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998; 41:373-7.
- 134.** Bialek R, Moshous D, Casanova JL, Blanche S, Hennequin C. *Aspergillus* antigen and PCR assays in bone marrow transplanted children. *Eur J Med Res* 2002; 7: 177-80.
- 135.** Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Warris A, et al. Detection of circulating glucan in patients receiveing intravenous amoxicillin-clavulananic acid. Second Advances Against Aspergillosis. Athens, Greece. 22— 25 February 2006; P064.
- 136.** Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, et al. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 2006; 193: 741-7.

8. ÖZET

Sistemik mantar infeksiyonlarının tanısı hala zor ve sorunludur. Konvansiyonel yöntemlerin temelini oluşturan kültür kesin tanı için altın standart olmakla beraber bazen zor ve zaman alıcı olmaktadır.

Bu çalışmada sistemik mantar infeksiyonu tanısında kullanılan kültür ve kültür dışı yöntemlerden galaktomannan, β -glukan ve PZR' nin karşılaştırılması ve aralarındaki korelasyonun araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca sistemik mikoz şüpheli olguların serumlarında kitin antijeninin ELISA yöntemiyle aranarak mantar infeksiyonlarının erken tanısında kullanılabilirliğinin araştırılması ve geliştirilmesi planlanmıştır.

Bu çalışmaya sistemik mikoz şüpheli 46 hasta ve 46 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir.

Sistemik mantar infeksiyonu şüpheli 46 hastadan alınan kan örneklerinden 7' sinde (% 15,2) kültürde üreme olmuştur. Platelia® *Aspergillus* testi ile galaktomannan antijeni örneklerin 8' inde pozitif bulunmuştur (% 17.4). Fungitell™ kiti ile β -glukan aktivitesi ölçülmüş, örneklerin beşinde pozitif sonuç elde edilmiştir (% 10.9). Gerçek zamanlı PZR ile örneklerin altısında *Candida* DNA' sı (%13), bir tanesinde *Aspergillus* DNA' sı (% 2,2) pozitif bulunmuştur. Kitin antijen testi 46 serum örneğinde 1/1, 1/5 ve 1/10 dilüsyonlarında çalışılmış ve tüm örneklerde (% 100) sonuç pozitif çıkmıştır (ortalama: 2.874).

Kontrol grubunun kan örneklerinden yapılan kültürlerde mantar üremesi olmamıştır. PZR testinde *Aspergillus* veya *Candida* DNA' sını saptanmamış, galaktomannan ve β -glukan düzeyleri negatif olarak bulunmuştur. Kitin ELISA' sında hafif bir aktivite tesbit edilmiştir (ortalama: 2.478).

Kültür sonuçları ile *Candida* PZR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur ($p=0.01$). *Aspergillus* PZR ile galaktomannan ELISA sonuçları arasında kısıtlı ancak anlamlı bir uyum gözlenmiştir ($p=0.028$). Ancak β -glukan ve *Candida* PZR sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır ($p=0.060$).

Sonuçta kültür dışı testlerin performanslarını arttırmak için kombinasyonlarının kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

Mantar infeksiyonlarının erken tanısına katkı sağlayabileceğini düşünerek ELISA yöntemi ile serumda kitin antijeninin varlığı test edilmiştir. Ancak diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Şu anda rutin kullanım amacından uzak olmakla beraber ELISA ile kitin taraması yönteminin ek protokoller ve uygun optimizasyon çalışmaları sonrasında geliştirilerek tanısız değer kazanabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: PZR, Galaktomannan, β -glukan, kitin ELISA

9. SUMMARY

The diagnosis of systemic fungal infection is still be difficult and problematic. Although the culture is the gold standard among the conventional diagnostic methods, it can be sometimes difficult and time-consuming.

In this study, we aimed to compare the use of conventional culture with the non culture methdos such as galactamannan assay, β -glucan assay, and polymerase chain reaction in the diagnosis of systemic fungal infections. On the other hand, we aimed to investigate and develop the possible usage of the chitin measurement by ELISA in the sera of the patients with suspected mycosis for the early diagnosis of fungal infections.

Fourty six patients with suspected fungal infections and 46 volunteers were included in this study.

Blood cultures were found positive in the seven (15.2%) of the 46 patients with systemic fungal infections. Galactomannan antigen was found positive in 8 (17.4%) samples by the Platelia® *Aspergillus* test. β -glucan activity was measured by the Fungitell™ kit and five (10.9%) samples yielded positive results. *Candida* DNA was found positive in six (13%) samples by real-time PCR, and *Aspergillus* DNA in one (2.2%) sample. Chitin antigen was measured in 46 serum samples in 1/1, 1/5, and 1/10 dilutions and was found positive in all of them.

No growth was observed in the cultures of the blood samples of the control group. *Aspergillus* and *Candida* DNA were also not detected, and galactomannan

and β -glucan levels were found negative in the control group. A slight activity, however, was detected in the chitin ELISA.

A statistically important correlation was found between the culture and *Candida* PCR results ($p=0.01$). We found also an important correlation between the *Aspergillus* PCR and galactomannan ELISA results ($p=0.028$). A correlation was not found between β -glucan and *Candida* PCR results ($p=0.060$).

In conclusion, we think that the use of these test in combination would be useful in order to improve the performance of the non culture tests. Investigation of the presence the chitin antigen by ELISA would be useful for the early diagnosis of the funfal infections and therefore we tested the chitin level in the serum samples. However, we did not found any correlation when compared with other diagnostic methods. We think that, although the chitin assay has not been routinely used now, measurement of the chitin level may be useful in the future after appropriate optimization.

Key words: PCR, Galactomannan, β -glukan, chitin ELISA

10. TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 : İnvaziv <i>Candida</i> infeksiyonları için risk faktörleri.....	16
Tablo 2 : Yalancı pozitif β -glukan sonuçlarının sebepleri.....	26
Tablo 3 : PZR için kullanılan primer ve prob dizileri.....	52
Tablo 4: Mantar primerleri kullanarak hazırlanan PZR karışımı.....	53
Tablo 5: Çoğaltma protokolü safhaları.....	54
Tablo 6: Mikoza tanısı için çalışılan yöntemler ve hasta grubunun sonuçları.....	63
Tablo 7: Mikoza tanısı için kullanılan yöntemler ve bunların birbirleri ile korelasyonları.....	64

11. ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Mantar hücre duvarının yapısı.....	37
Şekil 2: Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları.....	39
Şekil 3: <i>Candida albicans</i> kolonileri.....	59
Şekil 4: Hasta örneklerinin glukana konsantrasyonları.....	60
Şekil 5: β glukana ait okuyucu ekranında görülen aktivite eğrisi.....	61
Şekil 6: β glukana ait standart eğri (korelasyon katsayısı sonucu).....	61
Şekil 7: İnvaziv mikoz Şüpheli hastaların amplifikasyon eğrileri. (Kan örneği)..	62

12. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Burçe

Soyadı: Yalçın

Doğum yeri ve tarihi: Mardin / 11.12.1978

Eğitimi: 26.06.2006 tarihinde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 2004-2005 yılları arasında Erciyes Üniversitesi mediko sosyal sağlık biriminde görev yaptım.2003-2004 yılları arasında Kayseri Cırgalan Sağlık Ocağında görev yaptım. 2002 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1995 yılında Mersin Fen Lisesinden mezun oldum.

Yabancı Dili: İngilizce

Üye olduğu bilimsel kuruluşlar: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlar Derneği

Bilimsel etkinlikleri:

1. **Yalçın B** ve Kuştimur S. Gezgin mikozu etkenleri ve olgu örnekleri. İnfeksiyon dergisi (Turkish Journal of Infection) 2009; 23 (1):21-8.
2. Kuştimur S, Aydoğan S, Kalkancı A, Berk E, **Yalçın B**, Bolat S. Dokuda kitin varlığı ile mantar infeksiyonları arasındaki ilişkinin hayvan modellerinde

gösterilmesi. İnfeksiyon dergisi (Turkish Journal of Infection) 2008; 22 (2):97-101.

3. Kalkanci A, Dizbay M, Turan O, Fidan I, **Yalçın B**, Hirfanoğlu I, Kuştimur S, Aktaş F, Sugita T Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature Turk J Pediatr. 2010 Jan-Feb; 52 (1): 42-9.
4. **Yalçın B**, Kalkanci A, Gürelik F, Fidan I, Kustimur S, Ozdek S. In vitro synergistic effect of moxifloxacin and amphotericin B combination against *Candida* strains. Mikrobiyol Bul. 2010 Jan;44(1):65-70.
5. Dizbay M, Adisen E, Kustimur S, Sari N, Cengiz B, **Yalcin B**, Kalkanci A, Gonul II, Sugita T. Fungemia and cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in an intensive care unit patient. Jpn J Infect Dis. 2009 Mar; 62(2):146-8.
6. Mikozi tanısı için hasta serumlarında kitinin gösterilmesine yönelik Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) ve Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemlerinin geliştirilmesi, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, 01/2007-100 Proje Yöneticisi, Ayşe Kalkancı, 2007.