

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

**İNVAZİV PULMONER ASPERGİLLOZ ŞÜPHELİ
HASTALARDA GALAKTOMANNAN VE BETA GLUKAN
ANTİJEN TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. TUĞBA ÇUHADAR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYŞE KALKANCI**

**ANKARA
EYLÜL 2019**

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNVAZİV PULMONER ASPERGİLLOZ ŞÜPHELİ
HASTALARDA GALAKTOMANNAN VE BETA GLUKAN
ANTİJEN TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. TUĞBA ÇUHADAR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYŞE KALKANCI

ANKARA
EYLÜL 2019

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Tuğba ÇUHADAR
Baba Adı	Cebrail
Doğum Yeri/Tarihi	Ankara/25.02.1984
Diploma Tarihi / Diploma No	05.08.2009/146648
Mezun Olduğu Fakülte	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji
İhtisas Süresi	Yıl: 4
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: İnvaziv pulmoner aspergilloz şüpheli hastalarda
galaktomannan ve beta gluklan antijen testlerinin karşılaştırılması

JÜRİ KARARI: BAŞARILI BULUNMUŞTUR .

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

ÜYE

Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

ÜYE

Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince ilgi ve desteğini çokça hissettiğim, bilgi ve birikimi ile her zaman önümde yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya, asistanı olmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a ve eğitimime katkıda bulunan diğer kıymetli hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan, doktora ve teknisyen arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi iletiyorum. Mikoloji laboratuvarı laborantı Sayın Aykut SEYREK'e tez çalışmalarımda olan yardım ve katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Son olarak hayatımdaki en büyük destekçilerim kıymetli anneciğim, babacığım ve biricik kardeşlerime, sevgili eşim ve canım kızıma en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
Teşekkür.....	ii
İçindekiler.....	iii
Kısaltmalar	v
Tablolar Dizini.....	vii
Şekiller Dizini	ix
Resimler Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Sınıflandırma	5
2.4. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri	7
2.4.1. Makroskopik görünüm.....	8
2.4.2. Mikroskopik görünüm.....	8
2.4.3. Hücre duvar yapısı	12
2.5. Patogenez ve Konak Savunması	13
2.5.1. Solunum epiteli ile etkileşim	13
2.5.2. <i>Aspergillus</i> virülans faktörleri	14
2.5.3. Konak savunması	17
2.6. Klinik	20
2.6.1. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA)	22
2.6.2. Aspergilloma (Fungus topu)	23
2.6.3. Kronik pulmoner aspergilloz (KPA)	23
2.6.4. Subakut invaziv pulmoner aspergilloz (Kronik nekrotizan aspergilloz)	24
2.6.5. Akut invaziv pulmoner aspergilloz (İPA).....	24
2.7. İnvaziv Pulmoner Aspergilloz Tanısı	25
2.7.1. Klinik tanımlama	26
2.7.2. Radyolojik bulgular	26
2.7.3. Laboratuvar tanısı	30
2.8. Tedavi	38

3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Hasta Seçimi	40
3.2. Örneklerin Toplanması	41
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler	41
3.3.1. Kullanılan cihazlar	41
3.3.2. Kullanılan sarf malzemeler	42
3.4. Platelia™ Aspergillus Ag Testi.....	42
3.4.1. Test prensibi	42
3.4.2. Testin uygulanışı	43
3.4.3. Sonuçların yorumlanması.....	44
3.5. Dynamiker Aspergillus Galaktomannan Testi	44
3.5.1. Test prensibi	44
3.5.2. Testin uygulanışı	45
3.5.3. Sonuçların yorumlanması.....	46
3.6. Dynamiker Fungus (1,3)- β-D-Glukan Testi.....	47
3.6.1. Test prensibi	47
3.6.2. Testin uygulanışı	47
3.6.3. Sonuçların yorumlanması.....	48
3.7. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	51
4.1. Demografik Veriler.....	51
4.2. Kültür Sonuçları	57
4.3. Galaktomannan Antijen Bulguları	58
4.4. Beta Glukan Antijen Bulguları	60
4.5. Galaktomannan ve Beta Glukan Antijen Testlerinin Birlikte Değerlendirilmesi	63
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ	81
7. KAYNAKLAR	82
8. ÖZET	91
9. SUMMARY	93
10. EKLER	95
11. ÖZGEÇMİŞ.....	96

KISALTMALAR

ABPA	Allerjik bronkopulmoner aspergilloz
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BDG	(1-3)- β -D-Glukan
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BT	Bilgisayarlı tomografi
CMV	Sitomegalovirüs
EAPCRI	European <i>Aspergillus</i> PCR Initiative
ECIL	European Conference on Infections in Leukemia
EIA	Enzyme Immunoassay
EORTC/MSG	European Organisation for Research on Treatment of Cancer- Mycoses Study Group
ESCMID-ECMM-ERS	European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases-European Confederation of Medical Mycology-European Respiratory Society
ETA	Endotrakeal aspirat
FDA	Food and Drug Administration
GİS	Gastrointestinal sistem
GM	Galaktomannan
GMS	Gomori methenamin gümüşleme boyası
GVHD	Graft versus host hastalığı

HSCT	Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
IDSA	Infectious disease society of America
IL	İnterlökin
ITS	Internal transcribed spacer
İA	İnvaziv aspergilloz
İPA	İnvaziv pulmoner aspergilloz
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KOH	Potasyum hidroksit
KPA	Kronik pulmoner aspergilloz
LFD	Lateral akım testi
MLST	Multilokus sekans tiplendirme
MM	Multipl myelom
NF-κB	Nükleer faktör kappa beta
ODİ	Optik dansite indeksi
PAS	Periyodik asid Schiff
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	Patojen tanıma reseptörleri
TLR	Toll benzeri reseptör
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekroz faktör α
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İnvaziv mantar enfeksiyonları gelişiminde konağa ait risk faktörleri (5) .5	
Tablo 2. <i>Aspergillus</i> türlerinin morfolojik özellikleri (15) 11	
Tablo 3. <i>Aspergillus</i> türlerinin neden olduğu klinik tablolar 21	
Tablo 4. Yoğun bakım hastalarında invaziv aspergilloz risk faktörleri (69) 25	
Tablo 5. İnvaziv pulmoner aspergilloz tanı kriterleri (5).....29	
Tablo 6. Hasta gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı 52	
Tablo 7. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar 53	
Tablo 8. Hasta gruplarının kliniklere göre dağılımı 54	
Tablo 9. Hasta gruplarına ait risk faktörlerinin tanımlanması 55	
Tablo 10. Yüksek olasılıklı İPA hastalarına ait risk faktörlerinin tanımlanması ..56	
Tablo 11. Kültür örneği gönderilen hastaların sayısı 57	
Tablo 12. Yüksek olasılıklı İPA hastalarının pozitif kültür sayıları.....57	
Tablo 13. Serolojik testler için gönderilen klinik örnek sayıları.....58	
Tablo 14. Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri.....59	
Tablo 15. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag ve Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testlerinin karşılaştırılması.....59	
Tablo 16. FDA onaylı Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testine göre Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri 60	
Tablo 17. Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri.....61	

Tablo 18. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testi ile Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin karşılaştırılması.....	62
Tablo 19. FDA onaylı Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testine göre Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	62
Tablo 20. Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testleri birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	63
Tablo 21. FDA onaylı Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testi ile Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin birlikte değerlendirilme sonuçlarının karşılaştırılması	64
Tablo 22. FDA onaylı Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testine göre Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Aspergillus</i> türlerinin sınıflandırılması.....	7
Şekil 2. <i>Aspergillus</i> 'un şematik mikroskopik görünümü	10
Şekil 3. Mantar hücre duvar yapısı	12

RESİMLER DİZİNİ

Figure 1. <i>Aspergillus</i> türlerinin makroskopik görünümleri	8
Figure 2. <i>Aspergillus</i> 'un. mikroskopik görünümü	10
Figure 3. Hasta örneklerinin beta glukan aktivite eğrileri	49
Figure 4. Hasta örneklerinin beta glukan konsantrasyonları	49
Figure 5. 2 nolu hastanın BAL örneği	58

1. GİRİŞ

İmmüsupresif tedavi rejimlerinin yaygınlaşması ile birlikte invaziv mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı önemli ölçüde artmıştır. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının hızlı tanı ve tedavisi yüksek morbidite ve mortalite oranları nedeniyle önem arz etmektedir. Bu enfeksiyonların önemli bir kısmını invaziv aspergilloz (İA) oluşturmaktadır (1, 2).

Doğada yaygın olarak bulunan *Aspergillus* türleri basit allerjik reaksiyonlardan yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar birçok farklı klinik duruma yol açmaktadır. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu klinik tablolar köken virülansı, konak akciğer ve immün durumu gibi birçok mantar ve konak faktörüne bağlı olsa da en önemli faktör konak immün durumudur. *Aspergillus*, immün sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara neden olmaktadır (3). Uzun süreli nötropeni varlığı (10 günden uzun süreli, <500 nötrofil/mm³), allojeneik kök hücre nakli, kalıtsal ve edinilmiş immün yetmezlikler, solid organ nakli ve uzun süreli kortikosteroid kullanımı (3 haftadan uzun süreli, 0.3 mg/kg/gün prednizon) invaziv aspergilloz gelişiminde yüksek risk taşımaktadır (4, 5).

İnvaziv aspergilloz tanısı klinik bulgular, radyolojik görüntüleme ve mikrobiyolojik verilerin yorumlanmasını gerektirmektedir (6). İnvaziv aspergillozun özellikle immün sistemi baskılanmış savunmasız hastalarda enfeksiyon oluşturmaması bu hastalarda hastalığın kısa sürede mortal seyretmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle hastalığın yönetiminde çeşitli tanı algoritmaları geliştirilmiştir (4-6).

İnvaziv aspergilloz tanısında altın standart yöntem etkenin kültürde üretilmesidir. Ancak birçok hastada kültürün negatif olması veya hastalığın ileri dönemlerinde pozitifleşmesi tanı ve tedavide gecikmelere yol açmaktadır. Tanıda klasik konvansiyonel yöntemlere ek olarak serolojik (galaktomannan ve beta gluklan antijen testi) ve moleküler testlerin kullanılması hızlı ve erken tanıya olanak sağlamaktadır (7). İnvaziv aspergilloz tanısında sıkça kullanılan galaktomannan antijen test sonuçlarının değişken olması (8) beraberinde başka tanısal testlerin kullanımını gerektirmektedir. İnvaziv mantar enfeksiyonları tanısında EORTC/MSG kriterleri (5) arasında yerini alan (1-3)- β -D-Glukan testi galaktomannan antijen testi ile birlikte invaziv aspergillozun serolojik tanısında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı piyasaya yeni çıkan Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan ve Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testlerinin invaziv pulmoner aspergilloz enfeksiyonlarındaki tanısal duyarlılıklarını FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Aspergillus cinsinin ilk kez tanımlanması 1729 yılında Floransa’da organizmanın spor taşıyan başı ile kutsal su serpmek için kullanılan aspergillum arasındaki benzerliğin rahip Micheli tarafından fark edilmesiyle olmuştur. İlk detaylı mikroskopik tanımlama 1856 yılında Virchow tarafından yapılmıştır. İlk sınıflandırma 1926 yılında Thom ve Church tarafından yapılarak 69 *Aspergillus* türü 11 gruba ayrılmıştır. 1965 yılında Raper ve Fennell tarafından *Aspergillus* taksonomisi yapılmış ve 18 grup, 132 tür ve 18 alt tür tanımlanmıştır (7, 8). Günümüzde ise *Aspergillus* cinsine ait 339 tür 4 alt cins altında toplanmıştır (14).

İmmüsupresif tedavi ajanlarının kullanıma girmesi ile 1950’lerden sonra immün sistemi baskılanmış hastalarda invaziv aspergilloz olguları görülmeye başlanmıştır (7).

2.2. Epidemiyoloji

Dünyada yaygın olarak bulunan *Aspergillus* türleri bitkiler, çürümüş organik maddeler, toprak, hava/aeroseller, tatlı su ve deniz habitatları gibi çok geniş bir çevrede kendilerine yer edinmişlerdir. İnşaat alanları, iç mekanlar, su sistemleri ve toz tanecikleri bulundukları diğer yerler arasındadır (3). Hastane ortamlarında ise hava, su depoları, duş başlıkları ve saksı bitkilerinde sıklıkla bulunurlar (9).

Aspergillus’un yaşam döngüsü saprofit olarak bulunan aseksüel sporların kolayca havaya karışması ile başlamaktadır. Vücuda en önemli giriş kapısı solunum yollarıdır. *Aspergillus* konidyumları (2,5-3 µm) aerosol olarak solunarak akciğer,

nazofarenks ve sinüslere kolonize olmaktadır. İnkübasyon süresi ve enfeksiyon oluşması için gereken inokulum miktarı bilinmemektedir. Diğer bir bulaş yolu kornea enfeksiyonlarında olduğu gibi mantar sporlarının travma yoluyla vücuda girmesiyle olmaktadır (9-11).

Enfeksiyonların %90'ından fazlası *A.fumigatus* tarafından oluşturulmaktadır. *A.fumigatus*'u, *A.flavus* ve *A.niger* takip etmektedir. *Aspergillus* türlerine ait konidyumların inhalasyonu, immün sistemi sağlam olan bireylerde doğal savunucu hücreler (nötrofil ve makrofaj) tarafından fagosite edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Konak savunma mekanizmalarının yokluğunda dinlenme halindeki konidyum çimlenerek hifal forma dönmekte ve organizmanın anjioinvaziv doğası enfeksiyonun yayılmasına neden olmaktadır. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu klinik tablolar konak immün durumu, köken virülansı ve konak akciğer yapısına bağlı olarak çeşitli allerjik reaksiyonlardan invaziv enfeksiyonlara kadar oldukça geniş bir yelpazede ele alınmaktadır (3, 8).

Konakta oluşturduğu hastalık *Aspergillus* türünün virülansından çok konak faktörlerine bağlıdır. En önemli konak faktörü uzamış nötropeni (10 günden uzun süreli, <500 nötrofil/mm³) varlığıdır. Hematolojik ve lenforetiküler kanserli hastalar, kemik iliği kök hücre nakli alıcıları (HSCT), solid organ nakli olanlar, yüksek doz kortikosteroid (3 haftadan uzun süreli, 0.3 mg/kg/gün prednizon) tedavisi alanlar ve kronik granülomatöz hastalıkta (CGD) olduğu gibi nötrofil sayı ve fonksiyonunu etkileyen durumlar invaziv aspergilloz için yüksek risk taşımaktadır (10). İnvaziv mantar enfeksiyonları gelişiminde konağa ait risk faktörleri tablo 1'de gösterilmektedir.

Kök hücre nakilli hastalarda invaziv aspergilloz görülme sıklığı iki dönemde pik yapmaktadır. Bunlardan biri engrafman öncesi nötropenik dönem diğeri ise graft versus host hastalığıdır (GVHD). Steroidlerin GVHD gelişmiş allojeneik kök hücre nakilli hastaların tedavisinde kullanılması nötropeni olmamasına rağmen nötrofil fonksiyonlarının bozulmasına neden olarak (12) invaziv aspergilloz için yüksek risk oluşturmaktadır (13). Nötropenik hastalarda invaziv aspergilloz hızlı hifal büyümenin yol açtığı tromboz ve kanamalarla karakterizedir. Kortikosteroid kullanımı olan non-nötropenik hastalarda ise damar invazyonu görülmezken granülamatöz infiltratların olduğu sınırlı bir mantar gelişimi, doku nekrozu ve aşırı bir inflamasyon bulunmaktadır (11).

Tablo 1. İnvaziv mantar enfeksiyonları gelişiminde konağa ait risk faktörleri (5)

Konağa ait risk faktörleri
1. Nötropeni (10 günden uzun süreli <500 nötrofil/mm ³)
2. Allojeneik kök hücre nakli
3. Uzamış kortikosteroid kullanımı (3 haftadan uzun süreli, 0.3 mg/kg/gün prednizon)
4. T hücre baskılayan ilaç kullanımı (siklosporin, TNF- α blokörleri, alemtuzumab gibi spesifik monoklonal antikorlar, son 90 gün içinde kullanılmış nükleozid analogları)
5. Ciddi kalıtsal immün yetmezlikler (kronik granülamatöz hastalık, ciddi kombine immün yetmezlik)

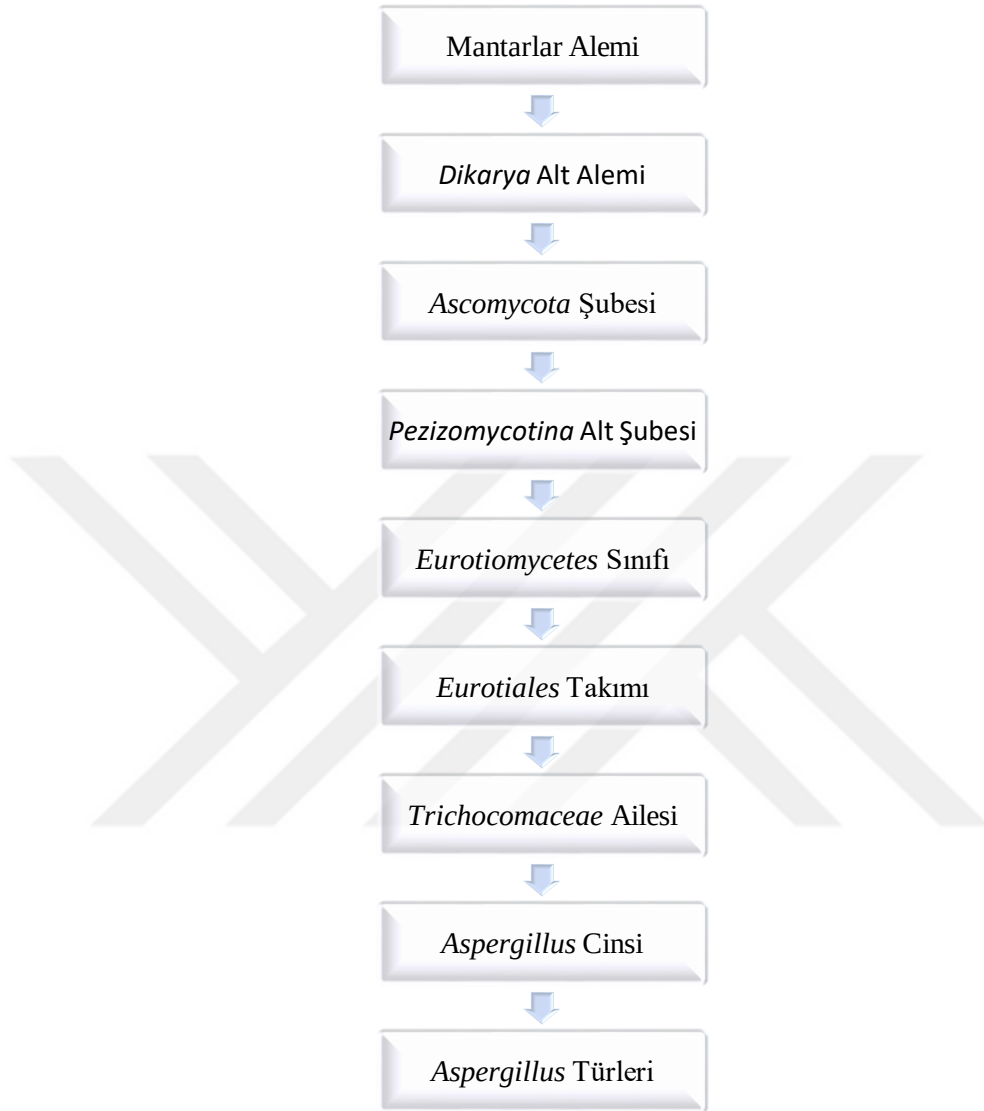
2.3. Sınıflandırma

Aspergillus türleri taksonomik olarak; mantarlar (fungi, kingdom) aleminde, *Dikarya* alt aleminde, *Ascomycota* şubesinde, *Pezizomycotina* alt şubesinde, *Eurotiomycetes* sınıfında yer almaktadır. *Aspergillus* türlerinin teleomorfları

(seksüel form) *Ascomycota* şubesinin *Eurotiales* takımında sınıflandırılırken, anamorfik formları (aseksüel form) *Deuteromycota* şubesinin *Hyphomycetes* sınıfında *Trichocomaceae* ailesi içinde yer almaktadır (7).

Birçok *Aspergillus* türü aseksüel olarak çoğalmaktadır. Ancak telemorf ya da seksüel form denilen patojenik türler de tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları *Aspergillus fumigatus*'un telemorf formu *Neosartorya fumigata*, *Aspergillus nidulans*'ın telemorf formu *Emericella nidulans*, *Aspergillus amstelodami*'nin telemorf formu *Eurotium amstelodami*'dir (7).

Aspergillus taksonomisi çoklu lokus dizileme analizleri (MLST) ile yeniden şekillenmiştir. MLST analizleri daha önce çok iyi tanımlanamayan kriptik *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasını sağlamıştır. Fenotipik yöntemlere ve DNA ITS bölgelerinin sekansına dayalı tanımlama sadece belli bir bölüm içindeki türleri tanımlamaya olanak vermektedir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için genel öneri tanımlamanın 'tür kompleksleri' şeklinde yapılması yönündedir. *Aspergillus* için sadece ITS bölgelerinin tanımlanması güvenilir değildir. *Aspergillus* türlerini tanımlarken ITS bölgelerinin dizilemesine ek olarak beta-tubulin, kalmodulin ve ribozomal genlerin dizilenmesi gerekmektedir (7, 14).



Şekil 1. *Aspergillus* türlerinin sınıflandırılması

2.4. *Aspergillus* Türlerinin Genel Özellikleri

Aspergillus türleri rutin kültür besiyerlerinde 12-72 saat içinde kolayca ürerler. Kan kültürlerinde ise nadiren üreme görülür. İnvaziv enfeksiyonlara neden olan türler sıklıkla *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger* ve *A.terreus* tür kompleksi üyesidirler. Patogen *Aspergillus* türlerini patojen olmayan türlerden ayıran en önemli özellik

37°C'de üremeleridir. *A.fumigatus*, *A.fumigatus* kompleksi içinde yer alan kriptik türlerden 50°C'de üreyebilmesi ile ayrılmaktadır (8).

2.4.1. Makroskobik görünüm

Aspergillus türleri, hiyalen küf mantarlarıdır. *Aspergillus* türlerinin koloni rengi türe ve üreme koşullarına bağlı olarak siyah, kahverengi, yeşil, sarı, beyaz veya diğer renklerde olabilir. Birçok *Aspergillus* türü ilk 48 saatlik kültürde küçük beyaz koloniler şeklinde görülmektedir. Koloni görünümü, *Aspergillus* türü hakkında fikir verse de kesin tanımlama hif ve konidyal baş yapısının mikroskobik incelenmesi ile olmaktadır (7, 9).



Figure 1. *Aspergillus* türlerinin makroskobik görünümüleri

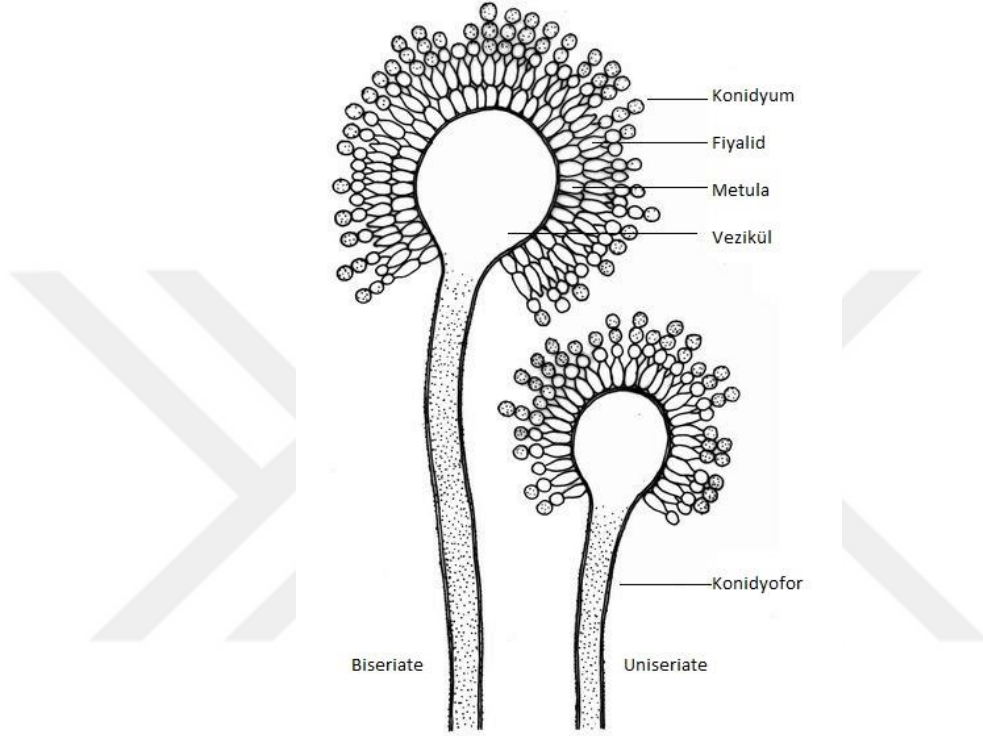
2.4.2. Mikroskobik görünüm

Aspergillus mikroskobik olarak; 4 ila 6 mikron çapında, hiyalen, paralel duvarlı, septalı hiflerle karakterizedir. 45 derece açıyla dikotom dallanma doku kesitlerindeki invaziv miçelyumlarda sıklıkla bulunurken, kültür plaklarından alınan mikroskobik incelemelerde daha az oranda görülmektedir. Ayak hücresi olarak bilinen özelleşmiş bir hif segmenti, konidyofor orjininin tabanı olarak görev

yapmaktadır. Konidyoforlar şişkin bir vezikül olarak sonlanırlar. Vezikülün yüzeyinde bir (uniseriate) ya da iki (biseriate) sıra hücre bulunmaktadır. Uniseriate konidyoforda fiyalidler direkt olarak vezikülden çıkarken, biseriate konidyoforda vezikülden yükselen ve metula adı verilen bir iç hücre dizisi fiyalidleri oluşturmaktadır. Fiyalidler, pigmente konidyum zincirleri oluşturan konidyagenöz hücrelerdir. Konidyoforların uzunluk, genişlik ve yapısal özellikleri (pürüzlü ya da pürüzsüz), vezikülün büyüklük ve kontürü, metulanın varlığı/yokluğu (uniseriate ya da biseriate), fiyalidlerin düzeni ve konidyumların renk ve boyutu tür tanımlamada kullanılan özelliklerindendir. Bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen özel yapıların varlığı, bu türlerin tanımlanmasında yarar sağlamaktadır. Bunlara örnek olarak Hülle hücreleri, alöryokonidyum ve kleistotesya verilebilir (15).

Doku örneklerindeki *Aspergillus* hifleri H&E ile zayıf boyanırken PAS, GMS ve Gridley gibi mantar boyaları ile iyi boyanırlar. Hifleri homojen olup genişlikleri aynıdır (3-6 µm). Birbirine paralel duvar yapısı, düzenli septum varlığı ve ağaç gibi dallanan bir görünümü vardır. Dallanma iki eşit parçaya ayrılma (dikotom) tarzında ve genellikle dar açıdır (~45°). Hifler anjioinvazyon yaparak tromboza neden olabilir. *Aspergillus* hifleri, kültürde ve doku ortamında hava ile temas ettiği zaman konidyal baş oluştururlar. Konidyal başlar, dokuda kavitasyon varlığında görülürler. Doku kesitlerinde, miçel yan duvarlarından gelişen alöryokonidyumların görülmesi *A.terreus* tanısı koydururken diğer *Aspergillus* türleri için tür tanımlaması söz konusu değildir. *Aspergillus* türlerinin

tanımlanmasında mikroskopi yol gösterse de tür kompleksindeki kriptik türlerin tanımlanması için moleküler yöntemlere ihtiyaç vardır (9).



Şekil 2. *Aspergillus*'un şematik mikroskopik görünümü



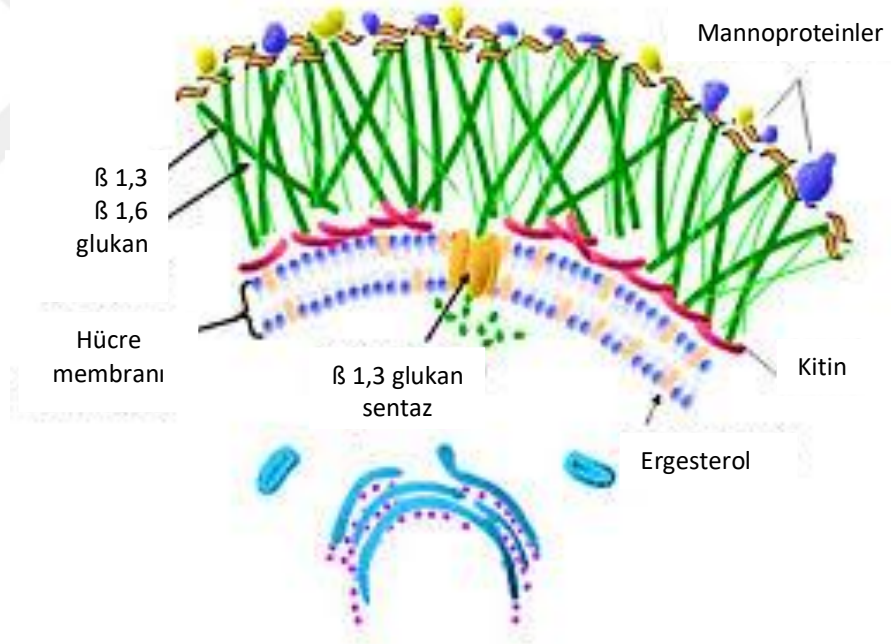
Figure 2. *Aspergillus*'un. mikroskopik görünümü

Tablo 2. *Aspergillus* türlerinin morfolojik özellikleri (15)

<i>A.fumigatus</i>; Gri-yeşil tonlarda pamuğumsu, yünümsü koloniler oluşturur. Vezikülün üst 2/3 kısmını kaplayan tek sıra fiyalidleri bulunur. Kolumnar biçimde yerleşen konidyumlar genellikle küresel ve düzgün yüzeylidir. Konidyoforlar görece daha uzundur (300 ila 500 µm).
<i>A.flavus</i>; Granüler veya yünsü yapıda, sarı-zeytin yeşili koloniler oluşturur. Tüm vezikülü kaplayan fiyalidleri ve papatya yaprağı şeklinde dizilmiş konidyumları bulunur. Tek sıra ya da iki sıra olabilen, nispeten uzun (500 ila 800 µm) konidyoforları vardır. Konidyoforların proksimal kısmı bu türe özgü olarak belirgin şekilde pürtüklüdür. Küresel, düz yüzeyle konidyumlar olgunlaşma ile hafif pürtüklü bir hal alabilir. Konidyumlar sarı-kahverengi pigmentasyona sahiptir.
<i>A.terreus</i>; Tarçın-bej tonlarında radyal kıvrımlı, granüler koloniler oluşturur. Vezikülün üst 2/3 kısmının fiyalidlerle kaplı olması <i>A.fumigatus</i>'a benzemekle birlikte <i>A.terreus</i> fiyalidleri daha uzun ve çift sıradır. Bununla birlikte metula ile fiyalidler arasındaki sınırı seçmek zordur. <i>A.terreus</i>'un kesin identifikasyonu için 'dig mount' yöntemiyle plak derininden alınan hiflerde alöryokonidyumların gösterilmesi önerilir.
<i>A.niger</i>; Olgunlaşmış kolonileri, siyah renkli konidyumlar nedeniyle karabiber ekilmiş görüntüsü verir. Dematosiyöz mantarların aksine kolonileri tersten sarı-gri renklerde görünür. Konidyoforu çift sıra hücreden oluşur. Kısa zincirlerden oluşmuş yoğun konidyum kümeleri vezikülün tüm yüzeyini kaplamıştır.

2.4.3. Hücre duvar yapısı

Hücre duvarı: Mantar hücresinin şeklini veren, osmolalite, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlere karşı mantarın korunmasını sağlayan yapı hücre duvarıdır. Kompleks ve dinamik bir yapıya sahip olan hücre duvarının ana bileşeni polisakkarittir. Filamentöz mantarların duvar yapısı α -glukan (başlıca α -1,3-glukan, daha az oranda α -1,4-glukan), β -glukan (β -1,6 dallı β -1,3-glukan), galaktomannan ve kitinden oluşur. β -1,3-glukan, galaktomannan ve kitin konak tarafından tanınarak hızla dolaşımdan uzaklaştırılır (16).



Şekil 3. Mantar hücre duvar yapısı

Galaktomannan antijeni: Galaktomannan (GM), β -(1-5) galaktofuranoz ve β -(1-4) galaktopiranoz yan zincirlere sahip α -(1-2) ve α -(1-6) bağlı mannoz omurgadan oluşan polisakkarit yapıda hücre duvar antijenidir (17-19). Glikozilfosfatidilinozitol kancası ile membrana veya kovalent bağlarla doğrudan hücre duvarına bağlı olarak bulunur (20). GM molekülünün mannan omurgası

immünojen olmayıp, immünodominant epitop galaktofurandır (21). *Aspergillus* türlerinin gelişimi esnasında dokulara salınan bu antijenin suda çözünebilir olması serum, BOS, idrar, plevra ve BAL sıvısı gibi vücut sıvılarında tespitine olanak sağlar. Galaktomannan antijeni invaziv aspergilloz klinik belirtilerinin ortaya çıkışından 5-8 gün önce tespit edilebilmektedir (22).

(1,3)- β -D-Glukan: (1,3)- β -D-Glukan (BDG), *Cryptococcus* ve *Zygomycetes* hariç birçok mantar türünün hücre duvar yapısında bulunan β -1,6 dallanmalara sahip β -1,3 zincirlerinden oluşan D-glukoz homopolimeridir (23). İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Serolojik olarak (1,3)- β -D-Glukanın tespiti, atnalı yengeçleri (horseshoe crab) olarak bilinen *Limulus polyphemus* ve *Tachypleus tridentatus* amebositlerinden elde edilen faktör G'nin BDG tarafından aktive edilerek koagülasyon kaskadını başlatması esasına dayanmaktadır (24).

2.5. Patogenez ve Konak Savunması

2.5.1. Solunum epiteli ile etkileşim

Aspergillus'un en sık bulaş yolu konidyumların akciğer ve paranazal sinüslere inhalasyonudur. Daha az sıklıkla cerrahi yaralar, kontamine intravenöz katater veya kontamine bandaj uygulamaları ile kutanöz enfeksiyonlara neden olurlar (8).

Ortalama bir insanın bir günde 200 konidyum soluduğu tahmin edilmektedir. Akciğer savunma mekanizmaları sağlam olan konakta *Aspergillus*'a karşı ilk savunma hattı mukosiliyer aktivite ile hava yollarından temizlenen konidyumun alveollere sınırlı erişimidir. *A.fumigatus* konidyumları (2-3 μ m) ise alveollere

ulaşmak için ideal büyüklüktedir. *A.flavus* ve *A.niger* konidyumlarının büyük olması mukosiliyer aktivite ile üst solunum yollarından temizlenmelerini sağlamaktadır. Bu da *A.fumigatus*'un diğer türlere oranla neden daha patojen olduğunu açıklamaktadır (11).

Akciğerlere yerleşen konidyumun çimlenmesi iki gün ila aylar süren bir sürede gerçekleşmektedir. Çimlenme oranları türlere göre farklılık gösterirken *A.fumigatus* en yüksek çimlenme oranlarına sahiptir. *A.fumigatus*'un hızlı hifal dönüşümü ve dokulara erken invazyonu diğer türlere göre yüksek çimlenme oranları ve kısa çimlenme sürelerine sahip olması ile ilişkili bulunmuştur (11, 25, 26).

2.5.2. *Aspergillus virulans* faktörleri

Aspergillus enfeksiyonlarının patogeneğinde rol alan mantara ait virülans faktörleri şunlardır:

2.5.2.1. Isı toleransı (Termotolerans)

Aspergillus'un 30 °C üzerindeki sıcaklıklarda üreyebilme kapasitesi 5 gen bölgesi ile ilişkili bulunmuştur. Bu gen bölgelerinden biri olan *cgrA* mutasyonunda konidyum çimlenmesinin geciktiğı ve radyal büyümenin azaldığı bilinmektedir. *A.fumigatus* vahşi kökeni ve *cgrA* mutantı immün yetmezlikli farelere verildiğinde vahşi köken ile enfekte olan farelerin büyük kısmının ilk hafta içinde öldüğü, mutant köken ile enfekte olan farelerin ise %60'ının ikinci hafta sonunda hayatta kaldıkları görülmüştür (27).

Aspergillus türleri arasında konidyum çimlenme oranları bakımından 30 °C’de belirgin bir fark görülmezken 37 °C ve üstü sıcaklıklarda *A.fumigatus* dışındaki türlerde konidyum çimlenme oranları anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Diğer türlere oranla daha patojen olan *A.fumigatus* 37 °C’de iyi üreyebilmesinin yanı sıra 50 °C ve üstü sıcaklıklarda yaşamını sürdürebilmektedir (11, 28).

2.5.2.2. Adezinler

Aspergillus’un epitel yüzeyine tutunması konidyum yüzeyinde bulunan sialik asit rezidüleri ile olmaktadır. Bu rezidüler *A.fumigatus* gibi patojen olan türlerde patojen olmayan türlere oranla daha fazla bulunmaktadır (29). *Aspergillus*’un, fibrinojen, bazal membran yapısındaki laminin ve ekstrasellüler matriks bileşeni fibronektine tutunmasına sialik asit ve diğer konidyum yüzey proteinleri aracılık etmektedir. Hasar görmüş epitelde açığa çıkan bu yapılar akciğer hasarı varlığının invaziv aspergilloz için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (11).

2.5.2.3. Pigment sentezi

Melaninler, fenolik ve indolik bileşenlerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşan hidrofobik ve negatif yüklü makromoleküllerdir. Sıklıkla kahverengi ve siyah görülmekle birlikte farklı renklerde de olabilirler. Mantarlarda virülansla ilişkili en önemli melaninler DHN ve DOPA-melaninlerdir (30). Birçok mantar türü tarafından sentezlenen melaninler, UV ışınlarına karşı bariyer görevi görmektedir. Ayrıca alveoler makrofajlar ve nötrofiller tarafından üretilen reaktif oksijen moleküllerine karşı koruma sağlarlar. Melanin pigmentinin konak savunma mekanizmalarına karşı dirençten sorumlu olduğu ve pigment sentezinde meydana

gelen mutasyonun konidyumların virölansında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Melanin pigmenti bazı *Aspergillus* türlerinin ayırt edilmesini sağlamaktadır. *A.fumigatus*'un gri-yeşil görünmesini sağlayan pigment DHN-melanindir (11, 31, 32).

2.5.2.4. Enzimler

Nükleaz, fosfotaz, elastaz, peptidaz ve proteaz gibi ekstraselüler enzimler *Aspergillus*'un konak dokusunda ilerlemesini ve makromoleküllerden besin ihtiyacını karşılamasını sağlamaktadır. *Aspergillus* enfeksiyon sırasında üç tane önemli proteaz salgılamaktadır. Bunlar alkalın serin proteaz, metalloproteaz ve aspartik proteazdır (33). Klinik örneklerden elde edilen *A.fumigatus* izolatları çevresel izolatlara göre daha fazla proteaz aktivitesine sahiptir. İzolatlar arasındaki bu farklılık proteolitik aktivite ile doku invazyonu arasında ilişkiyi göstermektedir (34).

İmmün sistemi baskılanmış fareler elastaz üreten ve üretmeyen *A.fumigatus* kökenlerine maruz bırakıldığında elastaz üreten kökenlerin 48 ila 96 saat içinde fareleri öldürdüğü ve akciğer dokusunun hif ve nekroz içerdığı, elastaz üretmeyen kökenlerin ise akciğer dokusunda yıkıma yol açmadığı ve az sayıda çimlenmiş spor içerdığı görülmüştür. Bu çalışma invazyon oluşumunda elastazın rolünü ortaya koymaktadır (35). Elastaz üretimi ortam sıcaklığı ile ilişkili olup *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.terreus* ve *A.niger* türlerinde maksimum elastaz üretimi 33 °C'de gerçekleşmektedir (36).

Aspergillus'un virölansında etkili olan diğer enzimler katalaz ve süperoksit dismutazdır (Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD). *Aspergillus* immün sistem hücrelerinden salgılanan H₂O₂ ve reaktif oksijen moleküllerinin toksik etkilerinden bu enzimler sayesinde kurtulmaktadır (11).

2.5.2.5. Toksinler

Aspergillus'un hifal formları gliotoksin, aflatoksin, okratoksin A, fumagilin ve helvolik asit gibi birçok toksin sentezlemektedir. *A.fumigatus* ve *A.terreus* daha çok gliotoksin salgılamakta *A.flavus* aflatoksin salgılamaktadır (37). Gliotoksin düşük dozlarda dahi solunum epitelinin siliyer aktivitesini bozarken fumagilin ve helvolik asitte bu etki yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkmaktadır (38). Gliotoksin immün sistem hücreleri üzerine inhibitör etkilidir. T hücre yanıtını baskılaması (13), nötrofil ve makrofajların fagositoz yeteneklerini bozması (39), NF-κB transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu inhibe etmesi (40), monosit ve nötrofillerin apoptozunu indüklemesi (13) gliotoksinin immün sistem üzerindeki etkilerinden sadece birkaçıdır. İnvaziv aspergilloz enfeksiyonu olan hastaların serumlarında gliotoksin seviyelerinin yüksek olarak tespit edilmesi gliotoksinin patogeneze ile ilişkisini gözler önüne sermektedir (41).

2.5.3. Konak savunması

2.5.3.1. Doğal immün yanıt

Mukosiliyer aktivitenin etkisinden kurtulan *Aspergillus* konidyumlarının solunum epiteli ile etkileşime geçmesi bu hücrelerden defensin gibi antimikrobiyal peptidlerin salgılanmasına yol açmaktadır (42). Epitel hücreleri üzerinde bulunan

patojen tanıyan reseptörler (PRR) *Aspergillus*'un çimlenmekte olan konidyumları ve hifal formlarını tanıyarak IL-6, TNF- α ve IL-8 gibi sitokin ve kemokinlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. Bu etki steroidler tarafından inhibe edilmektedir (43).

Alveollere ulaşan konidyuma karşı oluşturulan konak yanıtında alveoler makrofajlar kritik bir öneme sahiptir. Alveoler makrofajlar *Aspergillus* konidyumlarını konak hücre PRR'lerinin aracılık ettiği aktin bağımlı fagositoz ile hücre içine almaktadır. Fagositoz ile fagolizozom içine alınan konidyumun öldürülmesi reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve fagolizozom asidifikasyonu ile gerçekleşmektedir (44, 45). *Aspergillus*'un tanınmasına ve konak hücre aktivasyonuna aracılık eden PRR reseptörleri, Toll benzeri patojen tanıma reseptörleri (TLR2, TLR4) ve C-tip lektin reseptörü dektin-1'dir. TLR2 konidyal ve hifal formları tanırken, TLR4 sadece hifal formların tanınmasından sorumludur (11). Dektin-1 reseptörleri, dinlenme halindeki konidyumda hidrofobik tabaka ile maskelenmiş olarak bulunan ve konidyumun çimlenmesi veya hifal forma dönmesi ile açığa çıkan $\beta(1,3)$ -glukanı tanımaktadır (46). TLR reseptörlerinin aksine dektin-1 reseptörleri hem immünsupresif hem de immün sistemi sağlam olan bireylerde *Aspergillus*'a karşı olan konak savunmasında rol almaktadır (47). Konidyumun PRR reseptörleri ile etkileşmesi TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sentezine neden olmaktadır (48).

Alveoler makrofajlar, proinflamatuvar yanıt oluşturmak suretiyle polimorfonükleer lökositlerin (nötrofil) inflamasyon bölgesine göçünden sorumludurlar. Makrofajdan kurtularak çimlenmeyi başaran konidyumlar, hifal

formun öldürülmesinden sorumlu olan nötrofillerin hedefi haline gelmektedir (11). NADPH oksidazın aracılık ettiği oksidatif saldırıya ek olarak granüllerden salgılanan laktoferrin ve lizozim gibi antimikrobiyal bileşikler non-oksidatif yollarla mantar hiflerinin öldürülmesini sağlamaktadır (49). Dinlenme halindeki *Aspergillus* konidyumları nötrofillerin öldürücü etkisine karşı nispeten dirençli olsa da nötrofillerin laktoferrin aracılığıyla konidyum çimlenmesini inhibe ettiği bilinmektedir (50-52). Nötrofiller, epitel hücreleri ve makrofajlara benzer şekilde TLR ve dektin-1 reseptörlerini kullanmaktadır (53).

Kortikosteroid kullanımı damar endoteline bağlanma, ekstrasvazasyon, kemotaksis, fagositoz, degranülasyon, oksidatif patlama ve serbest radikal oluşumu, nitrik oksit ve sitokin salınımı gibi birçok nötrofil fonksiyonunu bozarak invaziv aspergilloz için risk oluşturmaktadır (54).

Kan damarlarının mantar hifleri tarafından istila edilmesi invaziv aspergillozun karakteristik özelliğidir. Lokal doku yanıtı oluşturabilme yeteneğine sahip olan endotel hücreleri damar invazyonuna karşı bariyer görevi görmektedir. Endotel tarafından fagosit edilmemiş hifler E-selektin ve VCAM-1 gibi lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarırken konidyumların bu etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca hifal yapıların IL-8 ve TNF- α sentezini daha fazla uyardığı bilinmektedir (55). Damar invazyonu sonucunda enfeksiyon bölgesinde kanama ve tromboz meydana gelmektedir. Tromboz doku enfarktüsüne yol açarak enfeksiyon alanına antifungal ilaçların ulaşmasını ve nötrofil göçünü sınırlamaktadır (55, 56).

2.5.3.2. Kazanılmış immün yanıt

Antijen sunan hücrelerin (APC) patojen tanıma reseptörlerinin (PRR) aktivasyonu kazanılmış immün sistemin uyarılmasına yol açmaktadır. Dendritik hücreler fagosite ettikleri *Aspergillus* konidyum ve hiflerini bölgesel lenf nodlarına taşıyarak yardımcı T lenfosit yanıtını başlatmaktadır. Dendritik hücrelerin *Aspergillus* konidyumlarını fagosite etmesi IL-12 salgısına neden olurken hifal yapıların fagosite edilmesi IL-4 ve IL-10 salgısını uyarmaktadır (57). Yanıtın Th1 yönünde gelişmesi INF- γ ve TNF- α sentezine neden olurken Th2 yönünde gelişmesi IL-4, IL-10 ve IL-13 sentezine yol açmaktadır (58). Th1/Th2 yanıtında Th2 yönüne doğru bir kayma Th1 yanıtının koruyucu etkilerinin ortadan kalkmasına yol açarak invaziv aspergilloz gelişimine katkıda bulunmaktadır. Th2 yanıtı kronik enfeksiyon ve alerjik yanıt ile ilişkili bulunmuştur (57). Th2 yanıtının B lenfositlerin antikor sentezini uyarması serumda IgG ve IgM, BAL sıvısında ise IgA antikorlarının tespitine olanak sağlar (59).

2.6. Klinik

Aspergillus türlerinin neden olduğu klinik tablolar konak immünitesine bağlı olarak asemptomatik kolonizasyondan alerjik durumlara, yüzeysel enfeksiyonlardan invaziv hastalıklara kadar oldukça geniş bir yelpazede incelenebilir (7).

Tablo 3. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu klinik tablolar

- 1. Allerjik aspergilloz**
 - a. *Aspergillus*'un indüklediği astım
 - b. Allerjik *Aspergillus* sinüziti
 - c. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz
 - d. Ekstrinsik allerjik alveolit (Hipersensitivite pnömonisi)
- 2. Saprofitik kolonizasyon ve yüzeysel aspergilloz**
 - a. Sinüs aspergillomu
 - b. Pulmoner aspergilloma
 - i. Basit pulmoner aspergilloma
 - ii. Kompleks pulmoner aspergilloma (Kronik pulmoner aspergilloz)
 - c. Otomikoz
 - d. Onikomikoz
- 3. Doku hasarı, cerrahi veya yabancı cisimle ilişkili enfeksiyon**
 - a. Keratit ve/veya endoftalmit
 - b. Deri enfeksiyonu (yanıklarda)
 - c. Cerrahi alan enfeksiyonu (prostatik kapak endokarditi, subdural ampiyem)
 - d. Yabancı cisimle ilişkili enfeksiyon (intravenöz kateterler)
- 4. İmmün sistemi baskılanmış konakta enfeksiyon**
 - a. Primer kutanöz aspergilloz
 - b. Akut invaziv rinosinüzit
 - c. Havayolu aspergillozu
 - i. Tıkayıcı bronşiyal aspergilloz
 - ii. İnvaziv *Aspergillus* trakeobronşiti
 - d. Pulmoner aspergilloz
 - i. Akut invaziv pulmoner aspergilloz
 - ii. Subakut invaziv pulmoner aspergilloz (Kronik nekrotizan aspergilloz)
 - e. Dissemine invaziv aspergilloz (Serebral aspergilloz, *Aspergillus* osteomyeliti)

2.6.1. Allerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA)

ABPA, solunum yollarının *Aspergillus* türleri ile olan kolonizasyonuna karşı konak tarafından geliştirilen hipersensitivite reaksiyonudur. Sıklıkla kistik fibrozis ve atopik astımlı hastalarda görülmektedir. Astımlı hastaların %1-2'sinde, kistik fibrozisli hastaların ise %1-15'inde ABPA geliştiği bilinmektedir (60).

Klinik olarak ABPA, akciğer fibrozisi ve santral bronşektaziye yol açan geçici pulmoner infiltratların olduğu bronşiyal astım ile karakterizedir. *Aspergillus*'un solunum yollarında kolonize olması CD4⁺ Th2 hücrelerinde IL-4, IL-5 ve IL-13 sentezini uyarmaktadır. CD4⁺ Th2 hücrelerinden salgılanan sitokinler IgE, IgG ve IgA antikor sentezine ve eozinofiliye yol açarak ABPA patogenezine katkıda bulunurlar. İnflamasyonun kronikleşmesi bronş lümeninde mukus tıkaçlarının oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bronş lümenini dolduran mukus tıkaçları atalektezi nedeniyle geçici pulmoner infiltratların oluşmasına, bu reaksiyonların tekrarlaması ise santral bronşektaziye yol açmaktadır (7, 61, 62).

Klasik tanı kriterleri; aralıklı bronşiyal obstrüksiyon (astım), periferik eozinofili ($>1000 \text{ mm}^3$), *A.fumigatus*'a karşı oluşmuş presipitan (IgG, IgM) antikor varlığı, artmış serum IgE seviyeleri ($>417 \text{ IU/mL}$), *Aspergillus* antijenlerine karşı hızlı cilt reaktivitesi, pulmoner infiltrat varlığı ve santral bronşektazidir. Bu kriterlere ek olarak eozinofil ve Charcot-Leyden kristallerinden oluşan kahverengi mukus tıkaçı varlığı ve balgam örneğinden *Aspergillus* izolasyonu tanıyı destekleyen diğer bulgulardır (63).

2.6.2. Aspergilloma (Fungus topu)

Kavitelerin *Aspergillus* türleri ile kronik kolonizasyonu sonucunda meydana gelen saprofitik enfeksiyonlardır. Akciğer kaviteleri ve ektazik bronşlara yerleşik mantar hifleri, mukus, fibrin ve hücresel artıkların birleşiminden oluşan yuvarlak solid kitleler yaparlar. Risk faktörleri arasında tüberküloz, sarkoidoz, büllöz amfizem ve akciğer apsesi gibi kavitasyona yol açan akciğer hastalıkları sayılabilir. >2 cm'den büyük kavitelerde %15-20 oranında aspergilloma gelişmektedir. Hemoptizi en yaygın görülen klinik bulgudur ve ölümle sonuçlanabilir. Aspergilloma çoğunlukla asemptomatik olsa da doku invazyonu gelişebildiği akılda tutulmalıdır (7, 64).

2.6.3. Kronik pulmoner aspergilloz (KPA)

İmmün yetmezliği bulunmayan hastalarda altta yatan bir akciğer hastalığına sekonder olarak gelişen yavaş seyirli kronik akciğer hastalığıdır. Kronik pulmoner aspergilloz, çok sayıda kavitasyon ve fungus topundan oluşan kronik kaviter pulmoner aspergillozdan, kronik fibrozan veya nekrotizan aspergilloza kadar birçok farklı klinik spektrumu içermektedir. En sık görülen şekli kronik kaviter pulmoner aspergilloz olup daha az sıklıkla tek aspergilloma ve *Aspergillus* nodülü görülmektedir. Kronik kaviter pulmoner aspergilloz tedavi edilmediği takdirde kronik fibrozan pulmoner aspergilloza ilerleyebilmektedir. En önemli predispozan faktör tedavi edilmiş tüberküloz varlığıdır. Altta yatan diğer hastalıklar; tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonları, KOAH, daha önce tedavi edilmiş akciğer kanseri, ABPA, pnömotoraks, sarkoidoz ve bronşektazidir (8, 64, 65).

2.6.4. Subakut invaziv pulmoner aspergilloz (Kronik nekrotizan aspergilloz)

Kronik kaviter pulmoner aspergilloz ile benzer klinik ve radyolojik özelliklere sahip olmasına rağmen hızlı progresiv seyir gösteren yarı invaziv pulmoner aspergillozdur. *Aspergillus*'un damar invazyonu yapmaksızın akciğer parankim istilasısı söz konusudur. Serolojik tanı ve antifungal tedaviye yanıt, kronik kaviter pulmoner aspergilloza oranla daha yüksektir. Diyabet, alkolizm, malnutrisyon, ileri yaş, KOAH, HIV, uzamış kortikosteroid tedavisi ve radyasyon terapisi gibi hafif-orta derecede immün yetmezliğe neden olan durumlar hastalığa yatkınlık oluşturmaktadır (7, 64, 65)

2.6.5. Akut invaziv pulmoner aspergilloz (İPA)

Akut invaziv pulmoner aspergilloz, invaziv aspergillozun en sık görülen klinik formudur. İnvaziv aspergilloz gelişiminde tanımlanmış en önemli risk faktörü uzamış nötropeni varlığıdır. Nötropeni süresi ve derinliği ile bu risk artış göstermektedir. İnvaziv aspergillozun, nötropenin 10-12. gününden önce nadiren geliştiği bilinmektedir (66). Bu süre nötropenik AML hastalarında 15 gün olarak bulunmuştur (67). İnvaziv pulmoner aspergilloz, nötropenik hastalarda hızlı hifal büyüme ve damar invazyonunun olduğu, ilerleyici doku yıkımı, tromboz ve kanamalar ile karakterizedir. Nötropenik olmayan hastalarda damar invazyonu görülmemektedir (11).

Akut invaziv pulmoner aspergillozlu hastaların %25-33'ünde hastalık başlangıcında hiçbir semptom görülmezken, en erken saptanan klinik bulgular kuru öksürük ve ateştir. Kortikosteroid alan hastalarda sıklıkla ateş bulunmaz. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde nefes darlığı, göğüs ağrısı ve hemoptizi eşlik edebilir.

Nötropenik hastalarda semptomlar daha hafif seyretmektedir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda hastalık hızlı progresyon gösterirken immün sistemi sağlam olan bireylerde daha yavaş bir seyir gözlenmektedir. Hastalık immün sistemi baskılanmış hastalarda 7-14 gün içinde ölümle sonuçlanmaktadır (68).

Tablo 4. Yoğun bakım hastalarında invaziv aspergilloz risk faktörleri (69)

Risk Derecesi	Risk Faktörleri
Yüksek	Nötropeni (<500 nötrofil/mm ³) Hematolojik kanserler Allojeneik kemik iliği transplantasyonu
Orta	Yoğun bakıma yatış öncesi uzun süreli kortikosteroid kullanmış olmak Otolog kemik iliği transplantasyonu Kronik obstrüktif akciğer hastalığı Siroz (yoğun bakımda >7 günden uzun kalmış olmak) Solid organ kanserleri HIV enfeksiyonu Akciğer transplantasyonu İmmüsupresif tedavi gerektiren sistemik hastalıklar
Düşük	Şiddetli yanıklar Diğer solid organ transplantasyon alıcıları (kalp, böbrek, karaciğer) Yoğun bakımda >21 günden uzun kalmak Steroid tedavisi (≤7 gün) Malnütrisyon Kardiyak cerrahi sonrası

2.7. İnvaziv Pulmoner Aspergilloz Tanısı

İnvaziv aspergillozun kötü klinik gidiş ile ilişkili olması bu hastaların yönetiminde çeşitli tanı algoritmalarının geliştirilmesine neden olmuştur. İnvaziv pulmoner aspergillozun erken tanısı zordur ve kılavuzlarda yer alan klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik verilerin yorumlanmasını gerektirir (6).

2.7.1. Klinik tanımlama

Avrupa Kanseri Araştırmaları ve Tedavi Topluluğu/İnvaziv Mantar Enfeksiyonları Çalışma Grubu (EORTC) ve Ulusal Allerji ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü Mantar Çalışma Grubu (MSG) 2002 yılında konsensus oluşturarak klinik ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanmak üzere invaziv mantar enfeksiyonlarının standart tanımlarını yapmıştır. 2008 yılında bu tanımlarda revizyona gidilmiştir. EORTC/MSG, immün sistemi baskılanmış kanserli hastalar ve hematopoetik kök hücre nakli alıcılarını invaziv mantar enfeksiyonları açısından üç gruba ayırmıştır (5):

1. **Kanıtlanmış (proven) invaziv pulmoner aspergilloz:** Biyopsi veya iğne aspirasyonu ile alınan steril klinik örneğin histopatolojik, sitopatolojik veya direkt mikroskopik incelemesinde doku hasarı ile birlikte hif yapılarının görülmesi veya örneğin kültüründe *Aspergillus* üremesi
2. **Yüksek olasılıklı (probable) invaziv pulmoner aspergilloz:** Konak faktörleri, klinik ve mikolojik kriterlerin her birinden en az bir kriterin bulunduğu olgular
3. **Düşük olasılıklı (possible) invaziv pulmoner aspergilloz:** Konak faktörleri ve klinik kriterlere sahip olup mikolojik kriterlerin bulunmadığı olgular

EORTC/MSG invaziv pulmoner aspergilloz tanı kriterleri tablo 5'te gösterilmektedir.

2.7.2. Radyolojik bulgular

İPA tanısında direkt grafinin yeri nonspesifik bulgular varlığı nedeniyle sınırlıdır. Direkt grafide en sık saptanan bulgu multipl veya soliter pulmoner nodüldür. Proksimal pulmoner damarların istilasına ile oluşan enfarkt alanları kama

benzeri opasiteler oluşturabilir. Hava hilal bulgusu direkt grafide hastalığın iyileşme evresinde görülebilirken bilgisayarlı tomografide (BT) daha erken saptanmaktadır (70). İnvaziv aspergilloz açısından risk altında bulunan hastalarda sebebi bilinmeyen ateş veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine rağmen alt solunum yolu enfeksiyonu kliniği varlığında tercih edilecek görüntüleme yöntemi BT'dir (6). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda BT'de görülen tipik radyolojik değişiklikler hastalığın erken tanısına olanak sağlamaktadır. Anjioinvaziv aspergillozda sıklıkla görülen BT bulguları; ≥ 1 cm makronodül (%94.5), halo bulgusu (%60.9), konsolidasyon (%30.2), kaviter lezyon (%20.4), hava bronkogramları (%15.7), <1 cm nodül kümeleri (%10.6), plevral effüzyon (%10.6) ve hava hilal bulgusudur (%10.2) (71).

Etrafı buzlu cam dansitesi ile çevrili 1 cm'den büyük makronodüller halo bulgusu olarak tanımlanmaktadır. Halo bulgusu; *Aspergillus* hiflerinden oluşan santral nekrotik nodül ve onu çevreleyen koagülasyon nekrozundan oluşmaktadır. İPA'nın erken göstergesi olarak kabul edilen halo bulgusu anjioinvazyonun ilk on günü içerisinde ortaya çıkıp daha sonra kaybolmaktadır. İPA'ya özgü olmamasına rağmen risk altındaki hastalarda bu bulgunun gözlenmesi antifungal tedavinin erken başlanması ve artmış sağkalım oranları ile ilişkili bulunmuştur (71, 72).

Hava hilal belirtisi iyileşmenin başlaması ile ortaya çıkan geç dönem bulgusudur. Konağın nötroopeniden çıkışı ile mantara karşı geliştirdiği immün yanıt sonucu oluşmaktadır. Santralde bulunan nekrotik doku çevre parankim dokusundan ayrılarak hava hilal belirtisini oluşturmaktadır. İPA için spesifik olmamasına

rağmen prognostik öneme sahiptir. Konağın mantara karşı oluşturduğu immün yanıt ve sağ kalma oranlarındaki artış ile ilişkili bulunmuştur (72, 73).



Tablo 5. İnvaziv pulmoner aspergilloz tanı kriterleri (5)

EORTC/MSG Tanı Kriterleri		
Kanıtlanmış (proven) İPA	Akciğerden biyopsi veya iğne aspirasyonu ile alınan steril klinik örneğin histopatolojik, sitopatolojik veya direkt mikroskopik incelemesinde doku hasarı ile birlikte hif yapılarının görülmesi veya örneğin kültüründe <i>Aspergillus</i> üremesi	
Yüksek olasılıklı (probable) İPA	Konak faktörü	1. Nötropeni (<500 nötrofil/mm ³ , >10 gün) 2. Allojeneik kök hücre nakli 3. Uzun süreli kortikosteroid kullanımı (0,3 mg/kg/gün, >3 hafta) 4. T hücre baskılayan ilaç kullanımı (siklosporin, TNF- α blokörleri) 5. Ciddi kalıtsal immün yetmezlikler (kronik granümatöz hastalık)
	Klinik kriter	1. BT; i. Nodüler lezyon $\pm$ halo belirtisi ii. Hava-hilal bulgusu iii. Kaviter lezyon 2. Bronkoskopide trakeobronşit görülmesi (ülserasyon, nodül, plak, pseudomembran)
	Mikolojik kriter	1. Direkt testler (sitoloji, direkt mikroskopi, kültür) BAL/balgam mikroskopisinde küf mantarı elemanlarının görülmesi veya kültürde <i>Aspergillus</i> üremesinin olması 2. İndirekt testler (antijen aranması) Serum/plazma/BAL örneğinde GM antijen pozitifliği veya serum örneğinde β -D-glukan pozitifliği
Düşük olasılıklı (possible) İPA	Konak faktörü	1. Nötropeni (<500 nötrofil/mm ³ , >10 gün) 2. Allojeneik kök hücre nakli 3. Uzun süreli kortikosteroid kullanımı (0,3 mg/kg/gün, >3 hafta) 4. T hücre baskılayan ilaç kullanımı (siklosporin, TNF- α blokörleri) 5. Ciddi kalıtsal immün yetmezlikler (kronik granümatöz hastalık)
	Klinik kriter	1. BT; iii. Nodüler lezyon $\pm$ halo belirtisi iv. Hava-hilal bulgusu iv. Kaviter lezyon 2. Bronkoskopide trakeobronşit görülmesi (ülserasyon, nodül, plak, pseudomembran)
İPA olmayan	Konak faktörü, klinik veya mikolojik kriterlerin bulunmaması	

2.7.3. Laboratuvar tanısı

İnvaziv aspergilloz tanısında standart yaklaşım mantarın dokudan izolasyonu ve kültür ve/veya mikroskopi ile mantar varlığının gösterilmesidir. Ancak doku örneği alınmasında yaşanan zorluklar ve kültür işlemlerinin uzun sürmesi tanıda serolojik ve moleküler yöntemlerin öncelikli olarak tercih edilmesine neden olmaktadır (74).

2.7.3.1. Mikroskopik inceleme

Hızlı tanıya olanak vermekle birlikte duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça değişkendir (75).

2.7.3.1.1. Nativ preperat hazırlanması

Mantar kültürü için gönderilen tüm örnekler direkt mikroskopik incelemenin yapılması önerilmektedir. Nativ preperatlar direkt olarak veya örneğin %10'luk potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi içinde bekletilmesiyle hazırlanır. Direkt mikroskopik inceleme, klinisyene yol göstermesi ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle avantaj sağlarken duyarlılık ve özgüllük oranlarının düşük olması dezavantaj yaratır. Mikroskopik incelemenin kültür ile korele edilmesi önerilmektedir (7, 15).

2.7.3.1.2. Laktofenol pamuk mavisi ile inceleme

Laktofenol pamuk mavisi kültür üremelerinin selofan bant ile incelenmesinde veya ıslak preperat hazırlanmasında kullanılmaktadır. Laktik asit, fenol ve pamuk mavisinden oluşmaktadır. Laktik asit mantar yapısının korunmasına, fenol ise canlı mikroorganizmaların ölmesine yardımcı olmaktadır. Pamuk mavisi ise mantar

duvarındaki kitin ile etkileşerek mantar hif ve sporlarının boyanmasını sağlamaktadır (76).

2.7.3.1.3. Floresan boyalar ile boyama

Calcofluor White, Uvitex 2B ve Blancophor gibi floresan boyalar hücre duvarındaki kitin ile etkileşerek mantarın boyanmasını sağlarlar. Floresan boyalar klinik örneklerin veya histolojik kesitlerin boyanmasında kullanılırlar. *Aspergillus*'a spesifik olmamalarına rağmen duyarlılıkları yüksek bulunmuştur. Mantarların hızlı tanısına olanak sağlamakla birlikte floresan mikroskobuna gereksinim duymaları dezavantaj yaratmaktadır (6).

2.7.3.2. Kültür

Mikroskobik incelemelerden sonra etkeni izole etmek için klinik örnekler çeşitli besiyerlerine ekilmelidir. Etkenin izolasyonu tür tayininin yapılması ve antifungal duyarlılık testlerinin çalışılması için önem arz etmektedir (77).

Kan, BOS, biyopsi materyalleri ve solunum yolu örnekleri gibi çok çeşitli klinik materyaller kültür için gönderilebilir. İnvaziv aspergillozun kan kültüründe nadiren pozitifliğe neden olduğu bilinmektedir. Kan kültüründe *Aspergillus* üremesi sıklıkla kontaminasyon olarak değerlendirilse de *A.terreus*'un kan kültüründe üremesi anlamlı kabul edilmektedir (9). Pozitif kültür üremelerinin her zaman invaziv hastalığı göstermediğini akılda tutmak gerekir. Solunum yollarında *Aspergillus* kolonizasyonu veya gönderilen klinik örneğin kontaminasyonu yalancı pozitifliklere neden olabilmektedir (78).

Aspergillus türleri kanlı ve çukulatamsı agar gibi standart kültür ortamlarında rahatlıkla üretilbilse de malt ekstrat agar (MEA), mısır unlu agar, Sabouraud dekstroz agar (SDA), patates dekstroz agar (PDA), inhibitör mould agar, Czapek-Dox agar ve beyin kalp infüzyon agar (BHI) gibi özel besiyerlerini kullanmak gerekebilir. *Aspergillus* üremelerinde tür komplekslerinin tanımlanmasında patates dekstroz agar, malt ekstrakt veya Czapek-Dox agar kullanılması önerilmektedir. Floralı bölge örneklerinde olası bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla kloramfenikol ve gentamisin ilaveli Sabouraud agar tercih edilmelidir. Sikloheksimid içeren besiyerlerinin *Aspergillus* üremesini inhibe edebileceği akılda tutulmalıdır (6, 15, 77).

Ekim yapılan kültürler aerobik koşullarda 30 ve 35°C’de inkübe edilmelidir. Başlangıç inkübasyonunun 30 °C yerine 35-37°C’lerde yapılması bazı *Aspergillus* türlerinin büyümesini hızlandırabilir. 3-5 gün içinde beyaz dış marja sahip koloni üremeleri *Aspergillus* kolonilerini düşündürmelidir. Erken koloniler pamuğumsu görünümde olup konidyum üretildikçe granüler hal alırlar. SDA besiyerinde karakteristik beyaz, sarı, gri-yeşil, kahverengi ve siyah renkli koloni görüntüleri ortaya çıkmaktadır. Sporulasyonu arttırmak amacıyla malt ekstrat, patates dekstroz veya inhibitör mould agar kullanılabilir (15, 79).

Kültürde üreyen koloninin tanımlanması makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmesi ile mümkündür. Koloni rengi, konidyum şekil ve büyüklüğü, konidyum rengi, konidyofor ve konidyogenez tür tanımlanmasında kullanılan özelliklerdir. Küfün 50°C’de üremesi yani termotolerans testi *A.fumigatus* tanımlanmasında yol göstericidir (6, 9).

2.7.3.3. Histopatolojik inceleme

İnvaziv aspergillozun kesin tanısı doku biyopsisinde invazyon yapmış hiflerin gösterilmesi ve *Aspergillus* için pozitif kültür varlığında konmaktadır (8). Hifal elemanlar ve morfoloji Gomori metanamin gümüş boyası (GMS) ve Periyodik asit-Schiff (PAS) gibi boyalarla rahatlıkla gösterilebilir. GMS'nin kontrast oluşturarak hif yapılarını belirginleştirmesi PAS boyasına karşı üstünlüğe yol açsa da hyalen mantarlarla dematasyöz mantarları birbirinden ayırt edememesi dezavantaj yaratmaktadır (6). *Aspergillus* hyalen, septalı, dikotom dallanma gösteren 3-6 µm genişliğinde hiflere sahiptir. Bu özellikler dik açılı dallanma gösteren, geniş hiflere sahip *Zygomycetes*'lerden ayrımını sağlarken *Fusarium*, *Scedosporium* (*Pseudallescheria*) ve *Paecilomyces* gibi hyalen hiflere sahip mantarlarla benzer histopatolojik görünümde olabileceği akılda tutulmalıdır (7, 8, 15).

2.7.3.4. Serolojik tanı yöntemleri

Mantara ait çeşitli antijenlerin tespitine yönelik kullanılan testlerdir. Yüksek riskli hasta grubunda invaziv aspergillozun hızlı tanısı ve antifungal tedavinin erken başlanmasında önemli bir role sahiptirler.

2.7.3.4.1. Galaktomannan antijen aranması

Galaktomannan, β -(1-5) bağlı galaktofuranoz yan zincirlere sahip doğrusal bir mannoz omurgadan oluşan ve *Aspergillus* türlerinin hifal büyüme dönemlerinde dokulara salınan polisakkarit yapıda duvar antijenidir. Galaktomannan antijeni, Stynen ve arkadaşlarının geliştirdiği sandviç EIA yöntemi ile serum ve çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilmektedir. Sandviç EIA'da kullanılan rat monoklonal EB-

A2 antikorları galaktomannan molekülündeki β -(1-5) galaktofuranoz yan zincirlerini tanımaktadır (75, 80). Sandviç EIA'nın saptayabildiği galaktomannan alt sınırı 1 ng/mL'dir. 1990'ların ortalarından beri Avrupa'da ticari olarak kullanılan Platelia® *Aspergillus* antijen testi 2003 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanarak invaziv aspergilloz tanısında rutin kullanıma girmiştir (81).

Sandviç EIA test sonuçları galaktomannan indeksi (GMİ) ya da optik dansite indeksi (ODİ) olarak rapor edilmektedir. Serum örnekleri için 1,5, 1, 0,7 ve 0,5 ODİ gibi çeşitli eşik değerleri kullanılsa da FDA tarafından pozitif eşik değer 0,5 ODİ olarak belirlenmiştir (5, 81).

Galaktomannan salınım kinetiğinin değişken olması nedeniyle yüksek riskli hastaların 3-4 gün arayla haftada iki kez taranması önerilmektedir. EORTC/MSG'nin 2002 yılında yayınladığı konsensusta ardışık iki kan örneğinde pozitiflik görülmesi, 2008 yılında yayınlanan güncellemede ise tek kan örneğinde pozitiflik görülmesi anlamlı kabul edilmiştir (5, 78). ESCMID-ECMM-ERS'nin yayınladığı 2017 kılavuzu tanısal doğruluk oranlarını arttırmak adına ardışık iki kan örneğinde pozitiflik görülmesini önermiştir (6).

Galaktomannan testinin duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu durum altta yatan hastalıklar, hastalardan alınan serum sayıları, küf etkili profilaksi veya antifungal tedavi alınması, nötropeni durumu ve *Aspergillus*'a karşı oluşmuş antikor varlığı gibi birçok faktör ile ilişkilendirilmiştir (6, 80).

BAL sıvısında antijen aranması yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına sahip olmakla birlikte hastalık için kesinleştirilmiş eşik değeri yoktur. Yapılan çalışmalara göre eşik değerinin 0,5 ile 1 arasında tutulması 1 alınmasına göre daha iyi performans sergilemiştir (6). Non-nötropenik hastalarda galaktomannan antijeninin kandan hızla uzaklaştırılması duyarlılığın düşmesine ve serum örneklerinde yalancı negatifliğin görülmesine neden olmaktadır. Bu hastalarda BAL sıvısında galaktomannan antijeni bakılması duyarlılığı arttırmaktadır (82, 83).

Galaktomannan testi *Penicillium* ve *Bifidobacterium* türleri ile çapraz reaksiyonlar verebilir. *Bifidobacterium* ile oluşan çapraz reaksiyonlar yenidoğan ve çocuklarda sık görülen yanlış pozitifliklerle ilişkilendirilmiştir. *Penicillium*'dan üretilen antibiyotikler (amoksisilin, piperasilin tazobaktam) ve bronkoskopi sırasında kullanılan elektrolit solüsyonu Plasmalyte® ile yanlış pozitif sonuçların görülebileceği bildirilmiştir (84-87).

2.7.3.4.2. Beta gluklan antijen aranması

(1,3)- β -D-glukan (BDG) birçok patojen mantar türünün duvar yapısında bulunan non-immünojenik, suda çözünabilir polisakkarit yapıda bir antijendir. *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Acremonium* ve *Pneumocystis jirovecii*'nin neden olduğu invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. (1,3)- β -D-glukan içermeyen *Zygomycetes* ve kapsül varlığı nedeniyle kana salınım gerçekleşmeyen *Cryptococcus* türleri ile olan enfeksiyonlarda antijen tespiti yapılamamaktadır (88).

(1,3)- β -D-glukanın kanda tespiti, atnalı yengeçleri (horseshoe crab) olarak bilinen *Limulus polyphemus* ve *Tachypleus tridentatus* amebositlerinden elde edilen faktör G'nin BDG tarafından aktive edilerek koagülasyon kaskadını başlatması ve açığa çıkan kromojenik pNA'nın kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanan limulus lizat testi ile olmaktadır (89, 90).

(1,3)- β -D-glukan testi, 2008 yılında yayınlanan EORTC/MSG revizyonu ile invaziv mantar enfeksiyonları tanı kriterleri arasındaki yerini almıştır. (1,3)- β -D-glukanın *Aspergillus*'a spesifik olmaması invaziv aspergilloz tanısındaki yerini sınırlamaktadır (5, 6). 28 makalenin incelendiği bir metaanaliz çalışmasında testin duyarlılığı %78, özgüllüğü ise %81 bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük kullanılan kite ve belirlenen eşik değerine göre değişkenlik göstermektedir. (1,3)- β -D-glukanın panfungal bir biyobelirteç olması pozitif sonuçların başka testlerle doğrulanmasını gerektirmektedir (91, 92).

2.7.3.4.3. *Aspergillus* glikoprotein yapıda antijen aranması

Aktif büyüme dönemlerinde *Aspergillus* tarafından dış ortama salınan glikoprotein yapılı α 1,3 ve α 1,6 mannoproteinler, fare JF5 monoklonal antikorları (MAb JF5) kullanılarak immünokromatografik lateral akım testi (LFD) ile tespit edilebilmektedir. Test öncesi serum örnekleri bir ön hazırlık gerektirirken BAL örneklerinde buna gerek yoktur. 15 dakika içinde sonuç alınması hızlı tanıya olanak verir. Hematolojik kanserli hastalarda yapılan iki performans çalışmasında serum örneklerinde testin duyarlılığı %40 ve %81,8 özgüllüğü ise %86,8 ve %98 bulunmuştur. *Paecilomyces variotii* ve bazı *Penicillium* türleri ile çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir (93-96).

2.7.3.5. Moleküler tanı yöntemleri

Moleküler yöntemler, mantar DNA'sını saptayarak nötropenik ve non-nötropenik hastalarda enfeksiyonun erken tespitine olanak veren hızlı tanı testleridir. Moleküler testler konak immün durumundan bağımsız olma, tür tayini yapabilme, ilaç direncini saptama gibi avantajlar sunarken yöntemin standardize olmaması dezavantaj yaratmaktadır. Bu durum PCR'ın EORTC/MSG invaziv mantar enfeksiyonları tanı kriterleri arasına girmesine engel olsa da invaziv aspergilloz tanısında sıklıkla başvurulanan bir yöntem olduğu bilinmektedir. Yüksek riskli hematolojik maligniteli hastaların, galaktomannan ve PCR kombinasyonu ile taranması erken tanı ve yüksek duyarlılık oranları ile ilişkili bulunmuştur (6). EAPCRI'nın (Avrupa *Aspergillus* PCR Girişimi) PCR metodolojisini standardize etmeye yönelik çalışmaları devam etmektedir.

Moleküler yöntemler tam kan, serum, BAL sıvısı, balgam ve doku örnekleri gibi çok çeşitli klinik örneklerden çalışılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada serum ve tam kan örneklerinin duyarlılıkları arasında önemli bir fark görülmemiş ancak tam kan örneklerinde serum örneklerine göre daha erken pozitiflik saptanmıştır. Bunun yanında serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapmanın tam kana göre daha kolay olduğu belirtilmiştir (97).

Kan örneklerinde PCR performansını değerlendiren bir metaanalizde tek kan örneğinde duyarlılık %88, özgüllük %75 bulunmuş, ardışık kan örneklerinde duyarlılığın %75'e düştüğü, özgüllüğün ise %87'ye yükseldiği görülmüştür (98). BAL örneklerinde PCR testinin tanısal doğruluğunu değerlendiren bir metaanalize göre ise kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İPA hastalarında PCR testinin duyarlılık

ve özgüllüğü sırasıyla %90,2 ve %96,4 bulunmuştur (99). BAL örneklerindeki yüksek duyarlılık oranları yalancı pozitiflikleri de beraberinde getirmektedir.

2.8. Tedavi

İnvaziv aspergilloz immün sistemi baskılanmış hastalarda kötü klinik gidiş ve %75'in üzerinde mortalite oranları ile ilişkilidir. Bu hastalarda antifungal tedavinin erken başlaması mortalite oranlarını düşürmek adına önem arz etmektedir (8).

İnvaziv aspergillozda antifungal tedavi yaklaşımları; klinik, radyolojik, mikolojik ve/veya histopatolojik olarak pozitif bulunan hastalara uygulanan antifungal tedavi **direkt terapi**, yüksek riskli hastalarda mikolojik kanıt olmadan klinik ve radyolojik bulgulara göre antifungal tedavi başlanması **preemptif tedavi**, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine rağmen ateş yanıtı alınamayan febril nötropenik hastalarda antifungal kullanımı **ampirik tedavi**, yüksek riskli hastalara hastalığın önlenmesine yönelik verilen antifungal tedavi ise **profilaksi** olarak adlandırılmaktadır (2).

Antifungal ajanlara direnç *Aspergillus* enfeksiyonlarında bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. *Aspergillus* türleri polyenlere intrinsik, azollere intrinsik veya ekstrinsik dirençli olabilir. Azollere karşı direnç sıklıkla *A.fumigatus*'da görülmektedir. Ayrıca *A.terreus* ile olan enfeksiyonlarda amfoterisin B tedavisinden kaçınmak gerekir (6).

İnvaziv aspergillozda itrakonazol, posakonazol, isavukonazol ve vorikonazol gibi azoller; kaspofungin ve mikafungin gibi ekinokandinler; lipozomal amfoterisin B gibi polyen grubu ilaçlar tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (2). İnvaziv

aspergillozdan şüphelenildiğinde tanının kesinleşmesi beklenmeden antifungal tedavi başlanmalıdır. Tedavi başarısı tedavinin ne kadar erken başlandığı ile yakın ilişkilidir (4).

Risk altındaki hastalarda profilakside ilk tercih ilaç posakonazol, ikinci ise vorikonazoldür. İnvaziv aspergilloz tedavisinde birinci seçenek ilaç sağkalım oranlarının daha yüksek olduğu bilinen vorikonazoldür. Oral ve parenteral formlarının bulunması tedavide avantaj sağlamaktadır. İnvaziv aspergilloz tedavisinde ikinci seçenek olarak lipozomal amfoterisin B önerilmektedir (4).

Bu çalışmanın amacı; invaziv pulmoner aspergilloz şüphesi olan hastalarda iki farklı firma tarafından üretilen galaktomannan ve bir firma tarafından üretilen beta glukan antijen testlerinin tanısal duyarlılıklarını karşılaştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 19.01.2017 tarihli 01 sayılı karar ile onaylanmıştır. Tüm çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmamıza Aralık 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kemik iliği transplantasyon ünitesi, hematoloji, iç hastalıkları ve göğüs hastalıkları servislerinde invaziv aspergilloz şüphesi ile takip edilen 18 yaşından büyük 62 hasta dahil edilmiştir.

Araştırmamıza hematolojik malignitesi olan, kemik iliği transplantasyonu yapılmış, nötropenik, solid organ kanserli veya kronik hastalığı olup uzun süredir immünsupresif ilaç kullanımı olan hastalar dahil edilmiştir. Hasta serum ve BAL sıvısı örneklerinde *Aspergillus* galaktomannan ve beta glukan antijenleri aranmıştır.

Hastaların klinik sınıflandırması EORTC kriterlerine göre yapılmıştır. Buna göre hastalar ‘kanıtlanmış’ (proven), ‘yüksek olasılıklı’ (probable) ve ‘düşük olasılıklı’ (possible) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. EORTC kriterlerini karşılamayan hastalar ise ‘kontrol grubunu’ oluşturmuştur. Hasta grupları tanımlanırken mikolojik kriter olarak sitoloji, kültür ve FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi kullanılmıştır. Platelia™ *Aspergillus* antijen testi ile pozitif sonuç alınıp klinik ve radyolojik olarak uyumsuz olan sonuçlar çalışmadan dışlanmıştır. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri yüksek

olasılıklı İPA ve kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Ek olarak test sonuçları FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait yaş, cinsiyet, altta yatan hastalıklar, kök hücre nakli varlığı, allojeneik nakilli hastalarda GVHD gelişip gelişmediği, immünsupresif ilaç kullanımı, profilaktik küf etkili antifungal alıp almadığı, antibiyotik ve antifungal ilaç kullanımları, laboratuvar bulguları, kültür üremeleri ve görüntüleme sonuçları demografik veri olarak kaydedilmiştir.

3.2. Örneklerin Toplanması

62 hastaya ait 139 kan ve 9 BAL sıvısı örneğinin gluklan içermeyen tüpler içerisinde mikoloji laboratuvarına ulaştırılması sağlanmıştır. Kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Gluklan içermeyen ependorflara alınan serum ve BAL sıvısı örnekleri GM ve BDG çalışılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

3.3.1. Kullanılan cihazlar

- -80°C’lik derin dondurucu (New Brunswick Scientific, ABD)
- +4°C’lik soğutucu (Arçelik, Türkiye)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter, ABD)
- Vorteks (Boeco, Almanya)
- Isı bloğu (Boeco, Almanya)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Mikropipet seti (Isotherm, Türkiye)

- Mikroplak okuyucu (Das, İtalya)
- Kinetik mikroplak okuyucu (BioTek, ABD)

3.3.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Platelia™ *Aspergillus* Ag kiti (Bio-Rad, Fransa)
- Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan kiti (Dynamiker, Çin)
- Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan kiti (Dynamiker, Çin)
- Steril pipet uçları (Labcon, ABD)
- Glukan free tüpler (Dynamiker, Çin)
- Glukan free pipet uçları (Dynamiker, Çin)

3.4. Platelia™ *Aspergillus* Ag Testi

3.4.1. Test prensibi

Platelia™ *Aspergillus* Ag testi serum ve BAL sıvısı örneklerinde *Aspergillus* galaktomannan antijeni aranmasında kullanılan sandviç EIA yöntemidir. Mikroplak kuyucukları galaktomannan yapısındaki $\beta(1,5)$ galaktofuranozu tanıyan sıçan monoklonal (IgM) EB-A2 antikorları ile kaplıdır. Monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara eş zamanlı konjugat ve serum/BAL sıvısı örneği konulur. Konjugat, peroksidaz bağlı monoklonal antikorlardır. Galaktomannan antijeni varlığında monoklonal antikor-galaktomannan antijeni-peroksidaz bağlı monoklonal antikor birleşerek kompleks oluşturur. Yıkama basamağı ile bağlı olmayan moleküller uzaklaştırılır. TMB solüsyonu eklenmesiyle mAb-Ag-mAb kompleksi varlığında enzimatik reaksiyon gerçekleşerek mavi renk oluşumu gözlenir. Sülfirik asit eklenerek enzimatik reaksiyon durdurulur. Sülfirik asit ilavesi ile kuyucuklardaki

mavi renk sarı renge dönüşür. Kuyucuk absorbansları 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboylarında spektrofotometrede okutulur.

3.4.2. Testin uygulanışı

1. Kontrol ve serum/BAL sıvısı örneklerinden 300'er µL alınarak 1.5 mL'lik ependorflara konulmuştur.
2. Üzerlerine 100 µL sample treatment solüsyon eklenmiştir.
3. Vorteks yapılarak 120 °C'de 6 dakika ısıtıcı bloğa konulmuştur.
4. Isıtıcı bloktan çıkartılan ependorflar 10,000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar EIA basamağında kullanılmak üzere ayrılmıştır.
5. Yıkama solüsyonu hazırlanmıştır.
6. Üretici firma önerileri doğrultusunda bir kuyucuk negatif kontrol, iki kuyucuk cut-off kontrol ve bir kuyucuk pozitif kontrol olarak belirlenmiştir.
7. 50 µL konjugat kuyucuklara dağıtılmıştır. Kontrol ve serum/BAL sıvısı süpernatantlarından 50 µL alınarak konjugat içeren kuyucuklara eklenmiştir.
8. Mikroplak yapışkan film ile kaplanarak 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile beş kez yıkama yapılmıştır.
10. Hızlı bir şekilde her kuyucuğa 200 µL kromojen TMB solüsyonu eklenmiştir.
11. Mikroplak karanlık bir alana konularak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
12. Süre sonunda her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklenmiştir.
13. Mikroplak optik okuyucuda 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboyunda okutulmuştur.

3.4.3. Sonuçların yorumlanması

1. Ortalama cut-off kontrol değeri, cut-off kontrol serum optik dansiteleri toplamının ikiye bölünmesi ile bulunmuştur.
2. Testin geçerli sayılabilmesi için şu kriterler kontrol edilmiştir.

$$0.3 \leq \text{Her bir cut-off kontrol serum OD} \leq 0.8$$

$$\text{Pozitif kontrol indeks} = \frac{\text{Pozitif kontrol OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}} > 1,5$$

$$\text{Negatif kontrol indeks} = \frac{\text{Negatif kontrol OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}} < 0,4$$

3. Her bir serum için indeks hesaplanmıştır:

$$\text{İndeks} = \frac{\text{Örnek OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}}$$

Serum ve BAL sıvısı için;

İndeks ≥ 0.5 olması pozitif sonuç kabul edilmiştir.

İndeks ≤ 0.5 olması negatif sonuç kabul edilmiştir.

3.5. Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan Testi

3.5.1. Test prensibi

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi serum ve BAL sıvısı örneklerinde *Aspergillus* galaktomannan antijeni aranmasında kullanılan sandviç ELISA yöntemidir. Galaktomannan antikorları ile kaplı kuyucuklara serum/BAL sıvısı örnekleri konularak mikropalak inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara konjugat eklenir. Konjugat, peroksidaz bağlı galaktomannan antikorlarıdır. Galaktomannan antijeni varlığında galaktomannan antikoru-

galaktomannan antijeni-peroksidaz bağlı galaktomannan antikoruna birleşerek kompleks oluşturur. Yıkama basamağı ile bağlı olmayan moleküller uzaklaştırılır. TMB solüsyonu eklenmesiyle Ab-Ag-Ab kompleksi varlığında enzimatik reaksiyon gerçekleşerek mavi renk oluşumu gözlenir. Sülfirik asit eklenerek enzimatik reaksiyon durdurulur. Sülfirik asit ilavesi ile kuyucuklardaki mavi renk sarı renge dönüşür. Kuyucuk absorbansları 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalga boylarında spektrofotometrede ölçülür.

3.5.2. Testin uygulanışı

1. Kontrol ve serum/BAL sıvısı örneklerinden 300'er µL alınarak 1.5 mL'lik ependorflara konulmuştur.
2. Üzerlerine 100 µL sample treatment solüsyonu eklenerek 10 saniye vorteks yapılmıştır.
3. 10,000rpm'da 5 saniye santrifüj edilen ependorflar 100°C'de 6 dakika ısıtıcı blokta bekletilmiştir.
4. Isıtıcı bloktan çıkarılan ependorflar 10,000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 100 µL süpernatant ELISA basamağında kullanılmak üzere ayrılmıştır.
5. Yıkama solüsyonu hazırlanmıştır.
6. Üretici firma önerileri doğrultusunda bir kuyucuk negatif kontrol, iki kuyucuk cut-off kontrol ve bir kuyucuk pozitif kontrol olarak belirlenmiştir.
7. Kontrol ve serum/BAL sıvısı süpernatantlarından 100 µL alınarak kuyucuklara eklenmiştir.
8. Mikroplak yapışkan film ile kaplanarak 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

9. Süre sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile bir kez yıkama yapılmıştır.
10. Her kuyucuğa 100 µL konjugat eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
11. Süre sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile üç kez yıkama yapılmıştır.
12. Her kuyucuğa 100 µL TMB solüsyonu eklenmiştir.
13. Mikroplak karanlık bir alanda 37°C’de 25 dakika inkübe edilmiştir.
14. Süre sonunda her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenmiştir.
15. Mikroplak optik okuyucuda 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboyunda okutulmuştur.

3.5.3. Sonuçların yorumlanması

1. Ortalama cut-off kontrol değeri, cut-off kontrol serum optik dansiteleri toplamının ikiye bölünmesi ile bulunmuştur.
2. Testin geçerli sayılabilmesi için şu kriterler kontrol edilmiştir.

$$\text{Pozitif kontrol indeks} = \frac{\text{Pozitif kontrol OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}} > 1,5$$

$$\text{Negatif kontrol indeks} = \frac{\text{Negatif kontrol OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}} < 0,4$$

3. Her bir serum için indeks hesaplanmıştır.

$$\text{İndeks} = \frac{\text{Örnek OD}}{\text{Ortalama cut - off kontrol OD}}$$

Serum örneklerinde indeks $\geq$ 0.5 olması pozitif sonuç kabul edilmiştir.

BAL sıvısı örneklerinde indeks $\geq$ 1.0 olması pozitif sonuç kabul edilmiştir.

Serum örneklerinde indeks $<$ 0.5 olması negatif sonuç kabul edilmiştir.

BAL sıvısı örneklerinde indeks<1.0 olması negatif sonuç kabul edilmiştir.

3.6. Dynamiker Fungus (1,3)- β -D-Glukan Testi

3.6.1. Test prensibi

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan test prensibi serum (1-3)- β -D-Glukan düzeylerinin limulus lizat yöntemi ile kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Klinik örnekte (1-3)- β -D-Glukanın bulunması ana reaktif içindeki Faktör G'nin aktive Faktör G'ye çevrilmesine neden olmaktadır. Aktive Faktör G'nin pıhtılaşma enzimini aktifleştirmesi ile substrat parçalanarak kromojenik pNA açığa çıkmaktadır. Kromojenik pNA tarafından oluşturulan absorbans spektrofotometrede 405/490 nm çift dalgaboyunda kinetik olarak ölçülür.

3.6.2. Testin uygulanışı

1. Kit içerisinden çıkan standart, 1.5 mL dilüent ile çözündürülerek Standart A elde edilmiş, 1 dakika vorteks yapılmıştır.
2. Standart A'dan seri dilüsyonlar yapılarak Standart B, C, D ve E solüsyonları hazırlanmıştır.
3. Standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan A, B, C, D, E solüsyonlarının final konsantrasyonları sırasıyla 600 pg/mL, 300 pg/mL, 150 pg/mL, 75 pg/mL ve 37,5 pg/mL olmuştur.
4. Kontrol içerisine 1.5 mL dilüent eklenerek 1 dakika vorteks yapılmıştır.
5. Treatment Solüsyon A ve B 1:1 oranında karıştırılarak pre-treatment solüsyon elde edilmiştir.
6. Bir kuyucuğa 60 μ L dilüent konularak negatif kontrol oluşturulmuştur.

7. Kuyucuklara 60 µL Solüsyon A, B, C, D ve E konularak standartlar oluşturulmuştur.
8. Kuyucuklara kontrol ve hasta serumlarından 20'şer µL konulmuştur.
9. Kontrol ve hasta serumları üzerine 40 µL pre-treatment solüsyonu eklenmiştir.
10. Mikroplak 5-10 saniye sallanarak 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
11. Ana reaktif üzerine önce 1.3 mL sulandırma solüsyonu daha sonra 1.3 mL dilüent eklenerek ters düz etmek suretiyle karıştırılmıştır.
12. 10 dakikalık inkübasyon periyodundan sonra 100'er µL ana reaktif tüm kuyucuklara dağıtılmıştır.
13. Plak 5-10 saniye sallanarak kinetik okuma yapabilen optik okuyucuda 37°C'de çift dalgaboyunda (405 ve 490 nm) 40 dakika boyunca okuma yapılmıştır.

3.6.3. Sonuçların yorumlanması

1. Testin geçerli sayılabilmesi için şu kriterler kontrol edilmiştir.
Negatif kontrol optik dansitesi Standart E'den düşük olmalıdır.
Korelasyon katsayısının karesi $r^2 > 0,980$ olmalıdır.
2. Sonucun < 70 pg/mL olması negatif
 > 95 pg/mL olması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.
 $70 \text{ pg/mL} \leq \text{sonuç} \leq 95 \text{ pg/mL}$ olması belirsiz sonuç olarak değerlendirilmiştir.
Belirsiz sonuç, muhtemel mantar enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir.

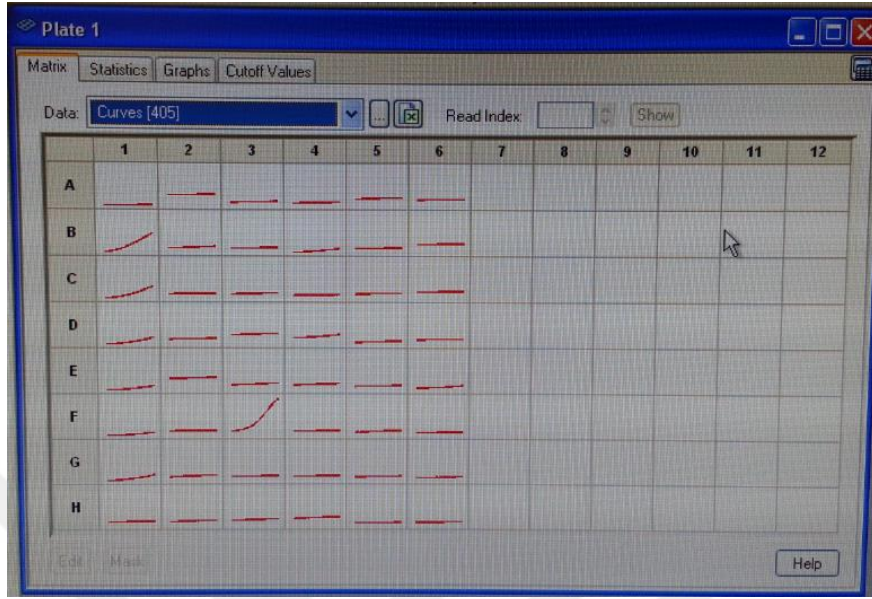


Figure 3. Hasta örneklerinin beta glukon aktivite eğrileri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
B	581,786	<9,375	<9,375	54,146	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
C	338,578	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
D	166,483	<9,375	<9,375	32,313	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
E	61,718	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	13,476	?????	?????	?????	?????	?????	?????
F	24,935	<9,375	>628,1...	<9,375	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
G	117,210	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????
H	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	<9,375	?????	?????	?????	?????	?????	?????

Figure 4. Hasta örneklerinin beta glukon konsantrasyonları

3.7. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Windows için sürüm 23.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler kısmında kategorik değişkenler sayı ve yüzde verilerek, sürekli değişkenler ise ortalama $\pm$ standart

sapma ve ortanca (en küçük-en büyük değer) ile sunulmuştur. Bağımsız grupların kategorik değişkenlerinin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. Galaktomannan ve (1-3)-β-D-Glukan testleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer (PPD, NPD) ve doğruluk (accuracy) hesaplanmıştır. Testler arası uyuma Kappa değeri hesaplanarak bakılmıştır. 0,81-1,00 mükemmel uyum, 0,61-0,80 iyi derecede uyum, 0,41-0,60 orta derecede uyum, 0,21-0,40 düşük orta düzeyde uyum ve 0,00-0,20 düşük veya önemsiz uyum olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Aralık 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerinde invaziv aspergilloz şüphesi ile takip edilen 62 hasta dahil edilmiştir. Hastalara ait 139'u serum, 9'u BAL sıvısı olmak üzere toplam 148 klinik örnek çalışmaya alınmıştır. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif sonuç alınıp, klinik ve ardışık serum örnekleri ile uyumsuz bulunan 3 serum örneği dışlanarak 145 klinik örnek ile çalışmaya devam edilmiştir. Hastalar EORTC/MSG kriterlerine göre 'kanıtlanmış', 'yüksek olasılıklı' ve 'düşük olasılıklı' olarak sınıflandırılmış, bu kriterlere uymayan hastalar kontrol grubunu oluşturmuştur. Buna göre 62 hastanın 32 (%51,6) tanesi İPA olarak tanımlanmış, İPA olmayan 30 (%48,4) hasta ise kontrol grubunu oluşturmuştur. İPA tanısı alan 32 hastanın 11 (%34,4) tanesi yüksek olasılıklı İPA, 21'i (%65,6) ise düşük olasılıklı İPA olarak değerlendirilmiştir. Kanıtlanmış İPA tanısı alan hasta bulunmamaktadır.

4.1. Demografik Veriler

EORTC/MSG kriterlerine göre invaziv pulmoner aspergilloz olarak tanımlanan grup 15 (%46,9) kadın, 17 (%53,1) erkek hastadan oluşmaktadır. Bu grupta yer alan hastaların yaş ortalamaları $56,69 \pm 12,97$ 'dir. Kontrol grubunda ise 10 (%33,3) kadın, 20 (%66,7) erkek hasta bulunurken bu grupta yer alan hastaların yaş ortalamaları $44,87 \pm 13,52$ 'dir. Hasta gruplarına ait yaş ve cinsiyet dağılımı tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Hasta gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı

		İPA grubu	Kontrol grubu
		(n) (%)	(n) (%)
		(n=32)	(n=30)
Cinsiyet	Kadın	15 (46,9)	10 (33,3)
	Erkek	17 (53,1)	20 (66,7)
Yaş	(x±SD)	56,69±12,97	44,87±13,52
	Ortanca	58 (22-77)	45 (18-67)

Çalışmaya alınan 62 hastanın 53 (%85,5) tanesi altta yatan bir hematolojik maligniteye sahipken, geriye kalan 9 hastanın 2'si akciğer kanseri, 1'i hipofizer cushing, 1'i RA ve psöriazis, 1'i RA ve sarkoidoz, 1'i psöriazis, 1'i İAH (interstisyel akciğer hastalığı), 1'i KOAH ve 1'i COP (kriptojenik organize pnömoni) tanıli hastalardan oluşmuştur.

İnvaziv aspergilloz şüphesi olan hastalarda en sık altta yatan hastalığın AML (%25,8) ikinci sırada ALL (%14,5), üçüncü sırada ise MM (%12,9) olduğu görülmüştür. Yüksek olasılıklı İPA grubuna bakıldığında en sık altta yatan hastalığın multipl myelom (%27,2) olduğu gözlenmiştir. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar

Altta yatan hastalık	Yüksek	Düşük	Kontrol grubu (n) (%) (n=30)	Toplam (n) (%) (n=62)
	Olasılıklı İPA (n) (%) (n=11)	Olasılıklı İPA (n) (%) (n=21)		
AML	1 (9,1)	5 (23,8)	10 (33,3)	16 (25,8)
ALL	2 (18,2)	2 (9,5)	5 (16,7)	9 (14,5)
Multipl Myelom	3 (27,2)	2 (9,5)	3 (10)	8 (12,9)
MDS	0 (0)	1 (4,8)	6 (20)	7 (11,3)
Myeloproliferatif hastalıklar*	1 (9,1)	3 (14,3)	1 (3,3)	5 (8,1)
Lenfoma	0 (0)	2 (9,5)	3 (10)	5 (8,1)
KLL	0 (0)	1 (4,8)	2 (6,7)	3 (4,8)
Diğer**	4 (36,4)	5 (23,8)	0 (0)	9 (14,5)

* KML ve primer myelofibroz

** Akciğer kanseri, hipofizer cushing, psöriazis, sarkoidoz, RA, İAH, KOAH, COP

Çalışmaya dahil edilen hastaların 30 (%48,4) tanesi KİT ünitesinde, 21'i (%33,9) hematoloji, 9'u (%14,5) göğüs hastalıkları ve 2'si (%3,2) iç hastalıkları servisinde takip edilmiştir. Hasta gruplarının kliniklere göre dağılımı tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Hasta gruplarının kliniklere göre dağılımı

Klinik	Toplam (n) (%)
KİT	30 (48,4)
Hematoloji	21 (33,9)
Göğüs hastalıkları servisi	9 (14,5)
İç hastalıkları servisi	2 (3,2)
Toplam	62 (100)

Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarına ait risk faktörleri tablo 9'da gösterilmiştir. Yüksek olasılıklı invaziv pulmoner aspergilloz olarak tanımlanan grubun gerçek hasta popülasyonunu daha iyi temsil ettiği düşünülerek bu gruba ait risk faktörleri tablo 10'da ayrıca verilmiştir.

Tablo 9. Hasta gruplarına ait risk faktörlerinin tanımlanması

		İPA grubu (n) (%) (n=32)	Kontrol grubu (n) (%) (n=30)	p değeri
HSCT	Allojeneik	14 (43,8)	23 (76,7)	0,001
	Otolog	1 (3,1)	4 (13,3)	
	Yok	17 (53,1)	3 (10)	
GVHD	Var	9 (28,1)	16 (53,3)	0,078
	Yok	23 (71,9)	14 (46,7)	
Sistemik steroid kullanımı*	Var	21 (65,6)	9 (30)	0,011
	Yok	11 (34,4)	21 (70)	
T hücre baskılayan ilaç kullanımı**	Var	12 (37,5)	5 (16,7)	0,12
	Yok	20 (62,5)	25 (83,3)	
Profilaktik küf etkili AF kullanımı	Var	6 (18,8)	13 (43,3)	0,068
	Yok	26 (81,2)	17 (56,7)	
Nötropeni***	Var	9 (28,1)	3 (10)	0,138
	Yok	23 (71,9)	27 (90)	
Ölüm	Var	14 (43,8)	4 (13,3)	0,018
	Yok	18 (56,2)	26 (86,7)	

* >21 günden uzun süreli 0,3 mg/kg/gün sistemik steroid kullanımı

** Siklosporin veya anti-TNF kullanımı

*** 10 günden uzun süreli <500 nötrofil/mm³ varlığı

Tablo 10. Yüksek olasılıklı İPA hastalarına ait risk faktörlerinin tanımlanması

		Yüksek Olasılıklı İPA (n) (%) (n=11)	Kontrol grubu (n) (%) (n=30)	p değeri
HSCT	Allojeneik	4 (36,4)	23 (76,7)	0,006
	Otolog	1 (9,1)	4 (13,3)	
	Yok	6 (54,5)	3 (10)	
GVHD	Var	3 (27,3)	16 (53,3)	0,259
	Yok	8 (72,7)	14 (46,7)	
Sistemik steroid kullanımı*	Var	10 (90,9)	9 (30)	0,002
	Yok	1 (9,1)	21 (70)	
T hücre baskılayan ilaç kullanımı**	Var	4 (36,4)	5 (16,7)	0,217
	Yok	7 (63,6)	25 (83,3)	
Profilaktik küf etkili AF kullanımı	Var	3 (27,3)	13 (43,3)	0,478
	Yok	8 (72,7)	17 (56,7)	
Nötropeni***	Var	4 (36,4)	3 (10)	0,069
	Yok	7 (63,6)	27 (90)	
Ölüm	Var	8 (72,7)	4 (13,3)	0,001
	Yok	3 (27,3)	26 (86,7)	

* >21 günden uzun süreli 0,3 mg/kg/gün sistemik steroid kullanımı

** Siklosporin veya anti-TNF kullanımı

*** 10 günden uzun süreli <500 nötrofil/mm³ varlığı

4.2. Kültür Sonuçları

İPA olarak tanımlanan 32 hastanın 22 tanesinden (%68,7) kültür işlemleri için örnek gönderilmiştir. Örnek gönderilen 22 hastadan 4'ünün (%18,1) kültüründe *Aspergillus* üremesi tespit edilmiştir. *Aspergillus* üremesi olan hastaların yüksek olasılıklı İPA grubuna dahil olduğu görülmüştür. Yüksek olasılıklı İPA olan hastaların %36,4'ünde kültür pozitifliği tespit edilmiştir. Üreme olan klinik örnekler ETA ve BAL olarak bulunmuştur. Yüksek olasılıklı İPA hastalarının pozitif kültür sayıları tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Kültür örneği gönderilen hastaların sayısı

		İPA grubu	Kontrol grubu	p değeri
		(n) (%)	(n) (%)	
		(n=32)	(n=30)	
Kültür istemi	Var	22 (68,7)	8 (26,7)	0,002
	Yok	10 (31,3)	22 (73,3)	

Tablo 12. Yüksek olasılıklı İPA hastalarının pozitif kültür sayıları

Hasta No	Klinik Örnek	<i>Aspergillus</i>
1	2 ETA, 1 BAL	<i>A.fumigati</i> kompleks
2	BAL	<i>A.flavi</i> kompleks
3	BAL	<i>Aspergillus</i> sp
4	ETA	<i>Aspergillus</i> sp



Figure 5. 2 nolu hastanın BAL örneği

4.3. Galaktomannan Antijen Bulguları

Çalışmamızda İPA şüphesi olan hastalardan 136 (%93,8) serum, 9 (%6,2) BAL sıvısı örneği alınmış, toplam 145 klinik örnekte galaktomannan antijeni aranmıştır. Bu çalışmaya 30 hastadan tek klinik örnek, 32 hastadan ise en az 2 klinik örnek dahil edilmiştir.

Tablo 13. Serolojik testler için gönderilen klinik örnek sayıları

Örnek	Yüksek	Düşük	Kontrol Grubu (n) (%)	Toplam (n) (%)
	Olasılıklı İPA (n) (%)	Olasılıklı İPA (n) (%)		
BAL	4 (14,3)	5 (18,5)	0 (0)	9 (6,2)
Serum	24 (85,7)	22 (81,5)	90 (100)	136 (93,8)

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri yüksek olasılıklı İPA ve kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi yüksek olasılıklı İPA hastalarına ait 28 klinik örneğin 14 tanesinde pozitiflik yakalamıştır. Buna göre tek

serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %50, özgüllüğü %91,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %63,6, negatif prediktif değeri (NPD) %85,4, doğruluk (accuracy) %81,4 bulunmuştur (p<0,001).

Tablo 14. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testi	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Tek serum örneği*	%50	%91,1	%63,6	%85,4	<0,001

*Cut-off serum örneklerinde 0,5, BAL sıvısı örneklerinde 1 alınmıştır

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırılmış, Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif bulunan 18 örneğin 14 tanesinde pozitiflik yakaladığı tespit edilmiştir. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi toplamda 22 örnekte pozitiflik saptamıştır.

Tablo 15. Platelia™ *Aspergillus* Ag ve Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testlerinin karşılaştırılması

		Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testi		p değeri
		Pozitif	Negatif	
Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testi	Pozitif	14	8	<0,001
	Negatif	4	119	

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %77,8, özgüllüğü %93,7, pozitif prediktif değeri (PPD) %63,6, negatif prediktif değeri (NPD) %96,7, doğruluk (accuracy) %91,7 bulunmuştur (p<0,001). İki test arasında iyi derecede uyum gözlenmiştir (kappa:0,653).

Tablo 16. FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testi	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Tek serum örneği*	%77,8	%93,7	%63,6	%96,7	<0,001

*Cut-off serum örneklerinde 0,5, BAL sıvısı örneklerinde 1 alınmıştır

4.4. Beta Glukan Antijen Bulguları

Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testi 145 klinik örnekte test edilmiş, 143 örnekte net sonuç, 2 serum örneğinde ise belirsiz sonuç alınmıştır. Belirsiz sonuç alınan örneklerde test tekrarlanmış ve benzer sonuçlar gözlenmiştir. Üretici firma önerileri doğrultusunda belirsiz sonuçların muhtemel mantar enfeksiyonunu işaret ettiği kabul edilmiştir. Bu hastaların diğer bulguları incelendiğinde birinci hastanın yüksek olasılıklı İPA olarak tanımlandığı ve Platelia™ *Aspergillus* Ag, Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve tekrarlayan Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin pozitif olduğu görülmüştür. İkinci hastanın ise tekrarlayan serum örneğinde

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi pozitif bulunmuş, hastanın hepatosplenik kandidoz tanısı ile takipli olduğu anlaşılmıştır.

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri yüksek olasılıklı İPA ve kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi yüksek olasılıklı İPA hastalarına ait 28 klinik örneğin 11 tanesinde pozitiflik yakalamıştır. Buna göre tek serum örneğinde Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılığı %39,3, özgüllüğü %96,7, pozitif prediktif değeri (PPD) %78,6, negatif prediktif değeri (NPD) %83,7, doğruluk (accuracy) %83 bulunmuştur ($p < 0,001$).

Tablo 17. Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Tek serum örneği*	%39,3	%96,7	%78,6	%83,7	<0,001

*Cut-off >95 pg/mL alınmıştır

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırıldığında Platelia™ *Aspergillus* Ag testinin pozitif bulduğu 18 örneğin 11 tanesinde pozitiflik yakaladığı görülmüştür.

Tablo 18. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin karşılaştırılması

		Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testi		p değeri
		Pozitif	Negatif	
Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testi	Pozitif	11	10	<0,001
	Negatif	7	117	

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin duyarlılığı %61,1, özgüllüğü %92,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %52,4, negatif prediktif değeri (NPD) %94,4, doğruluk (accuracy) %88,3 bulunmuştur (p<0,001). İki test arasında orta derecede uyum gözlenmiştir (kappa:0,497).

Tablo 19. FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testi	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Tek serum örneği*	%61,1	%92,1	%52,4	%94,4	<0,001

*Cut-off >95 pg/mL alınmıştır

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi ile Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testi arasında ise düşük orta düzeyde uyum gözlenmiştir (kappa:0,372).

4.5. Galaktomannan ve Beta Glukan Antijen Testlerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testleri birlikte değerlendirildiğinde yüksek olasılıklı İPA hastalarına ait 28 klinik örneğin 15 tanesinde pozitiflik yakalanmıştır. Buna göre iki test birlikte kullanıldığında duyarlılık %53,6, özgüllük %87,8, pozitif prediktif değer (PPD) %57,7, negatif prediktif değer (NPD) %85,9, doğruluk (accuracy) %79,7 bulunmuştur ($p < 0,001$).

Tablo 20. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testleri birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan + Fungus (1-3)- β -D- Glukan testi	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Tek serum örneği	%53,6	%87,8	%57,7	%85,9	<0,001

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testleri beraber kullanıldığında FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif bulunan 18 örneğin 15 tanesinde pozitiflik saptanmıştır.

Tablo 21. FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin birlikte değerlendirilme sonuçlarının karşılaştırılması

		Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag testi		p değeri
		Pozitif	Negatif	
Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan + Fungus (1-3)-β-D- Glukan testi	Pozitif	15	18	<0,001
	Negatif	3	109	

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin duyarlılığı %83,3, özgüllüğü %85,8, pozitif prediktif değeri (PPD) %45,5, negatif prediktif değeri (NPD) %97,3, doğruluk (accuracy) %85,5 bulunmuştur (p<0,001).

Tablo 22. FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)-β-D-Glukan testlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	p değeri
Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan + Fungus (1-3)-β-D- Glukan testi	%83,3	%85,8	%45,5	%97,3	<0,001

5. TARTIŞMA

Fırsatçı mantar enfeksiyonları, immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (78). İnvaziv aspergilloz yıllık ~250.000 olgu ile bu enfeksiyonlar içinde önemli bir yere sahiptir (100).

İnvaziv aspergilloz gelişiminde altta yatan hastalıklar, komorbid durumlar, hastanın kullandığı ilaçlar, çevre ve nozokomiyal risk faktörleri gibi birçok faktör rol oynamaktadır (101).

Aspergillus türleri immün sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olurlar. Uzun süreli nötropeni varlığı, allojeneik kemik iliği nakli, solid organ transplantasyonu, kalıtsal veya edinsel immün yetmezlikler ve steroid kullanımı başlıca risk faktörlerindendir (4). İnvaziv aspergilloz risk faktörleri iyi tanımlanmış hasta gruplarının başında transplant alıcıları ve hematolojik maligniteli hastalar gelmektedir (101).

İPA en sık hematolojik maligniteli ve allojeneik kök hücre nakilli hastalarda görülmekle birlikte birçok hastalıkta sistemik steroidlerin yaygın olarak kullanılması non-nötropenik hasta grubunda da azımsanmayacak sayıda hastanın risk altında olmasına yol açmaktadır (70).

Lortholary ve arkadaşlarının (102) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada kanıtlanmış İA olan hastaların %78'inde altta yatan bir hematolojik malignite bulunmuş, bunun %34,6'sını akut lösemilerin, %21,4'ünü allojeneik kök hücre naklinin, %21,6'sını kronik lenfoproliferatif hastalıkların oluşturduğu görülmüştür. Altta yatan diğer hastalıklara bakıldığında %8,7'sini solid organ nakli, %4,3'ünü

solid organ kanserleri, %4,6'sını sistemik inflamatuvar hastalıklar ve %2,3'ünü ise kronik solunum yolu hastalıklarına sahip hastaların oluşturduğu görülmüştür.

Çalışmamıza alınan 62 hastanın 53 (%85,5) tanesi altta yatan bir hematolojik maligniteye sahipken, geriye kalan 9 hastanın 2'si akciğer kanseri, 1'i hipofizer cushing, 1'i RA ve psöriazis, 1'i RA ve sarkoidoz, 1'i psöriazis, 1'i İAH (interstisyel akciğer hastalığı), 1'i KOAH ve 1'i COP (kriptojenik organize pnömoni) tanılı hastalardan oluşmuştur. Bu hastalardaki ortak risk faktörünün immünsupresif ilaç kullanımı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda yüksek olasılıklı İPA hastalarının 7 (%63,6) tanesi hematolojik maligniteli, 4 (%36,4) tanesi hematolojik malignitesi bulunmayan non-nötropenik hastalardan oluşmuştur. Cornillet ve arkadaşlarının (103) 6 yıllık verilerine göre İA hastalarının %57'si hematolojik maligniteli, %19'u pulmoner hastalıklara sahip, %11'i solid organ nakli alıcıları, %7'sinin ise sistemik hastalıklara sahip hastalardan oluştuğu görülmüştür.

Çalışmamızda invaziv aspergilloz şüphesi olan hastalarda en sık altta yatan hastalığın AML (%25,8) ikinci sırada ALL (%14,5), üçüncü sırada ise MM (%12,9) olduğu görülmüştür. Bu oranlar Kaya ve arkadaşlarının (104) verilerine benzer bulunmuştur. Yüksek olasılıklı İPA hastalarına bakıldığında ise en sık altta yatan hastalığın MM (%27,2) olduğu görülmüştür. İA tanılı hastalarda en sık altta yatan hematolojik malignitenin AML olduğu bilinmektedir (105). Bununla birlikte İA epidemiyolojisinde MM tanılı hastalardaki artış dikkat çekicidir. Pagano ve arkadaşlarının (106) yaptıkları çok merkezli bir çalışmaya göre kök hücre nakli

alıcılarında AML (%41,7) ve ALL (%22) hastalarını MM (%9,9) hastaları izlemektedir. Pulmoner komplikasyonlara yol açtığı bilinen bortezomib gibi yeni kemoterapi ajanlarının yüksek doz steroidler ile birlikte MM tedavisinde kullanılması İA riskinin artmasına neden olmaktadır (107, 108).

Allojeneik veya otolog kök hücre nakli yapılmış hastalarda yoğun immünsupresif tedavilerin kullanımı invaziv aspergilloz gelişimine zemin hazırlamaktadır. Kök hücre nakli olan hastalarda invaziv aspergilloza yatkınlık oluşturan risk faktörleri arasında altta yatan hematolojik hastalık, uzamış nötropeni varlığı, GVHD gelişip gelişmediği, kortikosteroid kullanımı, profilaksi alıp almadığı ve CMV enfeksiyonu varlığı sayılabilir (101). Nakil sonrası İA gelişme süresinin bazı risk faktörleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Nakil sonrası ilk 40 gün içinde gelişen İA nötropeni ve altta yatan malignite ile, 40 günden sonra gelişen İA ise GVHD, steroid kullanımı ve CMV enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (109).

Kök hücre nakli olan hastalarda invaziv enfeksiyonlara yatkınlık multifaktöriyeldir ve her bir risk faktörünün risk yüzdesini belirlemek zordur (110).

Kaya ve arkadaşlarının (104) hematolojik maligniteli hastalarda yaptıkları çalışmada vaka grubunun %4,6'sı, kontrol grubunun ise %26,4'ü kök hücre nakli yapılmış hastalardan oluşmaktadır. Benzer olarak bu çalışmada yüksek olasılıklı İPA grubunun %45,5'i, kontrol grubunun ise %90'ı kök hücre nakli olan hastalardan oluşmaktadır. Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p=0,006$). Bu çalışmaya göre kök hücre nakli olmak İPA riskini arttırmamaktadır.

Kök hücre nakilli hastaların kontrol grubunda yüksek olasılıklı İPA grubundan fazla olmasının nedeni hastalık gelişiminde rol oynayan risk faktörlerinin bu hastalarda bulunmayışı olabilir. Çalışmamızda kontrol grubunun %53,3'ünde GVHD gelişimi görülmüştür. Bu hastalardaki sistemik steroid (%30) ve T hücre inhibitörü (%16,7) kullanım oranlarının küf etkili antifungal profilaksi (%43,3) alan hasta oranlarına benzer olmasının İPA gelişimini engellediği düşünülmüştür. Bir diğer risk faktörü olan uzamış nötropenin ise kontrol grubunun %10'unda bulunduğu görülmüştür.

GVHD yüksek olasılıklı İPA grubunun %27,3'ünde görülürken kontrol grubunun %53,3'ünde gözlenmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,259$). Çalışmamızda GVHD'nin invaziv aspergilloz gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir. Kontrol grubundaki GVHD'li hasta sayısının yüksek olasılıklı İPA grubundan fazla olması küf etkili profilaksi kullanımı ile ilişkili olabilir.

İnvaziv aspergilloz gelişimi açısından belirgin risk taşıyan iki hasta grubu; kemoterapi ajanlarının indüklediği nötropenik olgular ve organ reddinin önlenmesi veya tedavisinde siklosporin A, steroid gibi immünsupresifleri kullanan hastalardır (111).

İnvaziv mantar enfeksiyonları 10 günden uzun süreli nötropenik (%69) olan hastalarda 10 günden kısa süreli nötropenisi (%31) olanlara göre iki kat fazla görülmektedir (112). Bu çalışmada yüksek olasılıklı İPA olan hastaların %36,4'ü nötropenik bulunmuştur. Nötropenik hasta sayısının yüksek olasılıklı İPA grubunda

kontrol grubuna (%10) oranla daha fazla olduğu görülse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,069$). Çalışmamızda uzamış nötropeni varlığının invaziv aspergilloz ile ilişkisi gösterilememiştir. Bunun nedeni hasta popülasyonumuzun indüksiyon kemoterapisi alan hemotojik maligniteli hastalardan çok GVHD gelişmiş kök hücre nakilli ve hematolojik malignitesi bulunmayan non-nötropenik hastalardan oluşması olabilir.

Yapılan çalışmalarda uzun süreli yüksek doz kortikosteroid kullanımı İA gelişimi ve kötü klinik sonuçlar ile ilişkili bulunmuştur. Kortikosteroidler süre ve doza bağımlı olarak İA riskini arttırmaktadır. O'Donnell ve arkadaşları (113) GVHD gelişmiş allojeneik nakilli hastalarda 0,5-1 mg/kg/gün prednizon kullanımının 0,25 mg/kg/gün prednizon kullanımına göre İA riskini 6 kat arttırdığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda yüksek olasılıklı İPA grubuna ait 10 (%90,9) hastanın 21 günden uzun süreli $\geq 0,3$ mg/kg/gün prednizona eşdeğer sistemik steroid kullandığı saptanmıştır. Bu çalışmaya göre uzun süreli sistemik steroidlerin kullanımı İPA gelişimini arttırmaktadır ($p=0,002$). Risk faktörlerinde steroid kullanımı olmayan bir hastanın ise 10 günden uzun süreli nötropenisi olan AML hastası olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda İPA gelişimindeki en önemli risk faktörünün sistemik steroid kullanımı olduğu görülmüştür. Cornillet ve arkadaşları (103) tarafından yapılan çalışmada İA gelişimindeki en önemli risk faktörünün sistemik steroid kullanımı (%89) olduğu bulunmuş, çalışmamıza benzer olarak hastaların %57'sinin

hematolojik maligniteli, %41'inin ise hematolojik malignitesi bulunmayan non-nötropenik hastalardan oluştuğu görülmüştür.

TNF- α blokörleri ve siklosporin gibi T hücre fonksiyonlarını bozan ilaçlar fırsatçı mantar enfeksiyonlarına zemin hazırlamaktadır (70). Çalışmamızda yüksek olasılıklı İPA grubunun %36,4'ünün, kontrol grubunun ise %16,7'sinin T hücre inhibitörü kullandığı saptanmıştır. İki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,217$). Bu çalışmada T hücre inhibitörü kullanmanın İPA riskini arttırdığı gösterilememiştir.

Kök hücre nakli olan hastalarda invaziv mantar enfeksiyonlarını önleme stratejileri çevresel önlemlere ve antifungal profilaksiye dayanmaktadır. IDSA, uzamış nütropenisi olan yüksek riskli hastalar ile GVHD gelişmiş allojeneik kök hücre nakli olan hastaların İA için profilaksi almasını önermektedir (4). Yapılan birçok çalışmada çeşitli antifungaller flukonazol ile karşılaştırılarak küf enfeksiyonlarını da kapsayacak profilaksi rejiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna göre kılavuzların genel önerisi posakonazol profilaksisi verilmesi yönünde olmuştur (4, 110).

Posakonazolün oral olarak alınması GİS GVHD gelişen ve diyaresi olan hastalarda ilacın düzensiz emilimine neden olmaktadır (110). Bu da profilaksi altındaki hastalarda invaziv aspergilloz gelişimine sebep olmaktadır. Ullmann ve arkadaşlarının (114) immüsupresif tedavi alan GVHD'li hastalarda yaptıkları çalışmada posakonazol profilaksisi altındaki hastaların %2,3'ünde invaziv aspergilloz geliştiği görülmüştür. Bu çalışmada posakonazol profilaksisi altında

olan 3 hastada invaziv aspergilloz geliştiği gözlenmiştir. Hastaların GVHD nedeniyle yoğun immünsupresif tedavi aldıkları görülmüştür. Bir hastanın GİS GVHD nedeniyle takip edildiği, bir diğer hastanın ise tanıdan bir hafta önce antifungal profilaksi almaya başladığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yüksek olasılıklı İPA grubunun %27,3'ü, kontrol grubunun ise %43,3'ü küf etkili antifungal profilaksi almaktadır. Profilaksi alan hastaların oranı kontrol grubunda yüksek olasılıklı İPA hastalarına göre fazla olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,478$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da kontrol grubunda küf etkili antifungal kullanan hasta oranlarının (%43,3), kontrol grubundaki GVHD (%53,3) gelişmiş, sistemik steroid (%30) ve T hücre inhibitörü (%16,7) kullanan hasta oranlarına benzer olduğu görülmüştür.

Kök hücre nakli alıcılarında önde gelen ölüm sebeplerinden biri invaziv mantar enfeksiyonlarıdır. Yüksek riskli hastalarda mortalite oranları konak immün durumu, enfeksiyon bölgesi ve uygulanan tedavi rejimine bağlı olarak %40 ila 90 arasında değişmektedir (115).

İtalya'da yapılan çok merkezli bir çalışmanın verilerine göre allojeneik nakillerin %7,8'inde, otolog nakillerin ise %1,2'sinde invaziv mantar enfeksiyonları gelişmektedir. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının %86'sına küfler yol açmakta, bunun da %94'ü *Aspergillus* türleri ile oluşmaktadır. Yapılan çalışmada *Aspergillus*'a bağlı ölüm oranı %72,1 bulunmuştur (106).

Patterson ve arkadaşlarının (116) yazdığı derlemeye göre *Aspergillus*'a bağlı ölüm oranı %65'tir. Benzer olarak bu çalışmada yüksek olasılıklı İPA grubunda *Aspergillus*'a bağlı ölüm oranı %72,7 olarak saptanmıştır. Bu oran kontrol grubu (%13,3) ile karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,001$). İnvaziv aspergillozda görülen yüksek mortalite oranları bu hastalarda erken tanı ve tedavinin önemini gözler önüne sermektedir.

İnvaziv pulmoner aspergilloz tanısında altın standart yöntem, akciğerlerden alınan biyopsi örneğinin histopatolojik incelemesinde doku hasarı ile birlikte hif yapılarının görülmesi ve/veya steril biyopsi örneğinin kültüründe *Aspergillus* cinsi küf mantarı üremesidir (5). Risk altındaki hasta popülasyonunda pansitopeninin sık görülmesi hastaların tanısında invaziv yöntemlerden çok noninvaziv tanı yöntemlerinin kullanılmasına neden olmaktadır (117).

Kültür işlemleri; tür komplekslerinin tanımlanması, antifungal duyarlılık testlerinin çalışılması, direnç profillerinin belirlenmesi ve epidemiyolojik veri elde etmek adına önemlidir (6). EORTC, klinik ve radyolojik kriter varlığında solunum örneklerinden *Aspergillus* izole edilmesini mikolojik kriter olarak kabul etmektedir (5). Kriterlerin karşılanmadığı hastalarda pozitif kültür üremeleri kolonizasyon lehine değerlendirilmelidir. Kültürde üreme oranları BAL örneği alınan nötroopenik hastalarda dahi %10-58 arasında görülmektedir (75).

Çalışmamızda İPA olarak tanımlanan 32 hastanın 22'sinden (%68,7) kültür işlemleri için örnek gönderilmiştir. Örnek gönderilen 22 hastadan 4'ünün (%18,1) kültüründe *Aspergillus* üremesi tespit edilmiştir. *Aspergillus* üremesi olan

hastaların yüksek olasılıklı İPA grubuna dahil olduğu görülmüştür. Yüksek olasılıklı İPA olan hastaların %36,4'ünde kültür pozitifliği tespit edilmiştir. Üreme olan klinik örnekler ETA ve BAL olarak bulunmuştur.

Galaktomannan, *Aspergillus* türlerinin büyümesi esnasında dokulara salınan polisakkarit yapıda hücre duvar antijenidir. Sandviç EIA'nın 0,5-1 ng/mL galaktomannan seviyelerini tespit edebilmesi risk altındaki hastaların erken tanısında umut verici bir tanı aracı olarak kullanılmasını sağlamıştır (118).

Galaktomannan salınım kinetiğinin değişken olması nedeniyle yüksek riskli hastalar 3-4 gün arayla haftada 2 kez taranmalıdır. Ullmann ve arkadaşlarının (6) yayınladıkları ESCMID kılavuzuna göre yüksek doğruluk oranları için ardışık iki serum örneğinde OD_I>0,5 görülmelidir.

Galaktomannan testi noninvaziv, kolay uygulanabilir bir tanı aracı olmakla birlikte testin duyarlılık ve özgüllük oranları çalışılan hasta popülasyonuna ve merkezlere göre değişkenlik göstermektedir (80, 118). Test performansı oldukça fazla parametreden etkilenmektedir. Bunlardan bazıları altta yatan hastalık, nötropeni varlığı, steroid kullanımı ve antifungal tedavi alıp almadığıdır (119).

Klinik parametrelere ek olarak testte kullanılan eşik değer de testin duyarlılık ve özgüllüğünü etkilemektedir. Eşik değerinin yüksek tutulması özgüllüğü arttırırken duyarlılığı düşürmekte, düşük tutulması ise duyarlılığı arttırırken özgüllüğü düşürmektedir. Marr ve arkadaşlarının (120) hematolojik maligniteli hastalarda yaptıkları çalışmada, kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'da test eşik değeri 1,5 alındığında duyarlılık ve özgüllük %43'e %93 bulunurken eşik değeri

0,5 alındığında duyarlılığın %70'e yükseldiği, özgüllüğün ise %70'e düştüğü görülmüştür.

Çalışmamızda Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin eşik değeri firma önerisi ile serum örneklerinde 0,5, BAL sıvısı örneklerinde ise 1 olarak alınmıştır. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri yüksek olasılıklı İPA ve kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Buna göre tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %50, özgüllüğü %91,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %63,6, negatif prediktif değeri (NPD) %85,4, doğruluk (accuracy) %81,4 bulunmuştur ($p<0,001$).

Xiao ve arkadaşlarının (121) Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan kiti ile yaptıkları retrospektif çalışmada altta yatan hematolojik malignitesi olan kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı invaziv aspergillozlu hastalarda duyarlılık %79,3, özgüllük %83, pozitif prediktif değeri (PPD) %71,9, negatif prediktif değeri (NPD) %88 bulunmuştur. Bu çalışmada duyarlılığın bizim çalışmamıza göre yüksek bulunma nedeninin hasta popülasyonunun sadece hematolojik maligniteli hastalardan oluşması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Non-nötropenik hastalarda duyarlılığın düştüğü bilinmektedir.

İmmün yetmezlikli hastalarda GM testinin tanısal değerini belirlemek amacıyla yapılan bir metaanalizde kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı invaziv aspergillozda Platelia™ *Aspergillus* Ag testinin duyarlılığı %61, özgüllüğü ise %93 bulunmuştur (118).

Benzer bir metaanaliz galaktomannan testinin serum ve BAL örneklerindeki tanısal doğruluğunu belirlemek ve birbiri ile karşılaştırmak için Zou ve arkadaşları (122) tarafından yapılmıştır. Bu metaanalizde kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı invaziv aspergillozda serum örneklerinde duyarlılık %65, özgüllük %95, BAL örneklerinde duyarlılık %85, özgüllük %86 olarak bildirilmiştir. Zou ve arkadaşlarına (122) göre invaziv aspergillozu tespit etmede BAL sıvısı seruma üstün bulunmuştur.

Çalışmamızda Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırılmış, tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %77,8, özgüllüğü %93,7, pozitif prediktif değeri (PPD) %63,6, negatif prediktif değeri (NPD) %96,7, doğruluk (accuracy) %91,7 bulunmuştur ($p < 0,001$). İki test arasında iyi derecede uyum gözlenmiştir (kappa:0,653). Platelia™ *Aspergillus* Ag testinde önerildiği gibi BAL örneklerinin eşik değeri 1 yerine 0,5 alındığında testin duyarlılığı %83,3'e yükselirken, özgüllüğü %92,1'e gerilemiştir.

Yarışmalı EIA formatında hazırlanmış Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan kiti firma tarafından iyileştirilerek bu çalışmada kullandığımız yeni sandviç EIA kiti piyasaya sürülmüştür. Sandviç EIA'da monoklonal antikorların kullanılmaması FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırıldığında performansın düşük kalmasına neden olmaktadır. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi ile yapılmış tek performans çalışması bulunmaktadır. Yeni kitin duyarlılık ve özgüllük oranlarının doğru olarak belirlenebilmesi için geniş hasta serilerinde bakılan iyi tanımlanmış prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Konak nötrofil sayısının galaktomannan testinin duyarlılığını etkilediği bilinmektedir. Bergeron ve arkadaşları (123) invaziv pulmoner aspergillozun nötropenik hastalarda daha çok anjiyoinvazyon ve doku nekrozu ile, steroid kullanan hastalarda ise daha çok inflamasyon ve daha az anjiyoinvazyon ile karakterize olduğunu göstermişlerdir. Bu da nötropenik hastalarda duyarlılığın neden daha yüksek olduğunu açıklamaktadır. Benzer olarak Cordonnier ve arkadaşları (124) serum galaktomannan seviyelerinin, nötrofil sayısının 100'ün altında olduğu hastalarda nötrofil sayısı 100-500 ve 500 üstü olan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada yüksek olasılıklı İPA hastalarında nötropenik dönemde alınan örneklerin %88,9'unda, non-nötropenik dönemde alınan örneklerin ise %31,6'sında galaktomannan pozitifliği görülmüştür. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olup nötropenik hastalarda tanısal gücün daha yüksek olduğunu göstermektedir ($p=0,013$).

GM indeks değerlerinin mantar yükü ile korele olduğu bilinmektedir. Non-nötropenik hastalarda serum örneklerinde alınan negatif veya düşük GM indeksi invaziv aspergillozu ekarte ettirmemelidir. Bu hastalarda BAL sıvısında GM antijeni bakılmasının tanısal değeri daha yüksek bulunmuştur (125). Bu çalışmada yüksek olasılıklı invaziv pulmoner aspergillozu olan non-nötropenik bir hastaya ait serum ve BAL örnekleri eş zamanlı olarak tarafımıza gönderilmiş, hasta örnekleri Platelia™ *Aspergillus* Ag kiti ile çalışıldığında serum ODİ'sinin 0,553, BAL ODİ'sinin >4'ten büyük olduğu, Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan kiti ile çalışıldığında ise serum ODİ'sinin 0,241, BAL ODİ'sinin >4'ten büyük olduğu görülmüştür. Primer enfeksiyon bölgesi ile ilişkili olması nedeniyle BAL

örneklerinde GM antijeni bakılması hem nötropenik hem de non-nötropenik hasta grubunda tanısal değeri yüksek bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (125).

Antifungal profilaksi ve tedavi almanın galaktomannan test duyarlılığını etkilediği bilinmektedir. Becker ve arkadaşları (126) *A.fumigatus* ile immünize ettikleri sıçanları iki gruba ayırarak bir gruba amfoterisin B tedavisi başlarken diğer gruba herhangi bir tedavi vermemişlerdir. Tedavi alan sıçan grubunda daha az doku invazyonu, hemoraji ve hifal büyüme görülmüştür. Tedavi alan sıçanların serum ve doku galaktomannan seviyelerinin tedavi almayan sıçanlara göre oldukça düşük olduğu ve doku galaktomannan seviyelerinin seruma oranla hastalığın daha erken dönemlerinde yükseldiği saptanmıştır. Antifungal tedaviye ek olarak posakonazol profilaksisi almanın da dolaşımdaki GM seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir (127). Profilaksi ve/veya preemtif tedavi alan invaziv aspergillozlu hastalarda galaktomannan testinde pozitiflik saptanmayabileceği akılda tutulmalıdır.

İnvaziv aspergillozun erken tanısında galaktomannan ile birlikte kullanılan bir diğer serolojik yöntem (1,3)- β -D-glukandır. (1,3)- β -D-glukan (BDG) *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri dışında birçok patojen mantar türünün duvar yapısında bulunan non-immünojenik, suda çözünabilir, polisakkarit yapıda antijendir. Panfungal bir biyobelirteç olarak *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Trichosporon* ve *Pneumocystis jirovecii* gibi mantarların neden olduğu invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında kılavuzlardaki yerini almıştır (5, 88).

Kawazu ve arkadaşlarının (128) hematolojik maligniteli hastalarda yaptıkları prospektif çalışmada kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı invaziv aspergillozda (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılık ve özgüllüğü %55 ve %93 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda serum ve BAL örneklerinde Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin pozitif eşik değeri firma önerisi ile 95 kabul edilmiştir. Buna göre yüksek olasılıklı İPA hastalarında tek serum örneğinde Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılığı %39,3, özgüllüğü %96,7, pozitif prediktif değeri (PPD) %78,6, negatif prediktif değeri (NPD) %83,7, doğruluk (accuracy) %83 bulunmuştur ($p<0,001$).

Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin performansını belirlemek amacıyla White ve arkadaşları (129) tarafından hematolojik maligniteli hastalarda yapılan çalışmada yüksek olasılıklı İA'da Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılığı %81, özgüllüğü ise %78,1 bulunmuştur. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile aralarında iyi derecede uyum gözlemlendiği belirtilmiştir (kappa:0,678). Çalışmada özgüllüğün düşük bulunması bazı hasta grupları ile ilişkilendirilmiş, yanlış pozitiflik veren 14 hastadan 9'unun abdominal cerrahi işlem geçirdiği vurgulanmıştır.

Çalışmamızda FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testinin duyarlılığı %61,1, özgüllüğü %92,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %52,4, negatif prediktif değeri (NPD) %94,4, doğruluk (accuracy) %88,3 bulunmuştur ($p<0,001$). Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile aralarında orta derecede uyum gözlenmiştir (kappa:0,497).

Lamoth ve arkadaşları (130) tarafından ECIL-3 konferansı için hazırlanan metaanaliz invaziv mantar enfeksiyonları tanısında (1-3)- β -D-Glukan testlerinin tanısal değerini belirlemeyi amaçlamıştır. Metaanalize 4 farklı kitin kullanıldığı 6 kohort çalışma dahil edilmiştir. Hematolojik malignitesi ve allojeneik kök hücre nakli olan kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı invaziv aspergilloz hastalarında (1-3)- β -D-Glukan testlerinin duyarlılığı %57, özgüllüğü ise %97 bulunmuştur.

Çalışmamızda Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile negatif sonuç alınıp Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi ile pozitif bulunan 10 klinik örnek incelendiğinde; 2 serum örneğinin hepatosplenik kandidozu olan hastaya, 1 BAL sıvısı örneğinin *Pneumocystis* PCR testi pozitif olan hastaya, 2 serum örneğinin ise idrarda *Candida* enfeksiyonu olan hastaya ait olduğu görülmüştür. Geriye kalan 5 örneğe ait herhangi bir enfeksiyon tespit edilememiştir.

Hoenigl ve arkadaşları (131) galaktomannan ve (1-3)- β -D-Glukan test kombinasyonunun İPA tanı duyarlılığını arttırdığı, özgüllüğü ise düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Çalışmamızda Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testleri birlikte kullanıldığında duyarlılık %53,6, özgüllük %87,8, pozitif prediktif değer (PPD) %57,7, negatif prediktif değer (NPD) %85,9, doğruluk (accuracy) %79,7 bulunmuştur ($p < 0,001$). Duyarlılıktaki artışın fazla olmamasının nedeni testler arası uyumun düşüklüğüne bağlanmıştır. Dynamiker firmasına ait *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan kitleri arasında düşük orta düzeyde uyum gözlenmiştir ($\kappa:0,372$).

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testlerinin duyarlılığı %83,3, özgüllüğü %85,8, pozitif prediktif değeri (PPD) %45,5, negatif prediktif değeri (NPD) %97,3, doğruluk (accuracy) %85,5 bulunmuştur ($p<0,001$).

Çalışmamızda Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Fungus (1-3)- β -D-Glukan testlerinin tanısal değeri araştırılmış, sonuçlar FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada testlerin duyarlılığının düşük bulunması nötropenik hasta sayısının az olması, daha çok serum örnekleri ile çalışılması ve hastalara antifungal tedavi başlanmış olması ile ilişkilendirilmiştir. Testlerin FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile uyumuna bakıldığında Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi ile aralarında iyi derecede uyum, Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testi ile aralarında orta derecede uyum gözlenmiştir.

6. SONUÇ

İnvaziv pulmoner aspergilloz yüksek riskli hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. İPA hastalarının erken tanı ve tedavisi yüksek mortalite oranlarını düşürmek adına hayati önem taşır.

İPA en sık hematolojik maligniteli ve allojeneik kök hücre nakilli hastalarda görülmekle birlikte immünsupresif ilaç kullanımı olan non-nötropenik hastalarda da enfeksiyon gelişebilmektedir. Çalışmaya dahil ettiğimiz hastalara ait çeşitli risk faktörleri incelenmiş, İPA gelişimindeki en önemli risk faktörünün steroid kullanımı olduğu görülmüştür.

Mikrobiyolojik tanıda kültür bazlı yöntemlerin duyarlılıkları düşük olup tanıda gecikmelere yol açmaktadır. Klasik konvansiyonel yöntemlere ek olarak galaktomannan ve beta glukan gibi serolojik testlerin kullanılması hızlı ve erken tanıya olanak sağlamaktadır.

Galaktomannan testinin duyarlılık ve özgüllük oranları ile ilgili çok farklı sonuçlar bildirilmektedir. Galaktomannan sonuçlarının oldukça değişken olması, beta glukanın ise mantar enfeksiyonu hakkında kısıtlı bilgi vermesi test sonuçlarının başka tanı testleri ile doğrulanmasını gerektirmektedir.

Çalışmamızda galaktomannan ve beta glukan testlerinin birlikte kullanımı duyarlılık oranlarını arttırmış, özgüllük oranlarını ise düşürmüştür. İPA tanı testlerinin kombine kullanılması erken ve doğru tedavinin başlanması, mortalite oranlarının düşürülmesi ve klinisyene daha çok kanıt sunması açısından önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Misset B, Meersseman W, Cardoso T, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*. 2015;19:7.
2. Drgona L, Khachatryan A, Stephens J, Charbonneau C, Kantecki M, Haider S, et al. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(1):7-21.
3. Paulussen C, Hallsworth JE, Alvarez-Perez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol*. 2017;10(2):296-322.
4. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1-e60.
5. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21.
6. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24 Suppl 1:e1-e38.
7. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essentials of clinical mycology*. Second edition. ed. New York: Springer; 2011. xiii, 553 pages p.
8. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015. 2 volumes p.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 7th Edition ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013. x, 874 pages p.
10. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal infection : diagnosis and management*. 2nd ed. Oxford ; Malden, MA, USA: Blackwell Science; 1997. xxi, 249 p. p.
11. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):447-65.
12. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet*. 2003;362(9398):1828-38.
13. Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*. 2005;105(6):2258-65.
14. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):662-9.
15. Procop GW. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Seventh edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. 1 volume (various pagings) p.
16. Yoshimi A, Miyazawa K, Abe K. Function and Biosynthesis of Cell Wall alpha-1,3-Glucan in Fungi. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4).

17. Paugam A, Sarfati J, Romieu R, Viguiier M, Dupouy-Camet J, Latge JP. Detection of *Aspergillus* galactomannan: Comparison of an enzyme-linked immunoassay and a europium-linked time-resolved fluoroimmunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(10):3079-80.
18. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, et al. Chemical and Immunological Characterization of the Extracellular Galactomannan of *Aspergillus-Fumigatus*. *Infection and Immunity*. 1994;62(12):5424-33.
19. Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun*. 1992;60(6):2237-45.
20. Engel J, Schmalhorst PS, Routier FH. Biosynthesis of the fungal cell wall polysaccharide galactomannan requires intraluminal GDP-mannose. *J Biol Chem*. 2012;287(53):44418-24.
21. Morelle W, Bernard M, Debeaupuis JP, Buitrago M, Tabouret M, Latge JP. Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4(7):1308-16.
22. Klont RR, Mennink-Kersten MASH, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(10):1467-74.
23. Kottom TJ, Hebrink DM, Jenson PE, Gudmundsson G, Limper AH. Evidence for Proinflammatory beta-1,6 Glucans in the *Pneumocystis carinii* Cell Wall. *Infection and Immunity*. 2015;83(7):2816-26.
24. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1 -> 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(12):5957-62.
25. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: Pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;188(2):305-19.
26. Araujo R, Rodrigues AG. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(9):4335-7.
27. Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, Boettner D, Fortwendel J, Panepinto JC, et al. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infection and Immunity*. 2004;72(8):4731-40.
28. Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(4):155-82.
29. Wasylanka JA, Simmer MI, Moore MM. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology*. 2001;147(Pt 4):869-77.
30. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2003;38(2):143-58.
31. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia*. 2014;178(5-6):363-70.

32. Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, et al. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect Immun*. 1997;65(12):5110-7.
33. Bergmann A, Hartmann T, Krappmann S. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Int J Med Microbiol*. 2009;299:18-.
34. Tomee JFC, Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(4):476-84.
35. Kothary MH, Chase T, Macmillan JD. Correlation of Elastase Production by Some Strains of *Aspergillus-Fumigatus* with Ability to Cause Pulmonary Invasive Aspergillosis in Mice. *Infection and Immunity*. 1984;43(1):320-5.
36. Denning DW, Elliott J, Keaney M. Temperature-Dependent Expression of Elastase in *Aspergillus* Species. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1993;31(6):455-8.
37. Raksha, Singh G, Urhekar AD. Virulence Factors Detection in *Aspergillus* Isolates from Clinical and Environmental Samples. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(7):DC13-DC8.
38. Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun*. 1995;63(9):3266-71.
39. Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Waku M, Nishimura K, Miyaji M, et al. Immunosuppressive substances in *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *J Infect Chemother*. 2003;9(2):114-21.
40. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med*. 1996;183(4):1829-40.
41. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun*. 2005;73(1):635-7.
42. Alekseeva L, Huet D, Femenia F, Mouyna I, Abdelouahab M, Cagna A, et al. Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol*. 2009;9:33.
43. Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, Rivollet D, Bieche I, Laurendeau I, et al. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 2):174-9.
44. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun*. 2003;71(2):891-903.
45. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meer A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun*. 2003;71(6):3034-42.
46. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*. 2006;176(6):3717-24.

47. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol*. 2009;182(8):4938-46.
48. Phadke AP, Mehrad B. Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1:S173-6.
49. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219:88-102.
50. Levitz SM, Diamond RD. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* Conidia to killing by neutrophils in vitro. *J Infect Dis*. 1985;152(1):33-42.
51. Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB. Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun*. 2006;74(12):6528-39.
52. Zarembek KA, Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol*. 2007;178(10):6367-73.
53. Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, et al. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol*. 2004;173(12):7406-15.
54. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet*. 2003;362(9398):1828-38.
55. Chiang LY, Sheppard DC, Gravelat FN, Patterson TF, Filler SG. *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun*. 2008;76(8):3429-38.
56. Lopes Bezerra LM, Filler SG. Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood*. 2004;103(6):2143-9.
57. Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol*. 2002;168(3):1362-71.
58. Rivera A, Van Epps HL, Hohl TM, Rizzuto G, Pamer EG. Distinct CD4⁺-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 2005;73(11):7170-9.
59. Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*. 2007;6(11):1953-63.
60. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 3:S225-64.
61. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(5):685-92.
62. Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Ann Thorac Med*. 2017;12(2):74-82.
63. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-50.
64. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70(3):270-7.

65. Denning DW, Cadranell J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47(1):45-68.
66. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. 1984;100(3):345-51.
67. Benet T, Voirin N, Nicolle MC, Picot S, Michallet M, Vanhems P. Estimation of the incubation period of invasive aspergillosis by survival models in acute myeloid leukemia patients. *Med Mycol*. 2013;51(2):214-8.
68. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998;26(4):781-803; quiz 4-5.
69. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2007;45(2):205-16.
70. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20(121):156-74.
71. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis*. 2007;44(3):373-9.
72. Prasad A, Agarwal K, Deepak D, Atwal SS. Pulmonary Aspergillosis: What CT can Offer Before it is too Late! *J Clin Diagn Res*. 2016;10(4):TE01-5.
73. Franquet T, Muller NL, Gimenez A, Guembe P, de La Torre J, Bague S. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics*. 2001;21(4):825-37.
74. Rudramurthy SM, Paul RA, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(3).
75. Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:459405.
76. Leck A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health*. 1999;12(30):24.
77. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66 Suppl 1:i15-24.
78. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;34(1):7-14.
79. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1:S125-8.
80. 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(3):641-9.
81. Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meersseman W, Lagrou K, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2007;44(10):1329-36.
82. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive

- pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1688-93.
83. Zhou W, Li H, Zhang Y, Huang M, He Q, Li P, et al. Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2153-61.
 84. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2366-7.
 85. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet*. 2004;363(9405):325-7.
 86. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):913-6.
 87. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40(9-10):353-7.
 88. De Vlieger G, Lagrou K, Maertens J, Verbeken E, Meersseman W, Van Wijngaerden E. Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3783-7.
 89. Marty FM, Koo S. Role of (1-->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2009;47 Suppl 1:S233-40.
 90. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):199-205.
 91. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):654-9.
 92. He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015;48(4):351-61.
 93. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(7):1095-105.
 94. Heldt S, Hoenigl M. Lateral Flow Assays for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Current Status. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;11(2):45-51.
 95. Held J, Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel Aspergillus lateral-flow device and the Platelia(R) galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. *Infection*. 2013;41(6):1163-9.
 96. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1510-6.
 97. Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, et al. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of

- Aspergillus DNA in high-risk hematological patients. *J Clin Microbiol.* 2013;51(5):1445-50.
98. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly P. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases.* 2009;9(2):89-96.
 99. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3652-8.
 100. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel).* 2017;3(4).
 101. Baddley JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2011;49 Suppl 1:S7-S12.
 102. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1882-9.
 103. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattévin P, Belleguic C, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis.* 2006;43(5):577-84.
 104. Kaya S, Gencalioglu E, Sonmez M, Koksall I. The importance of risk factors for the prediction of patients with invasive pulmonary aspergillosis. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2017;63(9):764-70.
 105. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica.* 2006;91(8):1068-75.
 106. Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, 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(9):1161-70.
 107. Lortholary O, Ascioglu S, Moreau P, Herbrecht R, Marinus A, Casassus P, et al. Invasive aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma: a European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the Intergroupe Francais du Myelome. *Clin Infect Dis.* 2000;30(1):41-6.
 108. Li J, Chen S, Hu Y, Cai J. Bortezomib-induced severe pulmonary complications in multiple myeloma: A case report and literature review. *Oncol Lett.* 2016;11(3):2255-60.
 109. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 2007;44(4):531-40.
 110. Girmenia C, Barosi G, Aversa F, Bacigalupo A, Barbui T, Baronciani D, et al. Prophylaxis and treatment of invasive fungal diseases in allogeneic stem cell transplantation: results of a consensus process by Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Clin Infect Dis.* 2009;49(8):1226-36.
 111. Berenguer J, Allende MC, Lee JW, Garrett K, Lyman C, Ali NM, et al. Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and

- methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(3):1079-86.
112. Pagano L, Mayor S. Invasive fungal infections in high-risk patients: report from TIMM-8 2017. *Future Sci OA*. 2018;4(6):FSO307.
 113. O'Donnell MR, Schmidt GM, Tegtmeier BR, Faucett C, Fahey JL, Ito J, et al. Prediction of systemic fungal infection in allogeneic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol*. 1994;12(4):827-34.
 114. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2007;356(4):335-47.
 115. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001;32(3):358-66.
 116. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(4):250-60.
 117. Reichenberger F, Habicht JM, Gratwohl A, Tamm M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur Respir J*. 2002;19(4):743-55.
 118. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1417-27.
 119. Mercier T, Guldentops E, Lagrou K, Maertens J. Galactomannan, a Surrogate Marker for Outcome in Invasive Aspergillosis: Finally Coming of Age. *Front Microbiol*. 2018;9:661.
 120. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005;40(12):1762-9.
 121. Xiao C, Han L, Ni Y, Guo X. Correlation between dynamic monitoring of serum galactomannan antigen and anti fungal treatment in adult hematologic patients at risk of invasive aspergillosis. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015;15:364-7.
 122. Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, Chen P, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43347.
 123. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2012;119(8):1831-7; quiz 956.
 124. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, Pautas C, Maury S, Kuentz M, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(1):81-6.
 125. D'Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, Schoemans H, De Vlieger G, Lammertijn L, et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1258-63.
 126. Becker MJ, de Marie S, Fens MH, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Effect of amphotericin B treatment on kinetics of cytokines and parameters of fungal load in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):428-34.

127. Calmettes C, Gabriel F, Blanchard E, Servant V, Bouchet S, Kabore N, et al. Breakthrough invasive aspergillosis and diagnostic accuracy of serum galactomannan enzyme immune assay during acute myeloid leukemia induction chemotherapy with posaconazole prophylaxis. *Oncotarget*. 2018;9(42):26724-36.
128. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2733-41.
129. White PL, Price JS, Posso RB, Barnes RA. An evaluation of the performance of the Dynamiker(R) Fungus (1-3)-beta-D-Glucan Assay to assist in the diagnosis of invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis pneumonia*. *Med Mycol*. 2017;55(8):843-50.
130. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*. 2012;54(5):633-43.
131. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2039-45.

8. ÖZET

İNVAZİV PULMONER ASPERGİLLOZ ŞÜPHELİ HASTALARDA GALAKTOMANNAN VE BETA GLUKAN ANTİJEN TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İnvaziv pulmoner aspergilloz risk altındaki hastalarda yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip fırsatçı mantar enfeksiyonudur. Hastalığın erken tanı ve tedavisi yüksek mortalite oranlarını düşürmek adına hayati önem taşır. Konvansiyonel yöntemlerin tanıda gecikmelere yol açması erken tanıya olanak sağlayan galaktomannan ve (1-3)- β -D-Glukan gibi serolojik yöntemlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu çalışmanın amacı piyasaya yeni çıkan Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan ve Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testlerinin invaziv pulmoner aspergilloz enfeksiyonlarındaki tanısal duyarlılıklarını tespit etmektir.

Çalışmamıza Aralık 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde invaziv pulmoner aspergilloz şüphesi ile takip edilen 62 hastaya ait 136 serum, 9 BAL sıvısı örneği dahil edilmiştir. Hastaların tanımlanmasında EORTC/MSG kriterleri kullanılmıştır. Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan ve Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testleri kullanılarak *Aspergillus* enfeksiyon varlığı araştırılmıştır. Duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre hesaplanmıştır.

EORTC/MSG kriterlerine göre 62 hastanın 32 (%51,6) tanesi İPA olarak tanımlanırken İPA olmayan 30 (%48,4) hasta kontrol grubunu oluşturmuştur. İPA

tanısı konulan hastaların 11 (%34,4) tanesi yüksek olasılıklı İPA, 21 (%65,6) hasta ise düşük olasılıklı İPA olarak değerlendirilmiştir. Kanıtlanmış İPA tanısı alan hasta bulunmamaktadır. İPA gelişiminde en önemli risk faktörünün uzamış steroid kullanımı olduğu saptanmıştır (p=0,011). FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %77,8, özgüllüğü %93,7, pozitif prediktif değeri (PPD) %63,6, negatif prediktif değeri (NPD) %96,7 (p<0,001), Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testinin duyarlılığı %61,1, özgüllüğü %92,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %52,4, negatif prediktif değeri (NPD) %94,4 (p<0,001) bulunmuştur. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan ve Dynamiker Fungus (1-3)-β-D-Glukan testleri birlikte değerlendirildiğinde duyarlılığın %83,3'e yükseldiği, özgüllüğün ise %85,8'e düştüğü gözlenmiştir.

Panfungal bir belirteç olan (1-3)-β-D-Glukanın *Aspergillus*'a özgü olmaması diğer tanı testleri ile birlikte kullanımını gerektirmektedir. İnvaziv pulmoner aspergilloz tanısında galaktomannan testinin (1-3)-β-D-Glukan testi ile kombinasyonu tanısal duyarlılığı arttırmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, invaziv pulmoner aspergilloz, galaktomannan, (1-3)-β-D-Glukan

9. SUMMARY

COMPARISON OF GALACTOMANNAN AND BETA GLUCAN ANTIGEN TESTS RESULTS IN THE SUSPICION OF INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS

Invasive pulmonary aspergillosis is an opportunistic fungal infection presents high morbidity and mortality rates for high risk patients. Early diagnosis and treatment of the disease is vital to reduce high mortality rates. Serological methods such as galactomannan and (1-3)- β -D-Glucan are frequently used for the early diagnosis, since conventional methods may delay the diagnosis. The aim of this study was to determine the diagnostic accuracy of Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan and Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glucan tests which recently to the market for the diagnosis of aspergillosis.

Our study, was performed by using the 136 serum and 9 BAL fluids samples collected from 62 patients with suspicion of invasive pulmonary aspergillosis at Gazi University Medical Faculty Hospital, between the December 2018 and May 2019. EORTC/MSG criteria were used to classify the patients. The presence of *Aspergillus* infection was investigated by using Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan and Fungus (1-3)- β -D-Glucan tests. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value were calculated according to FDA approved Platelia™ *Aspergillus* Ag test.

According to EORTC / MSG criteria, 32 (51.6%) of 62 patients were defined as IPA group and 30 patients (48.4%) without IPA composed the control group.

Eleven (34.4%) of the patients in IPA group were considered as probable IPA while, 21 (65.6%) patients were possible IPA. No patients were diagnosed as proven IPA. The most important risk factor for the development of IPA was determined as prolonged steroid use ($p = 0.011$). According to FDA approved Platelia™ *Aspergillus* Ag test, the sensitivity of Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan test was 77.8%, the specificity was 93.7%, the positive predictive value (PPV) was 63.6%, the negative predictive value (NPV) was 96.7% ($p < 0.001$), the sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative (NPV) predictive value of the Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glucan test were 61.1%, 92.1%, 52.4% and 94.4% respectively, ($p < 0.001$), Sensitivity increased to 83.3% and specificity decreased to 85.8% when the Dynamiker *Aspergillus* Galactomannan and Fungus (1-3)- β -D-Glucan tests were considered together.

Panfungal marker (1-3)- β -D-Glucan, started be used with the comparison of other diagnostic tests, since its not specific for *Aspergillus*. Combination of galactomannan test with the (1-3)- β -D-Glucan test is usefull to increase diagnostic accuracy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis.

Keywords: *Aspergillus*, invasive pulmonary aspergillosis, galactomannan, (1-3)- β -D-Glucan

10. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 09/02/2017-E.21345



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Etik Komisyonu



Sayı : 77082166-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Üniversitemiz Etik Komisyonu'na verilen "*Aspergillus galaktomannan testi için gönderilmiş olan nötrojenik hasta serumlarında Dinamiker Galaktomannan ELİSA, 1.3-beta-D Glukan ve Aspergillus PCR sonuçlarının karşılaştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz Komisyonumuzun 19.01.2017 tarih ve 01 sayılı toplantısında görüşülmüş olup,

Çalışmanızın Üniversitemiz Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmadığına oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Alper CEYLAN
Komisyon Başkanı

Araştırma Kod No: 2017-55

Ek:1 Liste

Ankara
Tel 0 (312) 202 20 57 Faks 0 (312) 202 20 63
İnternet Adresi <http://etikkomisyon.gazi.edu.tr/>

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No 202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Tuğba

Soyadı: Çuhadar

Doğum yeri ve tarihi: Ankara-25.02.1984

Eğitimi:

Tıpta Uzmanlık: 2015-2019 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

A.B.D.

Lisans: 2003-2009 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC)

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD)

Türk Hastane Enfeksiyonları ve Kontrolü Derneği

Ankara Mikrobiyoloji Derneği