

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

DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE OLUŞTURULAN İNVAZİV
ASPERGİLLOZ ENFEKSİYONU TANISINDA KÜLTÜR DIŞI TANI
YÖNTEMLERİNİN DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. SİBEL AYDOĞAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEMRA KUŞTİMUR

ANKARA-2007

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen danışmanım sayın Prof. Dr. Semra Kuştimur' a, değerli hocalarım Prof. Dr. Nedim Sultan, Prof Dr. Sevgi Türet, Prof. Dr. Turgut İmir, Prof. Dr. Seyyal Rota, Doç. Dr. Meltem Yalınay Çırak, Doç. Dr. Kayhan Çağlar' a, hiçbirzaman desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ayşe Kalkancı' ya, Yrd. Doç. Dr. Gülendaml Bozdayı, Yrd. Doç. Dr. Işıl Fidan, Yrd. Doç. Dr. Funda Doğruman Al ve Öğretim Görevlisi Dr. E. Doruk Engin' e, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme, canım eşime ve oğluma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	3
TABLOLAR	4
ŞEKİLLER	5
GİRİŞ VE AMAÇ	6
GENEL BİLGİLER	8
GEREÇ VE YÖNTEMLER	44
BULGULAR	57
TARTIŞMA VE SONUÇ	65
ÖZET	84
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	103

KISALTMALAR

ABPA: Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz

AIDS: Edinsel İmmünyetmezlik Sendromu

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CFU: Colony Forming Unit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FDA: Food and Drug Administration

GM: Galaktomannan

GZ-PZR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

IFN γ : İnterferon gama

Ig: İmmünglobülin

IL: İnterlökin

İA: İnvaziv aspergilloz

PMNL: Polimorfonükleer lökosit

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Th: Yardımcı T hücresi

YRBT: Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi

TABLÖLAR

	Sayfa No.
Tablo I. <i>Aspergillus</i> türlerinin neden olduğu hastalıklar	21
Tablo II. İnvaziv aspergilloz riski altındaki hastalar	25
Tablo III. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primer ve prob dizileri	55
Tablo IV. Aspergilloz oluşturulan gruba ait test sonuçları	61
Tablo V. Aspergilloz grubunda çalışılan testlere ait özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve p değerleri	63
Tablo VI. Aspergilloz grubundan alınan kan örneklerinde Lizis Santrifügasyon ve PZR test sonuçlarının karşılaştırılması	64
Tablo VII. Tedavi alan ve almayan invaziv aspergillozlu sıçanlarda Galaktomannan, PZR-ELISA ve GZ-PZR testlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya ait sonuçlar	82

ŞEKİLLER

	Sayfa No.
Şekil 1. Deney hayvanlarına <i>Aspergillus fumigatus</i> konidyasının solunum yolundan verilmesi	46
Şekil 2. Nötropeni kontrolü için alınan kan örneklerinden hazırlanan periferik yaymanın mikroskopik görüntüsü	47
Şekil 3. Akciğer aspergillozu oluşturulmuş deney hayvanlarında akciğerlerin makroskopik görünimleri	48
Şekil 4. Doku örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde septalı hiflerin varlığı	57
Şekil 5. Akciğer dokusundan üretilen <i>Aspergillus fumigatus</i> kolonileri	58
Şekil 6. Kültürde üremiş <i>Aspergillus fumigatus</i> kolonilerinin mikroskopik görüntüsü	58
Şekil 7. Kontrol ve Aspergilloz gruplarından alınan doku örneklerinde kitin düzeyleri	59
Şekil 8. <i>Aspergillus fumigatus</i> DNA' sının bulunduğu ve bulunmadığı örneklerde LightCycler ekranında floresansın gösterilmesi	60
Şekil 9. β glukan pozitif bir örnekte okuyucu ekranında görülen aktivite eğrisi	61
Şekil 10. Aspergillozlu gruba ait test sonuçları	62
Şekil 11. Aspergilloz grubunda çalışılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri	63

GİRİŞ VE AMAÇ

İnvaziv mikozlar son otuz yıldır önemli tehlikeli toplumsal sağlık problemleri içinde ön plana çıkmaktadır. Bu hastalıkların insidansında beliren dramatik artış risk altındaki popülasyonda belirgin artışa bağlanmıştır. Bu popülasyon grubunda Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) olan hastalar, solid organ ya da kök hücre nakli alıcıları, hematolojik maliniteli hastalar ve diğer bağışık engelli bireyler bulunmaktadır (24,37,57,74,93,122).

Yoğun bakım ünitelerinde girişimsel izlem yöntemlerinin ve agresif tedavi protokollerinin kullanımının artması ile risk altındaki hastaların yaşam sürelerinde de uzama olmuştur. Tedavi ve kemoprofilaksiste flukonazol gibi azollerin, febril nötropenide ampirik olarak amfoterisin B'nin kullanılması kısmende olsa yüksek riskli hastalarda gelişen fungal enfeksiyonların epidemiyolojisinde belirgin değişikliklere yol açmıştır (24).

Küf enfeksiyonları bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda gittikçe artan oranlarda görülmeye devam etmektedir. Hematolojik maligniteli, solid organ ya da kök hücre nakli yapılmış ve kortikosteroid tedavisi alan hastalar küf enfeksiyonları açısından yüksek risk altındadırlar. Küf enfeksiyonlarına sebep olan türler içinde en yaygını *Aspergillus* türleridir (24,57).

İnvaziv aspergilloz (İA) bağışıklık yetmezliği olan hastalarda gelişen ve tanı konup tedavi başlansa bile sıklıkla ölümle sonuçlanan fırsatçı bir enfeksiyondur (98). İyi tanımlanmış risk faktörleri; akciğer hastalığı, uzamış nötropeni, yüksek doz kortikosteroid veya sitostatik ilaç kullanımı, Edinsel Bağışık Yetmezlik Sendromu (AIDS), allojenik kök hücre nakli, Graft Versus Host Hastalığı (GVHD) ve tedavisidir. Ayrıca kronik granüloamatöz

hastalık, şiddetli kombine bağışık yetmezliği, yanıklar, sistemik lupus eritamatozus, kateter kullanımı, diabetes mellitus ve aşırı antibiyotik kullanımında da invaziv aspergilloz görülebilmektedir (89,98). Kök hücre nakli alıcılarında sıklıkla dissemine hastalık görülürken, hematolojik maligniteli hastalar ve AIDS hastalarında genellikle invaziv pulmoner hastalık gelişmektedir (83,115).

Fungal enfeksiyonların sayısında ve duyarlı konakların sayısındaki artış sorumlu patojenleri daha hızlı şekilde tanımlayacak tanı testlerine ihtiyaç doğurmuştur. Kültürde üreme ve histopatolojik değerlendirme fungal invazyonu göstermede hala en standart yöntem olarak kalmıştır, fakat bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda girişimsel işlemlerin uygulanması sorunlu olacağı için bu yaklaşımlar tercih edilmemektedir (4,57,87). Kan kültür sonuçları hem çok yardımcı olmamakta hem de invaziv kandidoz veya fuzaryoz hastalarının sadece %50' sinde pozitif iken, İA' lu hastaların ise çok azında pozitif olabilmektedir. Bu nedenle özellikle bu grup hastalarda invaziv olmayan tanısal yöntemler fungal enfeksiyonların erken ve hızlı tanısı için çok önemli olmaktadır (4,5,23,57,76,87).

Biz bu çalışmamızda deneysel hayvan modelinde oluşturulan invaziv aspergilloz enfeksiyonunun tanısında antijen testleri (galaktomannan, β -D glukon), moleküler yöntem (gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu-‘GZ-PZR’) ve lizis santrifügasyon kültür sisteminin erken tanıya katkılarını, ayrıca dokuda kitin ölçümünün enfeksiyonun doğrulanmasına katkısını değerlendirmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

İnvaziv fungal enfeksiyonların epidemiyolojisi

Geçen son otuz yıldır tıbbi ve cerrahi tedavideki gelişmeler yatan hastalarda gelişen enfeksiyon etkenlerinde değişikliklere neden olmuştur. Yeni teknolojiler ve tedaviler, kemik iliği ya da solid organ transplantasyonu, kemoterapötik ajanlar birçok tıp merkezinde yaygın olarak uygulanmaktadır ve bu işlemler sonucunda kişilerde bağışık yetmezlik oluşmaktadır. Aynı zamanda özelleşmiş ünitelerde bakım ve invaziv gözlem aygıtlarının kullanımı, parenteral beslenme, yardımcı ventilasyon önceleri ölümle sonuçlanan hastalıklarda yaşam süresini uzatırken beraberinde bağışıklığı baskılanmış, hastanede yatan, ciddi hastalık taşıyan hasta popülasyonunda artışa neden olmuştur. Ayrıca epidemik görülen AIDS hastalığı da bu grup hasta sayısını arttırmaktadır (37,57,93,94).

Genellikle, iki popülasyon kazanılmış invaziv fungal enfeksiyon riski altındadır. Birinci grup, coğrafik bölgeleri açısından artmış risk altındadır; endemik mikozlar olarak değerlendirilir. Örneğin; *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*. İkinci grup, fırsatçı enfeksiyon geliştirmeye yatkınlık taşıyan ciddi hastalıklı ya da bağışıklığı baskılanmış bireylerden oluşmaktadır (37,94).

İnvaziv mikozlara bağlı ölüm oranı her geçen yıl artmaktadır. Amerika’ da 1980 yılı verilerine göre 828 ölümden etken olarak izole edilmişler ve fatal enfeksiyon etkenleri arasında onuncu sıradayken, 1997 yılında ölümler 2370’ e ve etkenler arasında da yedinci sıraya yükselmiştir (74).

Fırsatçı mikozlara sebep olarak en iyi bilinen etkenler *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, ve *Aspergillus fumigatus*’ tur (93,94). Bu patojenlere bağlı tahmini

yıllık invaziv mikoz insidansı, *Candida* türleri için milyonda 72-228, *Cryptococcus neoformans* için milyonda 30-66 ve *Aspergillus* türleri için milyonda 2-34 enfeksiyondur (93).

Bu ajanlara ek olarak diğer fırsatçı mikozların sayısında da artış görülmektedir. Bu fungal patojenler *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* dışındaki diğer *Candida* ve *Aspergillus* türleri, fırsatçı maya benzeri mantarlar (örn; *Trichosporon* ve *Rhodotorula* türleri), Zigomiçetler, hiyalin küfler (örneğin; *Scedosporium* ve *Fusarium* türleri) ve çeşitli dematasöz mantarlardır (18,21,29,37,54,70,87,100,107,121). Ayrıca yakın zamanda, bir bitki patojeni olarak bilinen *Valsa sordida*'nın bağışık engelli bir lösemi hastasında fungal sinüzite neden olarak ölüme sebep olduğu yayınlanmıştır (49).

Endemik mikozların prevalansının da (*Pencillium marneffei*, *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma capsulatum*) endemik bölgelerdeki duyarlı kişilerde çevresel maruziyete bağlı olarak hızla arttığı bildirilmektedir (122).

Bu organizmalar kateter ilişkili fungemi ve peritonit, lokalize enfeksiyonlar (akciğer, cilt, paranazal sinüsler gibi) ve kan yoluyla yayılarak gelişen enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu mantarların birçoğunun önceden patojen olmadıkları bilinirken günümüzde bağışıklığı baskılanmış hastalardaki invaziv mikozlarda etken olarak tanımlanmışlardır (93). Bu organizmalardan bazıları standart azollere, poliyen ya da ekinokandinlere doğal direnç göstermekte ve alternatif antifungal ajanların kullanımı ya da ek olarak cerrahi müdahale ve konak savunmasındaki bozuklukların iyileştirilmesi gibi ek tedavilere gereksinim göstermektedir (93,103,122).

Son yıllarda predominant patojenik *Candida* türü değişmiştir. 1990'ların başında *Candida albicans*, *Candida* enfeksiyonlarının 2/3'ünden sorumlu iken dekad sonunda bu oran %50'ye inmiştir ve *Candida krusei* ve *Candida glabrata* gibi diğer türlerin oranı artmıştır (94). *Candida glabrata* ile ilişkili mortalite oranı %49 olarak saptanmıştır. Primer

abdominal cerrahili, yüksek kreatinin düzeyli hastalarda mortalite oranı yüksekken amfoterisin B uygulamasını takiben belirgin şekilde azalmıştır (43).

Bağıışık engelli fungemili hastalarla yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada *Candida krusei* için mortalite oranı %49 iken *Candida albicans* için %28 bulunmuştur (1). Kandidemideki mortalite oranı aynı zamanda hastalığın ciddiyeti ile direkt ilişkilidir. Albicans dışı *Candida* enfeksiyonları için APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) skorlaması 25' in üzerindeyken üç aylık mortalite oranı %65-80 olarak rapor edilmiştir. Yüksek APACHE II skoru antifungal tedaviye düşük cevap olarak değerlendirilmektedir (74).

Kandidemi için en önemli risk faktörü santral venöz kateter mevcudiyetidir. Kahn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Candida albicans*' ın santral venöz katetere tutunduğu ve antifungal ajanlardan kendini koruyan bir biyofilm tabakası oluşturduğu gösterilmiştir (63). *Candida* türleri ile özellikle sindirim sisteminde olan kolonizasyon *Candida* fungemisi için iyi tanımlanmış bir risk faktörüdür. Vajinal doğum sırasında bebek kolonize olabileceği için sezaryan ile doğum *Candida albicans* kolonizasyonu için koruyucu olarak değerlendirilmiştir. Sağlık çalışanları arasında ellerde tespit edilen *Candida parapsilosis* taşıyıcılığı yenidoğanlarda sonradan kazanılan kolonizasyonda önemli bir bulaş mekanizması olarak değerlendirilmiştir (24).

Hematolojik malignensili, solid organ ya da kök hücre nakli yapılmış ve kortikosteroid tedavisi alan hastalar küf enfeksiyonları açısından yüksek risk altındadırlar. Cerrahi tekniklerdeki gelişmeler, sitostatik tedavi ve tıbbi uygulamalar sonucu organ transplantasyonundan sonra hastaların yaşam sürelerinde ve kalitesinde önemli düzelmeler olmuştur. Buna rağmen hala enfeksiyöz komplikasyonlar ana morbidite ve mortalite nedeni olarak kalmıştır (24,37,51,57,74,93,94,108,121,122,135).

Organ transplant alıcıları arasında fungal enfeksiyonların sıklığı çok değişkendir ve genellikle nakledilen organ tipine ve bağışık yetmezliğin şiddetine bağlıdır. Transplant alıcılarında fungal enfeksiyonlar için risk faktörleri yüksek doz kortikosteroid kullanımı, akut rejeksiyon epizodları, hiperglisemi, transplante organda kötü fonksiyon, lökopeni ve ileri yaştır (2,89). Bu hastalar için kaba mortalite oranı %22-77 arasındadır. Fakat bazı hasta popülasyonlarında %90' ı aşabilmektedir (ısrarlı nötropenisi olan kemik iliği nakli alıcılarında aspergilloz veya fuzaryoz) (61,94).

1987-1993 yılları arasında kemik iliği nakli alıcılarında invaziv aspergilloz oranı %5.7'den %11.2'ye artmıştır (31). 1993-1999 yılları arasında da bu eğilimin devam ettiği saptanmıştır. Özellikle allojenik kemik iliği alıcılarında oran %11-13 arasında gözlenmektedir (12,48,120).

İnvaziv aspergilloz aynı zamanda solid organ nakli alıcıları arasında da morbidite ve mortalite sebebidir. Akciğer transplant alıcılarında %3.3-16 arasında seyretmektedir (31,40,109). Karaciğer nakil alıcıları da İA açısından yüksek risk altındadır (%1.5-%14.17) (31). Bu hastalık aynı zamanda böbrek nakil alıcıları gibi düşük riskli gruplarda da görülmektedir. Amerika böbrek veri sistemi ulusal kayıtlarına göre 1994-97 yılları arasında 33479 böbrek nakil alıcısının 288'inde fungal enfeksiyon gelişmiş ve etken olarak *Aspergillus* türleri %6.8 oranında izole edilmiştir (2).

Böbrek nakil alıcıları arasında önemli risk faktörleri içinde; verici olarak kadavra kullanılması, transplantasyon öncesi uzun süreli diyaliz uygulanması, diyabete bağlı son dönem böbrek hastalığı, rejeksiyon ve takrolimus idame tedavisi yer almaktadır (2).

Yayılmış ya da santral sinir sistemi (SSS) enfeksiyonu gelişen olgularda ölüm oranı %85'in üzerinde, yaygın akciğer hastalığında %60 ve sinüs hastalığında %26 olarak saptanmıştır (69).

Ülkemizden de çok sayıda invaziv fungal enfeksiyon olguları bildirilmektedir. 2005 yılında yayınlanan bir bildiride bir üniversite hastanesinde bir yıllık dönemde bağışık engelli olan ve olmayan hasta gruplarında izlenen invaziv fungal enfeksiyonlar bildirilmiştir. Toplam 32 hastada 33 enfeksiyon atağı gözlemlenmiş olup, etkenler sırasıyla *Candida albicans* (%63), *Aspergillus fumigatus* (%21) ve *Candida glabrata* (%12) olarak rapor edilmiştir. Her iki grupta da *Candida albicans* en sık etken olarak soyutlanırken bağışık engelli hastalarda aspergilloz olguları daha fazla gözlenmiştir (131). Yine ülkemizde bir transplantasyon merkezinde 1998-2001 yılları arasında gerçekleştirilen 207 transplantasyon hastasının yedisinde (dördü böbrek, üçü karaciğer alıcısı) invaziv akciğer aspergillozu gelişmiş, dört olguda tanı histopatolojik olarak (üç postmortem biyopsi, bir transbronşiyal akciğer biyopsisi) diğer üç olguda ise kültürde üreme, klinik ve radyolojik değerlendirme ile konulmuştur (56).

ASPERGİLLUS TÜRLERİ

Genel özellikleri

Terminolojik olarak *Aspergillus* 1729 yılında Micheli tarafından tanımlanmış ve ilk kez 1847 yılında insanda hastalık etkeni olarak soyutlanmıştır (89).

Aspergillus türleri *Deuteromycota* şubesi, *Moniliaceae* ailesi, *Hyphomycetes* sınıfında yer alırlar. Eşeyli (teleomorf) şekilleri *Ascomycota*'da *Eurotiales* takımında *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartoria* ve diğer cinslerde yer almaktadır (89).

Aspergillus 200'den fazla türü içeren çok büyük bir genustur ancak az sayıda tür insan enfeksiyonlarıyla ilişkili bulunmuştur. Tüm enfeksiyonların %95' inden fazlasında üç tür etken olmaktadır: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*. Bunlardan başka *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ustus* ve

Aspergillus versicolor'da etken olarak rapor edilmiştir. *Aspergillus fumigatus* invaziv ve invaziv olmayan aspergillozda en sık karşılaşılan etkindir. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*' de aspergilloma ve invaziv aspergilloza neden olmaktadır (47,89,93,94,98). Uzamış ve derin bağışık yetmezlikle birlikte invaziv enfeksiyona neden olan daha nadir türlerin listesi artmaya devam etmektedir. Bu türler; *Aspergillus caesiellus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus carneus*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus quadrilineatus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus fisheri*, *Neosartorya pseudofisherii* ve diğerleridir (89).

Tür tanımı

Aspergillus türlerinin isimlendirilmesi kültür ve morfoloji özelliklerindeki farklılıklara dayanır; biyokimyasal yöntemlerin tanı değeri düşüktür (52).

Tanımlama da kullanılan esas özellikler şunlardır:

- konidyalı başların biçimi ve rengi
- sterigmata (fialidler) sayısı
- vezikül biçimi
- konidyoforların yapısı ve rengi
- hülle hücrelerinin biçimi

Tanım için tarif edilmiş standart besiyerleri Czapek Dox agar (%3 sukroz) ve %2 Malt Özütü agardır. *Aspergillus glaucus* ve *Aspergillus restrictus* grupları gibi ozmofilik türler tanıma uygun gelişme ve konidya oluşturmak için yüksek (%20-40) glukoz yoğunluğuna gereksinim duyarlar (52,75,98).

Patojenik *Aspergillus* türleri geniş kültür ısılarında, birçok besiyerinde hızlı ve kolaylıkla ürer. Nadiren kan kültürlerinde de üreme olabilir. 37°C' de üreme ile patojenik türler patojenik olmayanlardan ayrılabilir. *Aspergillus fumigatus* termotoleran bir tür olup 55°C' ye kadar üreyebildiği gibi 70°C' ye kadar da canlılığını koruyabilmektedir (89,98).

Morfoloji

Koloniler genellikle hızlı gelişir; renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, siyaha yakın kahverengi, kırmızı veya yeşil tonlarındadır. Koloni rengi daima mantarın mikroskopik komponentinin rengine bağlıdır. Örneğin; vejetatif hiflerin, konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır. Besiyerine dağılan pigment üretebilirler (52).

Hifler bölmelidir, ince veya kalın olabilir, hücreler genellikle çok çekirdekli. Miçelyum birçok enzim ve mikotoksin üretme yeteneğine sahiptir. Vejetatif hifin ayak hücresi denen özelleşmiş bir hücresinden dik olarak çıkan, konidyofo denilen konidyum taşıyıcı hiflerin ucu şişkinleşmiştir, yukarı doğru oluşturdıkları yuvarlak veya oval biçimdeki baş kısmına vezikül adı verilir. Konidiyum yapıcı hücreler olan fiyalidler ya doğrudan vezikülün üzerinde (uniseriate) veya metulaların üzerinde (biseriate) doğarlar ve altındaki sap denilen hücre ile birlikte konidiyumlu baş denen tipik görünümü oluştururlar. Konidyofozun uzunluğu, bölmeli, bölmesiz veya dallanmış oluşu ve duvarının düz, pürüklü, dikenli olması gibi özellikleri türlere gibi farklıdır (52,82,84).

Konidiyumların oluşumu sırasında konidyum yapıcı hücrenin (fiyalid) kendisi büyümmez. Konidiyumlar ardarda dizilerek tesbih şeklinde zincirler oluştururlar ve böyle bir zincirde en genç hücre en dipteki hücredir (98). Konidiyumlar bir hücreli, duvarları düz veya

pürüzlü, dikenli; şeffaf veya pigmentli olabilirler. Bazı türler hülle (dinlenme) hücreleri denen hif kitleleri oluşturabilir (52).

EKOLOJİ VE BULAŞ

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde, toprakta, havada, suda ve özellikle çürüten organik maddelerde yaygındır. Zengin enzim sistemleriyle organik maddeleri ayrıştırarak kullanabildikleri ve diğer mikroorganizmalar için çok düşük olan nem düzeylerinde bile gelişebildikleri için, depolanmış tahıllarda, çeşitli gıda ve eşyalarda ayrıca dış ortamda ve hastane ve evlerin iç ortamlarındaki havada asılı olarak bulunurlar (37,65,81,89,98).

Aspergillus türleri zincirler halinde çok miktarda konidiyum üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar (115). Konidiyumlar genelde 2-5 µm çapındadırlar ve hava ile taşınırlar (52).

Aspergilloz genellikle havadaki konidiyumların solunum yoluyla alınması ile bulaşırsa da ameliyatlar sırasında dokuyu enfekte edebilmekte ve kontamine aletlerle de vücuda girebilmektedir. Sağlıklı bireylerde deri ve korneadan travmalarla vücuda girebilmektedir (81,117).

İnvaziv aspergilloz sıklıkla bağışıklığı baskılanmış hastalarda ortaya çıktığından hastane ortamında konidiyumların bulunması önemlidir. Hastane havasında *Aspergillus* konidiyumları için çeşitli potansiyel kaynaklar tanımlanmıştır. Bunlardan en belirgin olanı dış ortamdaki havanın uygunsuz filtrasyonu ile hava kullanma sistemidir (128). Yüksek konsantrasyonda spor taşıyan tozlar hava yollarında birikmekte ve dağıldıklarında hava kaynaklı *Aspergillus* türlerinin birdenbire ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yine hastane yer döşemelerinde kullanılan yanmayan maddelerden sporların salınımı bildirilmiştir. Hastane

sularının da İA gelişiminde bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (123). Hasta odalarındaki çiçek saksıları da kaynak olabilmektedir (52,64).

PATOGENEZ

Aspergillus fumigatus insan aspergilloz enfeksiyonlarının %90' ından izole edildiği için patogeneze araştırmalarında en çok çalışılan tür olmuştur.

Aspergillus fumigatus çevresel karbon ve nitrojen dönüşümünde önemli rol oynayan saprofit bir mantardır. Doğal olarak organik yıkıntılar üzerinde, toprakta ürerler. Bu tür, dünyada yaygın olmamasına karşın hava kaynaklı konidiyumlu funguslar arasında en yaygın olanıdır. Her konidyal başlıkta binlerce konidiya oluşturarak yoğun bir biçimde sporlanmaktadır (65). Havaya yayılan söz konusu konidiyumlar akciğer alveollerine ulaşabilecek kadar küçüktür (2-3 µm) (114). *A. fumigatus* konidiasının havaya yayılması çevresel şartlar ve güçlü hava akımına bağlıdır. Konidiyaların küçük olma özellikleri, havaya yayıldıktan sonra, ev içinde veya ev dışında havada kalmalarını sağlamaktadır. Çevresel araştırmalar, tüm insanların günlük olarak en az yüzlerce *A. fumigatus* konidiasını inhale ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bir çok yatkınlık taşıyan hastada, diğer organlara da yayılım görülmesine rağmen, hastalık predominant olarak akciğerlerde oluşmaktadır (65).

Aspergillus türlerinin enfeksiyöz partikülü konidiyumdur. Konidiyumlar akciğerlere inhalasyon yolu ile ulaşmaktadır. Ayrıca konidiyumlarla kontamine olmuş sulardan aerosollerin inhalasyonu yolu ile de akciğerlere konidiyumların ulaşabildiği söylenmektedir. Daha az sıklıkla cerrahi yaralar (26), kontamine intravenöz kateterler veya kontamine bandaj uygulamaları gibi yollarla ciltten giriş sonrasında kutanöz enfeksiyonlar gelişebilmektedir (6). Bağışıklık sisteminin baskılanması sonrasında inhale edilmiş olan konidiyum genişler, germinasyon sonrası hif haline dönüşür. Akciğer dokusundaki germinasyonun inkübasyon

süresi iki gün ile aylar arasında değişebilir. Organizmanın 37⁰C' de üreyebilme yeteneği ve üreme hızı, etkenin patojenitesini ve oluşan enfeksiyonun ilerleme hızını belirleyici özellikler arasındadır. En hızlı gelişen tür *A. fumigatus* olup besiyerine bağlı olarak germinasyon 5-12 saat içinde başlar (7). Enfeksiyon damar invazyonu ve akciğerde infarkt ile sonuçlanır (15,106).

Konak savunması

Doğal immünite: *Aspergillus* için özgül olmayan savunma faktörleri; **anatomik bariyerler**; mukus tabakası, silyaların hareketi ve akciğer sürfaktanı, **fagositik hücreler**; konidyalara karşı ilk hücrel savunma makrofajlar tarafından olur. Makrofajlar konidyaları öldürürken aynı zamanda salgıladığı sitokin ve kemokinlerle hücrel direncin koordinasyonunu da sağlar. Makrofajlardan kaçan şişmiş konidiya ve hifler, nötrofiller ve monositler tarafından öldürülmekte ancak yine de nötrofiller primer olarak hiflerin yok edilmesinden sorumlu tutulmaktadır. Bunların dışında, trombositlerde *Aspergillus* türlerine karşı savunmada rol almaktadır, **sıvısal faktörler**; hif yapıları komplemanı hem alternatif hem de klasik yoldan, konidyumlar ise çok zayıf olarak alternatif yoldan aktive etmektedir (62,65,134).

Kazanılmış immünite İA'daki kazanılmış bağışık yanıtları Th aktivasyonunun iki şekli belirlemektedir. Th1 yanıtı, inflamatuvar sitokinlerden IFN γ , IL-2 ve IL-12'nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin (makrofaj ve PMNL) uyarılmasıyla birliktelik gösterir. Th2 tipindeki yanıt ise, genellikle minimal hücrel cevap ile ilişkilidir, IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini artırır, antifungal efektör hücre aktivitesinin baskılanmasına ve IFN γ üretiminin azalmasına yol açar (65). Sonuçta, diğer mantarlarda olduğu gibi Th1 sitokinlerin üretimi koruyucu olarak görülürken, Th2 baskın yanıtlar sergileyen konaklarda ilerleyen bir enfeksiyon gelişmektedir (133).

İnokulum ve inkübasyon süreci: İA gelişmesi duyarlı konağın yeterli inokulumla karşılaşması sonrası gelişir. Enfekte edici inokulum miktarının konağa bağlı olduğu söylenmektedir. Hastalığın gelişme süresi ise tam olarak açıklık kazanmamıştır. Nötropenik hastaların birçoğunda hastanede yatarken *Aspergillus* kolonizasyonu gelişmekle beraber İA'un derin nötropeninin onikinci gününden önce başlamadığı belirtilmektedir (52).

Olası virülans faktörleri

Aspergillus türlerinin hastalık oluşturabilmesi için, konak dokusuna tutunmasını, dokuya penetrasyonunu ve özellikle fagositik hücreler gibi savunma elemanlarını etkisiz hale getirmesini sağlayan bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (114).

Adezinler *Aspergillus* konidiyumları fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albumin, immünglobülinler, kollajen ve sürfaktan gibi konakta dolaşımda veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanırlar (114). Bu bağlanma özgül olmayan fizikokimyasal etkileşimlerle ve/veya özgül reseptör-ligand ilişkisi aracılığıyla olabilir (65,114). Konidiyumların komplemanla veya mannoz bağlayan protein ve sürfaktan gibi diğer proteinlerle opsonizasyonu, konak savunmasının mikroorganizmaya karşı etkinliğini arttırabilir. Ancak *A. fumigatus* patojenitesinin artmasını sağlayan bir kompleman inhibitörü salgılar (7).

Pigmentler. Pigmentsiz sokak tipi *A. fumigatus* suşlarının yeşil konidiyalı suşa göre daha az patojen olduğu gösterilmiştir. Dihidroksinaftalen melanin biyosentezinde rol alan poliketid sentazı kodlayan ALB1 ve sitalon dehidratazı kodlayan ARP1 olmak üzere iki gen klonlanmıştır. İzojenik pigmentsiz mutantlarla yapılan çalışmalarla sokak tipi pigmentsiz

suşlardan elde edilen sonuçlar uygunluk göstermiştir. Beyaz *A. fumigatus* konidiyasının komplemana daha çok bağlandığı ve duvarının daha geçirgen olduğu gösterilmiştir. Ancak hemen hemen tüm sokak tipi konidiyaların yeşil ve invaze edici hiyalinler olması dolayısıyla, bu sonuçların hastalık kontrolü üzerinde pek fazla anlamı yoktur. Bunun dışında, steroid verilen farelere inokule edilen pigmentsiz konidiyaların invaziv aspergilloz oluşturamadığı görülmüştür (65).

Toksik Moleküller. *A. fumigatus* bir çok toksik sekonder molekül oluşturmaktadır. En yoğun olarak çalışılanı ise, epipolitiiodioksopiperazin ailesine ait bir metabolit olan, gliotoksindir. Akut olarak toksik olan bu bileşiğin aynı zamanda bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliği vardır (114). Bu özelliklerinden dolayı, kemik iliği nakli yapılan hastalarda bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılmıştır. Gliotoksin makrofaj aracılı fagositozu inhibe eder ve antifagositik özelliğinden farklı bir mekanizmayla makrofajlarda apoptozu indükler. Ayrıca T ve B hücrelerinin aktivasyonunu ve sitotoksik hücrelerin oluşumunu da bloke etmektedir (46).

Aspergillus cinsi mantarlar özel bir toksin sınıfı olan ribotoksinleri üretir. Ribotoksinler yaklaşık 17kDa büyüklüğünde bir protein sınıfıdır ve restriktosin, α sarkin ve mitogillin gibi ürünleri içerir. Restriktosin *A. fumigatus* ve *A. restriktus* tarafından üretilen ve üzerinde en yoğun çalışılan ribotoksindir. Ökaryot ribozomları üzerine nanomolar konsantrasyonlarda çok toksik etkili olduğu gösterilmiştir. Gliotoksin, fumagillin ve restriktosin gibi metabolitlerin bağışıklık sistemini baskılayarak fungal büyümeyi kolaylaştırdığı düşünülmektedir (114). Başka bir toksik madde olan hemolizin ise eritrositlerin parçalanmasından sorumludur (65).

Bunların dışında *Aspergillus flavus* tarafından oluşturulan aflatoksinin bağışıklık sistemini baskılayıcı ve karsinojenik etkisinin olduğu, fagositozu, hücre içi öldürmeyi ve

makrofajlar tarafından oluşturulan spontan süperoksit üretimini baskıladığı ileri sürülmüştür (134).

Enzimler *Aspergillus* türleri kendi besin maddelerini karşılayabilmek için fosfataz, peptidaz ve proteazlar gibi çok çeşitli hücre dışı enzimleri üretme yeteneğine sahiptir (114).

Proteazlar, proteinlerin peptid bağlarını (CO-NH) kıran ve peptid veya serbest aminoasitlerin oluşmasına neden olan reaksiyonları katalize ederler. *Aspergillus fumigatus*' un iki elastazı, bir serin proteazı ve metalloproteazı klonlanmış ve sekanslanmıştır. Elastin akciğer dokusunun %28' ini oluşturan ana yapısal bileşenlerinden biridir (7,46). Elastaz üreten türlerin 48-96 saat içinde akciğer dokularında hifal gelişim gösterdiği ve alveol nekrozuna yol açarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Hücre dışı elastinolitik alkalın proteaz olan AFA1p' nin kollajen, fibrin, fibrinojen ve elastini parçaladığı gösterilmiştir (114).

Bir diğer enzim grubu olan fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerde bulunan bağları hidrolize ederler. Fosfolipidler hücre membranının ana bileşenlerinden olduğundan doku invazyonu sırasında fosfolipazlarla parçalanırlar ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Fosfolipazlar A, B, C ve D olmak üzere gruplara ayrılırlar. Yapılan çalışmalarda *Aspergillus fumigatus* izolatlarının fosfolipaz A, B, C ve D salgıladıkları gösterilmiştir. Fosfolipazların hepsi 37°C' de ekspresse edilmektedir (16).

A. fumigatus'ta üç katalaz ve iki süperoksit dismutaz bulunmuştur. Bu maddeler mantarı oksijen molekülünün, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin ve fagositler tarafından üretilen diğer serbest radikallerin hasarından koruyabilir (52).

KLİNİK

Tablo I. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar (134)

I-Normal Konaktaki Hastalıklar

- A. Mikotoksikozlar
 - 1.Mikotoksinlerin sindirim yolu ile alınması
 - 2.Mikotoksinlerin solunum yolu ile alınması
- B.Alerjik hastalıklar
 - 1.Alerjik astım
 - 2.Alerjik rinit
 - 3.Alerjik sinüzit
 - 4.Ekstrensek alerjik alveolit
 - 5.Hipersensitivite pnömonisi
 - 6.Alerjik bronkopulmoner aspergilloz
- C.Yüzeyel veya invaziv olmayan enfeksiyonlar
 - 1.Kutanöz enfeksiyon
 - 2.Otomikoz
 - 3.Sinüzit
 - 4.Saprofitik bronkopulmoner aspergilloz
 - 5.Trakeobronşit
- D.İnvaziv enfeksiyon
 - 1.Tek organ tutulumu
 - 2.Çok organ tutulumu

II-Doku hasarı veya Yabancı Cisim ile İlişkili Enfeksiyonlar

- A.Keratit ve endoftalmit
- B.Yanık enfeksiyonları
- C.Osteomyelit
- D.Protez kapak enfeksiyonları
- E.Vasküler greft enfeksiyonları
- F.Aspergilloma (fungus topu)
- G.Ampiyem ve plevral aspergilloz
- H.Peritonit

III-Bağışık Engelli Konaktaki Enfeksiyonlar

- A.Primer kutanöz aspergilloz
 - B.Sino-orbital enfeksiyon
 - C.Pulmoner aspergilloz
 - 1.İnvaziv trakeobronşit
 - 2.Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz
 - 3.Akut invaziv aspergilloz
 - D.Santral sinir sistemi aspergillozu
 - E.İnvaziv aspergilloz
 - F.Gastrointestinal infarkt
-

Birçok hastada *Aspergillus* enfeksiyonları için temel giriş noktası ve enfeksiyon bölgesi solunum yolu sistemidir ancak bağışıklığı baskılanmış veya normal insanlarda deri, periton, böbrek, kemik, göz ve gastrointestinal sistem gibi diğer giriş yolları da belirtilmiştir (6,8,26,109). Ayrıca, operasyon sonrası cerrahi yara yeri enfeksiyonlarından da etken olarak izole edilmişlerdir (88). Astım, alerjik sinüzit ve alveolit gibi alerjik hastalıklar sürekli olarak *Aspergillus* konidyası veya antijenine maruz kalan insanlarda miçel kolonizasyonu olmaksızın ortaya çıkar ve birçok durumda hastaların çevreden uzaklaştırılması klinik olarak iyileşmeye yol açar. Bunun tersine Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA), aspergilloma ve İA enfeksiyonları vücutta miçel üremesi ile ilişkili sendromlar olup, çoğunlukla tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (65).

Alerjik Hastalıklar

Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)

Bağışık engelli olmayan hastalarda ve yüksek oranda atopik astım veya kistik fibrozlu kişilerde görülür. *Aspergillus* türlerine karşı gelişen hipersensitivite hastalığı olarak tanımlanır. Çevreden sporların inhalasyonunu takiben bronşial mukus içinde hifler büyür ve Th2 CD4(+) T hücreleri cevabı ve IgE ve IgG antikorlarının oluşumu ile bağışık yanıt gelişir (36,66).

Klasik olarak, tanı için kullanılan kriterler astım, periferik kanda eozinofili ($>1,000\text{mm}^3$), 15 ± 5 dakikada *A. fumigatus* veya antijenik ekstratlarına karşı gelişen hızlı deri reaksiyonu, *A. fumigatus*'a karşı IgG ve IgM ve IgE antikorlarının presipite olması, serumda total IgE artışı ($>1\mu\text{g/ml}$), herhangi bir pulmoner infiltrat hikayesi ve santral bronşektaziden ibarettir (64,105). Çok önemli olmamakla birlikte, *A. fumigatus*'un balgamdan izolasyonu, eozinofil ve Charcot-Leyden kristalleri içeren kahverengi balgam çıkartma, ve antijenin

uygulanmasından 6±2 saat sonrası ortaya çıkan deri reaksiyonları gibi özellikler de tanısal amaçlı kullanılabilir (89).

ABPA, Tip I, III ve IV aşırı duyarlılık reaksiyonları ile karakterizedir. Tip I reaksiyon sonucu bronkospazm, kan ve balgamda eozinofili ve ani ortaya çıkan cilt reaksiyonları görülür. Pulmoner infiltratlar ve bronşektazinin Tip III reaksiyon sonucu (Arthus ya da immün kompleks bağımlı) gelişen, dolaşan ya da presipitan antikor komplekslerine bağlı olarak geliştiği düşünülürken Tip IV reaksiyon sonucu ise mononükleer infiltrasyon ve granülomlar oluşmaktadır (115).

Alerjik Aspergillus Sinüziti

Sinüs aspergillomasi ile karışabilmektedir. Alerjik *Aspergillus* sinüzitinde sinüslerin eozinofilden zengin müsin ile dolu olması ve çoğu kez Charcot Leyden kristallerinin olması ayırdettiricidir (30,64).

Aspergilloma (miçetoma, fungus topu)

Doku invazyonu olmadan gelişen aspergilloz enfeksiyonudur. Akciğer parankimindeki bir kavite ya da ektatik bronş içinde fungal hif, mukus ve hücrel artıkların birleşmesi ile gelişir. Sıklıkla altta yatan bir enfeksiyon vardır. Bronkojenik kist, akciğerde sekestrasyon ve AIDS' li hastalarda *Pneumocystis carinii* pnömonisine sekonder gelişen pnömosel, histoplazmoz, ankilozan spondilit, radyasyon fibrozisi, tüberküloz, sarkoidoz gibi durumlarda gelişebilir (36,64,115).

Hastaların çoğu semptomatik değildir, en yaygın klinik belirti hemoptizidir. Yaşamı tehdit eden hemoptizi cerrahi rezeksiyon endikasyonudur (36).

Aspergilloma diğer bölgelerde de gelişebilir. Örneğin, maksiller ya da ethmoid sinüs hatta diş cerrahisi sonrası üst çenede de oluşabilir (65).

İnvaziv Aspergilloz

Geçen birkaç yıl içinde invaziv enfeksiyonların çeşitli formlarının olduğu olgu sayıları belirgin olarak artmıştır. Akciğer en sık tutulan bölge olmakla beraber hemen hemen tüm vücut bölgelerine yayılabilir ve gerçek yayılım bölgeleri sıklıkla sadece otopside tespit edilebilir. İA hemen hemen daima bağışık engelli kişilerde görülür ve hatta yaşam sırasında tanı konulup tedaviye başlanılsa bile sıklıkla ölümcül olarak seyretmektedir (98).

Risk faktörleri

Erken tanı konularak tedavi edilmeyince ölümcül olan invaziv aspergillozun risk derecesi farklı hasta gruplarında farklı olmaktadır (Tablo II) (81).

Hematolojik maligniteli hastalardaki aspergillozda solunum yetmezliği ve akciğerlerde radyolojik olarak bilateral tutulum olması kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (98). Granülositopeninin derecesi ve süresi en önemli predispozan konakçı faktörüdür. Aspergilloz enfeksiyonu gelişimi nötropeninin ilk iki haftası sırasında düşük orandayken, ikinci ve üçüncü haftadan sonra risk dramatik olarak artmaktadır (37,65). Hücre bağımlı bağışık yetmezlik (kemik iliği transplantasyonu yapılmış ya da kortikosteroid tedavili hastalar gibi) durumu da başka bir risk faktörüdür. Nötropenik hastalarda en yaygın klinik tablo 5-7 gün geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye rağmen düşmeyen ateştir (38°C' den fazla). Genellikle plöretik göğüs ağrısı vardır (27). Öksürük bulunabilir fakat genellikle minimal balgam üretimi olur, nadiren hemoptizi görülür (98,115).

Tablo II İnvaziv aspergilloz riski altındaki hastalar (81)

RİSK DERECEŚİ	RİSK YARATAN PRİMER HASTALIKLAR
Yüksek	Allojenik kemik iliğı transplantı Allojenik periferik kan kök hücre transplantı Akut lösemi Konik granüloamatöz hastalıklar Karaciğer transplantı Akciğer transplantı Singenik kemik iliğı transplantı Otolog kemik iliğı transplantı Uzun süreli nötropeni
Orta	Akciğer transplantı Singenik kemik iliğı veya periferik kan kök hücre transplantı (PKKH) Otolog kemik iliğı transplantı Uzun süreli nötropeni
Düşük	AIDS Renal transplant Otolog periferik kan kök hücre nakli Solid tümör veya miyeloma Otoimmün hastalıklar İntravenöz ilaç bağımlılığı Yanıklar Diyabet Prematürite Kortikosteroid kullanımı

Akut pulmoner hastalık, İA' un en yaygın klinik formudur, bazı çalışmalarda %95 kadar yüksek mortalite taşır (106). Bu tip enfeksiyon birkaç formda görülebilir. Tek ya da çok sayıda infiltratlı bronkopnömoni, ateş ve antibiyotiklerle tedaviye cevapsızlık akut pulmoner aspergillozun en yaygın klinik belirtileridir. Bakteriyel enfeksiyona benzeyen lobar pnömonide gelişebilir (98).

Erken evrede akut *Aspergillus* bronkopnömonisinde küçük yama şeklindeki infiltratlar akciğer grafisi ile tespit edilemeyebilir. Enfeksiyon alanının radyolojik olarak görüntülenmesinde yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (HRCT-YRBT) düz grafiye kıyasla daha duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemle elde edilen grafilere akciğer dokusunda kama biçiminde veya nodüler infiltrasyonlar etrafında daha düşük yoğunlukta bir infiltrasyonla çevrili alanın bulunması (halo belirtisi) nötropenik hastalarda invaziv akciğer aspergillozu için tipik kabul edilmektedir (23,36,115,127). Patolojik olarak bu lezyon, tromboz nedeniyle oluşmuş infarkt alanını çevreleyen ödem ve kanamadan oluşmaktadır. Nötropeninin düzelmesini takiben bu lezyonlarda kavitasyon ortaya çıkabilir. Bu durum radyolojik olarak kavite içinde yarım ay biçiminde hava görüntüsüne (air crescent sign) neden olur. Bu görüntü de invaziv küf mantarı enfeksiyonları için karakteristik kabul edilir (11). Uzun süreli nötropenik ateşi olan hastalarda erken dönemde rutin olarak çekilen akciğer BT' leri ile hastalığın erken dönemde saptanabileceği ve bu sayede başlanacak etkili antifungal tedavi ile mortalitenin azaltılabileceği gösterilmiştir (60).

Kronik nekrotizan aspergilloz, kronik düşkünlük yaratan hastalık, diyabet, malnütrisyon, alkolizm, ileri yaş, uzamış kortikosteroid tedavisi gibi durumlar yatkınlık yaratmaktadır. Klinikte kronik öksürük, ateş, balgam görülebilir. Hemoptizi hastaların %15' inde rapor edilmiştir. Radyolojik bulguları tek ya da iki taraflı konsolidasyon bölgeleri, plevral kalınlaşma ve opasitesi artmış nodüler bölgelerdir (36).

Santral sinir sistemi aspergillozu, nazal sinüslerden direkt yayılımdan çok, akciğerlerden kan yoluyla yayılım sonucu gelişen ve İA olgularının %10-20'sinde görülen en ağır klinik tablodur. Genellikle allojenik kemik iliği naklinden sonra ve bazen de beyin ameliyatlarından sonra görülebilir. Belirtileri konfüzyon, kişilik değişiklikleri, arteriyel tromboz sonrası gelişen infarktüse bağlı fokal nörolojik, bulgular, felç ve beyin omurilik sıvısı basıncında artış

olabilir. Çoğunlukla mantar BOS' dan üretilemez. Tanı da BT' den yararlanılabilmektedir. Ancak bulgular özgül değildir (89,98).

Paranasal sinüs aspergillozu olgularına özellikle sıcak ve kuru iklim bölgelerinde rastlanılır. Akut ve kronik olmak üzere iki şekli vardır. Akut şekli, rinoserebral mukormikoza benzer. Ancak mukor enfeksiyonu karakteristik olarak diyabetik ketoasidozlu hastalarda daha sık görülürken aspergilloz asıl olarak nötroopenik hastalarda görülür. Nazal polipler, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve kronik rinit fungal enfeksiyon gelişimine yatkınlık yaratabilir. Burun tıkanıklığı, ateş ve göz etrafında ağrı gelişmektedir.

Kronik sinüs aspergillozu ise diyabet hastalarında, aşırı alkol alanlarda ve AIDS' lilerde siktir. En sık soyutlanan etken *Aspergillus flavus*' tur. Burun tıkanıklığı, baş ağrısı, yüzde şişlik görülebilir. Radyolojik bulgular tanıyı desteklemektedir (79,98).

Trakeobronşit: Özellikle akciğer transplantasyonu yapılmış hastalarda ve AIDS hastalarında tanımlanan bir klinik tablodur. Transplant hastalarında genellikle ipek dikiş materyalinin kontamine olmasıyla ortaya çıktığı bu nedenle naylon ip kullanmanın yararlı olduğu gösterilmiştir (3).

Göz aspergillozu: Travmaya sekonder keratit gelişebilir. Endoftalmit nadiren görülen bir tablodur. İlaç bağımlıları, endokarditliler ve organ nakli yapılanlarda ya da direkt travmaya bağlı olarak veya kan yoluyla yayılım sonrası gelişebilir. Gözde ağrı, fotofobi ve görme kaybı şeklinde belirtiler görülebilir (35,68).

Bunların dışında prostetik kapağı olanlarda ya da kalıcı intravenöz kateteri olanlarda ve ilaç bağımlılarında endokardit (34), kronik granülomatöz hastalığı olan çocuklarda osteomyelit, kateter bölgelerinde ya da dissemine hastalık seyri sırasında cilt enfeksiyonları (6), karaciğer, böbrek, dalak, gastrointestinal sistem enfeksiyonları gelişebilir (89).

TANI

İnvaziv aspergillozun genellikle bağışık engelli hastalarda geliştiği görülmektedir. Bu nedenle erken tanı ve ardından başlanacak tedavi çok önem taşımaktadır. İnvaziv fungal enfeksiyonlarda tanı genelde klinik bulgularla laboratuvar tanısının birleştirilmesine dayanır. Ancak klinik belirtiler çoğunlukla özgül değildir ve başka hastalıklarla karışabilir. Erken laboratuvar tanısı ise genellikle zor konulmaktadır (23,47).

Kesin laboratuvar tanısı, etkenin klinik örnekte direkt mikroskopi ve histopatolojik olarak görüntülenmesi ve kültürde üretilerek tür düzeyinde tanımlanması ile konulmaktadır. Ancak mikroskobik inceleme ve kültür için bu örnekler, invaziv işlemlerle temin edilebilir ve bu işlemler çoğu zaman hastaların sitopenilerinden veya kritik durumlarından dolayı yapılamaz. Bu nedenle mantar yükü artmadan ve hasta ölmeden önce nadiren tanı konulabilir. Tanı için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik kriterlerden yararlanılmaya çalışılmaktadır (5,23,76,84,118,119,132). Ancak standardizasyon eksikliği merkezler arasındaki karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. 1999 yılında yapılan ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents) kongresinde; Belçika' daki Avrupa Kanser Araştırma Organizasyonu-İnvaziv Fungal Enfeksiyon Çalışma Grubu (EORTC-IFICG) ile Bethesda Mantar Çalışma Grubu (NIAID-MSG) bir konsensus oluşturmuş ve bunun sonucu İA tanımları (özellikle invaziv pulmoner aspergilloz) standardize edilmiştir. Bu amaçla üç grup oluşturulmuştur: kanıtlanmış (proven), yüksek olasılıklı (probable) ve düşük olasılıklı (possible) invaziv fungal enfeksiyon. **Kanıtlanmış İA**; *Aspergillus* hiflerinin histopatolojik boyalarla veya direkt mikroskobik inceleme ile gösterilmesi veya normalde steril olan ve radyolojik olarak anormal olan bölgeden alınan dokuda mantarın üretilmesi, **yüksek olasılıklı İA**; tipik konak faktörleri olan hastalarda klinik veya mikrobiyolojik kriterlerin bulunması, **düşük olasılıklı İA** ise;

konak faktörlerine ek olarak klinik kriterleri olan ancak mikrobiyolojik kriterlere sahip olmayan olguları ifade etmektedir (10).

Mikrobiyolojik kriterler

Histopatoloji/mikroskopi pozitifliği

Kültür pozitifliği (BAL/balgam/sinüs aspirasyonu)

Galaktomannan antijeni pozitifliği (BAL/BOS/iki ya da daha fazla kan örneğinde)

Klinik kriterler

Pulmoner aspergilloz

Majör klinik kriterler (CT)

Halo belirtisi

Hilal belirtisi

Konsolidasyon ve kavite

Minör klinik kriterler

Alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri (öksürük, plöretik göğüs ağrısı, dispne, hemoptizi)

Plevral frotman

Plevral efüzyon

Major radyolojik kriterlere uymayan infiltrasyon

Sinonazal aspergilloz

Majör klinik kriterler

Sinüslerde radyolojik olarak saptanmış invaziv enfeksiyon (sinüs duvarlarında erozyon, kemik harabiyeti)

Minör klinik kriterler

Üst solunum yolu enfeksiyonu belirtileri

Nazal ülserasyon, skar, epistaksis

Periorbital şişlik

Maksiller hassasiyet

Damakta nekroz/perforasyon

Mikroskopik değerlendirme

Aspergillozların tanısında etkenin doğada yaygın olarak bulunması nedeniyle kolonizasyon- enfeksiyon ayrımının iyi yapılması gereklidir.

Alerjik aspergillozun tanısında balgam örneklerinin mikroskopik değerlendirmesi sıklıkla yardımcı olur. Çünkü genellikle karakteristik bol septalı ve dikotomik (45° açılı) dallanan miçelyum yapısı görülür (98).

Balgamın mikroskopik değerlendirmesi İA tansına nadiren yardımcı olurken BAL örneklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Cilt lezyonlarından ya da sinüs yıkantılarından alınan nekrotik materyalin incelenmesi de faydalı olabilir (89,98).

Direkt incelemelerin kültüre göre avantajı, duyarlılıklarının daha yüksek ve rölatif olarak daha hızlı oluşudur. Dezavantajı ise, diğer filamentöz mantarlardan kesin olarak ayırtedememesidir (47).

Örnek %10-20 potasyum hidroksit (KOH) eklenerek incelenebilir. KOH hifal elementin proteinöz materyalinin temizlenmesi ile daha iyi görülmesine yardımcı olur. Yayma yapıp fikse edildikten sonra çeşitli boyalarla boyanır. Rutin olarak gram boyası kullanılır. Sitolojik boyalar (Papanicolaou boyası) ve floresan boyalar duyarlılığı artırır. Gomori' nin Methenamin Gümüş (GMS) ve Periodic Asit Schiff (PAS) boyaları histolojik kesit ve yaymalara uygulanabilir. Floresan boyalar (Kalkoflor beyazı, Uvitex 2B, Blankofor) taze klinik örneklerle, BAL sıvısına, parafinli dokuya, frozen kesitlere uygulanabilir. Örnekte

dikotomik (45°C açılı), hyalen görünümlü, septalı hiflerin varlığı *Aspergillus*' lar için tipiktir (15,84,89).

Kültür

Kesin tanı için mikroskopik bulguların kültürle doğrulanması gereklidir ancak kültürler çok başarılı olmamaktadır. Konidyumlar havada çok miktarda bulunduğundan kontaminasyon riski yüksektir ve bu nedenle üremeler dikkatle değerlendirilmelidir (10,98).

Aspergillus türleri için ilaç direnci çok önemli olduğundan tam identifikasyonun yapılması çok önemlidir. Aynı zamanda atipik izolatlarda tanımlanmalıdır (31).

Örneklerin sputolizin ya da diğer mukolitik ajanlarla işlenmesi ile mantarın mukuslu balgam ve endoskopik cerrahi ile elde edilen sinüs materyalinden izolasyonu kolaylaştırılır (75).

Patates Dekstroz Agar, Malt Ekstrakt Agar, Czapek Dox Agar gibi sporülasyonu kolaylaştıran besiyerlerinin primer izolasyon için kullanılması ile *Aspergillus* türlerinin büyüme hızı ve spor üretimi arttırılabilir. Başlangıçta 35-37°C'de inkübasyon yerine veya ek olarak 30 °C' de inkübasyon bazı *Aspergillus*' ların büyümesini hızlandırabilir. Ayrıca günlük değerlendirme ile erken üreme tespit edilebilir. Mikroaerofilik ortamda 35°C' de inkübasyon *Aspergillus* türleri için seçici bulunmuştur. Aynı organizmaların 25°C' de CO₂ içermeyen ortamda kültürleri yapılırken hiçbir pozitif sonuç elde edilememiştir (23,75).

Kültürde üreyen *Aspergillus*' ların seloteyp ya da ıslak örneklerde mikroskopik morfolojileri değerlendirilip hızlıca tanı konulabilir. Buna rağmen sporülasyon yavaş ya da atipik olduğu zaman lam kültürü gerekli olabilir (47,75).

İzole edilen *Aspergillus*' un etken kabul edilme kriterleri şunlardır (82):

-Direkt incelemede hif yapılarının görülmesi

- İzole edilen küfle direkt incelemenin uyumu
- Aynı plakta birden fazla mantar kolonisinin bulunuşu
- Farklı örneklerde aynı küfün izolasyonu
- İzole edilen küfün 37 °C’ de üreyebilmesi gereklidir.

Kitin düzeyinin belirlenmesi

Mayalar ve küfler hücrenin şeklinden sorumlu ve çevresel şartlara karşı dayanıklılığı sağlayan bir hücre duvarı ile çevrelenmiştir. Fungal hücre duvarının ana içeriği mannoproteinler, 1,3 β -glukan ve kitinden oluşmaktadır. Türlerle bağılı olarak 1,3 α -glukan ya da 1,6 β -glukan gibi ilave polimerlerde bulunabilir. Kitin N asetilglukozamin moleküllerinin β -1,4 zinciriyle bağlanmasından oluşan bir homopolimerdir. Genel olarak maya hücre duvarının kuru ağırlığının sadece %1-2’ sini oluştururken filamentöz mantarlar hücre duvarı kuru ağırlıklarının %10-30’ una kadar yüksek düzeyde kitin içeriğine sahiptir. Mayalar ve küflerin her ikisinde de kitin içeriği ile hücre duvarının mekanik sağlamlığı arasında belirgin ilişki vardır. Kitin sentezi bozulduğu zaman büyümekte olan hif erimeye başlar, hücrenin yapısı bozulur ve üzerinde baloncuklar gelişir (19,96).

Hastalık sırasında yoğun olarak miçel oluşumu gelişiminden ve akciğerde germinasyonunu tamamlamamış konidiyaların uzunca bir süre kalabilmesinden dolayı CFU (colony forming unit) ölçülerine göre fungusun kantitasyonu hastalığın şiddetini belirlemede iyi bir belirteç kabul edilmemektedir. Bunun için fungal biyokütle ile uyumlu olan kitinin gösterilmesinin in vivo üremeyi daha uygun olarak yansıtabileceği söylenmiştir (65).

Enfeksiyon bölgesinde kitinin gösterilebilmesi ancak dokudan örnek alınması ile mümkündür. Bu nedenle rutin tanıda kullanımı sınırlıdır. Daha çok deneysel modellerde veya post-mortem doku örneklerinde mantar yükünün gösterilmesi için kullanılmaktadır (13,44).

Lizis santrifügasyon yöntemi

Bir tüp içinde antikoagülan ve litik ajanın birleştirilmesiyle oluşur. Kan tüp içine yerleştirilir, santrifüj yapılır ve çökelek alındıktan sonra katı bir besiyerine ekim yapılır. Yoğun emek ister, kontaminasyon riski yüksek ve pahalıdır. Bu sakıncalara rağmen patojenik mayaların üretilmesinde ve dimorfik mantarların izolasyonunda faydalı bulunmuştur (5).

Deri testleri

Alerjik aspergilloz enfeksiyonundan şüphelenildiğinde *Aspergillus* antijen özütlerinden hazırlanan deri testleri kullanılabilir. İki tip reaksiyon görülür; TipI ve TipIII. Erken tip (TipI) reaksiyonunda antijen uygulanmasından 15-20 dakika sonra deride kızarıklık ve şişlik oluşur. TipIII (Arthus) reaksiyonunda 4-10 saat sonra endürasyon gelişir. Bu reaksiyon genelde 24 saat sonra yatıştır. Fakat bazen 72 saat ya da daha uzun süren gecikmiş reaksiyonda görülebilir (64).

Serolojik tanı

Bağışık engelli olmayan hastalarda serolojik tanı

Aspergillus antijenlerine karşı antikorların serolojik olarak gösterilmesi, bağışık engelli olmayan hastalarda görülen iki aspergilloz formu olan aspergilloma veya ABPA' un tanısında faydalı olmaktadır. Her iki tabloda da mantarların dokuda üreme yetenekleri çok sınırlı olmasına karşın, organizmaya karşı güçlü bir humoral yanıt görülmektedir. Bu amaçla, klinik laboratuvarlarda en çok çift yönlü immüdiffüzyon, counterimmünelektroforez, ELISA ve RAST yöntemleri kullanılmaktadır (64,65).

Bir ya da daha fazla zayıf presipitin bantların varlığı ABPA tanısında kabul edilen tanısal kriterlerden bir tanesidir. ABPA' lu hastaların serum örneklerinde devamlı olarak yüksek düzeyde IgG ve IgE antikorları bulunmaktadır. Aspergillomalı hastaların serum örneklerinde de özellikle IgG1 ve IgG2 alt tipleri saptanmaktadır (64).

Son zamanlarda biyokimyasal prosedürler ile saflaştırılan *Aspergillus fumigatus* antijenleri ile immünolojik çalışmalar bildirilmiştir. İn vitro ortamdaki kültürlerden çok miktarda saf antijen elde edilmesindeki zorluklar yanında, çok düşük miktarlardaki kontaminasyonun bile yanlış pozitif sonuçlara yol açmasından dolayı; bugün saf rekombinan antijenlerin elde edilmesi için moleküler biyoloji tekniklerinden yararlanılmaktadır (65).

Atmosferden devamlı inhale edilen konidiyaların inhalasyonuna bağlı olarak herkeste *Aspergillus* türlerine karşı tespit edilebilir düzeyde antikorların oluştuğu düşünülmektedir (98).

Bağışık engelli hastalarda serolojik tanı

Bağışıklık sistemi sağlam konakların tersine, bağışık engelli hastalarda dokularda *Aspergillus fumigatus* üremesi ile anti-*Aspergillus* antikor titresinin artımı arasında bir korelasyon yoktur. Gerçekten, bağışık engelli kişilerde *Aspergillus* türlerine karşı antikorların varlığı, invaziv bir enfeksiyondan çok bağışık baskılayıcı tedavi öncesi oluşan antikorları göstermektedir. Antikor titresindeki artış İA' dan iyileşmeye işaret ederken, antikoru olmaması veya azalan bir antikor düzeyinin gözlemlenmesi kötü prognozu düşündürmektedir. Dolayısıyla, İA' da antikor düzeyinin gösterilmesi tanısal değil, prognozu değerlendirmek amaçlı kullanılabilir (65).

İnvaziv aspergillozun serolojik tanısı; serum, idrar ve BAL gibi biyolojik sıvılarda dolaşımdaki antijenlerin gösterilmesine dayanmaktadır (31). İA' lu hastaların serumundaki

antijenlerin varlığı ilk kez 1979 yılında gösterilmiş olmasına rağmen, bugüne kadar tanımlanan farklı antijen sayısı az olmuştur (97).

Galaktomannan; deneysel olarak enfekte edilen hayvanlardan ve İA' lu hastalardan elde edilen ilk antijen olup, dokuda *Aspergillus* türlerinin büyümesi sırasında salınan bir hücre duvar polisakkarididir. EIA, RIA ve LA testlerini içeren çok sayıda teknik İA' lu hastaların vücut sıvılarında galaktomannan antijenini tespit etmek için değerlendirilmiştir. Ancak düşük tespit limitleri (5-15 ng/ml) nedeni ile rutin kullanımları sınırlı kalmıştır (47,87). Stylen ve arkadaşlarınca geliştirilen sandviç ELISA yöntemi rat monoklonal antikoru EB-A2' yi kullanmaktadır (Platelia *Aspergillus* Bio-Rad, Marnes La-Coquette, France) (112). Aspergillozun klinik belirtilerinden ortalama 6-14 gün önce dolaşımdaki galaktomannan tespit edilebilir (108). Dolaşımdaki GM konsantrasyonu fungal doku hasarıyla uyumludur ve bu yüzden tedaviye cevabın izlenmesinde de kullanılabilir (119). Lösemili hastalar ya da kök hücre nakli alıcılarıyla yapılan birçok çalışmada İA'un tanısında GM testinin kullanımı değerlendirilmiştir. Klinik çalışmalarda yüksek duyarlılık ve özgüllük bulunmuştur (80,92). Ancak pediatrik hastalarda ve yeni doğanlarda yüksek oranda yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun anne sütünde ve formüla mamalarda yüksek konsantrasyonda bulunan *Bifidobacterium bifidum*' un çapraz reaksiyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (99). Barsak endotelyumundaki hasar sonucu diyetdeki GM absorpsiyonu artabilir. Kemik iliği transplantasyonunu izleyen ilk 30 gün ve sitotoksik kemoterapinin başlangıcından sonraki 10 gün yüksek oranda yanlış pozitiflik görülmüştür. Nakil alıcılarında pozitif prediktif değer (PPD) sadece %10 olarak bulunmuştur. Akciğer enfeksiyonunu destekleyen klinik ya da radyolojik bulguları olmayan febril nötropenili hastalarda ya da akciğer dışı aspergilloz

şüphesi olan hastalarda tekrarlayan GM ELISA testinin pozitif prediktif değeri (PPD)' i daha yüksek olarak değerlendirilmiştir (87).

Platelia *Aspergillus* GM ile *Penicillium* spp arasında da çapraz reaksiyon gösterilmiştir. Fakat *Penicillium* türleri nadir insan patojenlerinden olduğundan klinikle çok az ilgili olarak görülmektedir. Ayrıca fungal orjinli ilaçlar örneğin; antibiyotikler (ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit) de yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. *Paecilomyces variotii* ve *Alternaria* spp gibi diğer mantarlarla da çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Aynı zamanda bakteriyemik hastalar ve otoreaktif antikorları olan hastalarda da yanlış pozitif reaksiyonlar gözlenmiştir (4,47,76,87).

Galaktomannan antijen testinin pozitifliği EORTC-IFICG/NIAID-MSG tarafından geliştirilen invaziv fungal enfeksiyon tanı kriterleri içine alınmıştır. Bu testin kullanımı FDA tarafından 2003 yılında onaylanmıştır (8).

Klinik olarak İA' u düşündüren hastalarda pozitif sonuç elde edildiğinde yüksek oranda enfeksiyonu desteklediği düşünülmekte ancak negatif sonuçlar enfeksiyonu dışlamamaktadır (98). Nötropenik olmayan hastalarda testin duyarlılığı tipik olarak düşüktür (%15-30). Bu durumun dolaşımdaki GM düzeyinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Profilaktik ve ampirik olarak kullanılan antifungal ilaçlarda fungal yükü azaltarak antijen düzeyini düşürmektedir (106,127).

Beta glukan: *Aspergillus* hücre duvarının bir diğer komponenti olan 1,3 β -D glukan da immünojen bir molekül olmamasına rağmen tanıda kullanılabilir. β -D glukan çeşitli fungus türlerinin hücre duvarında bulunurken kriptokokal enfeksiyonlarda ve Zigomiçet enfeksiyonlarında ya çok düşük miktarlarda bulunur ya da hiç bulunmaz ayrıca oral kandidoz ve fungal kolonizasyonda da pozitiflik yoktur. Bununla birlikte İA ve kandidozda ayrıca

Fusarium, *Trichosporon*, *Saccharomyces* ve *Acremonium* türlerinin sebep olduğu daha az görülen fakat bağışık engelli hastalarda önemli olan türlerin tespitinde de etkili bulunmuştur (9,87,119).

Tanı sistemi, 'horseshoe crab'dan (Kuzey Amerika Atlantik sahilindeki bir artropod) pürifiye edilen proteolitik koagülasyon kaskadının aktivasyonuna dayalıdır. 1,3 β -D glukanın gösterilmesi için renk esaslı yöntem tanımlanmıştır. Bu deneyin komponentleri, özgül olarak β -1,3 glukana duyarlı hemolenf pıhtılaştırıcı yolu tetikleyen faktör G ve bu proteolitik kaskadın son komponenti tarafından parçalanan kromojen Leu-Gly-Arg-pNA tripeptitten oluşmaktadır. Bu deney β -1,3 glukanın pikogram düzeyinde miktarını ölçebilmekte ve sistemik fungal enfeksiyon sırasında bu polisakkaridin varlığını göstermek için kullanılabilir. Galaktomannanın tersine normal olarak fungal hücreden salınmazlar. Hemodiyaliz altındaki hastalarda, siroz hastalarında, albümin ya da immünglobülin ürünleri alanlarda ve abdominal cerrahi sonrası yanlış pozitiflikler bildirilmiştir (4,87).

Testin klinik değerlendirmelerde özgüllük ve duyarlılık değerleri çok iyi bulunmuştur (özgüllük %87-94, duyarlılık %77-89) (92,95). Ardışık örnekler kullanıldığında testin özgüllüğünün arttığı görülmüştür (86). Pozitif test sonuçları elde edildiğinde doğrulama ve fungal patojenin tanımlanması için diğer testlerin uygulanması gerekmektedir (4).

Moleküler tanı

Antikor tespitindeki kısıtlamalar ve antijen tespiti ile ilişkili duyarlılık problemleri İA' un tanısında moleküler yöntemlerin kullanılmasını teşvik etmiştir (98). Moleküler tanıda genellikle mitokondriyal (50) ve ribozomal DNA genleri gibi çok kopya sayılı genler daha fazla tercih edilmektedir. Bununla birlikte topoizomera II geni gibi farklı hedeflerde denetlenmektedir (51). Ancak mitokondriyal DNA genleri ribozomal DNA genlerine göre daha

fazla değişkenlikler göstermeleri nedeniyle tür ve cins düzeyindeki tanımlamalar için uygun değildir (101).

Aspergillozun moleküler tanısıyla ilgili literatürde klasik PZR, nested PZR, gerçek zamanlı PZR, PZR-EIA, insitu hibridizasyon gibi birçok yöntemle başvurulmuştur (17,100,102,129). Bu yöntemlerle klinik örneklerden aspergillozun hızlı moleküler tanısı yapılabilir. Henüz standart bir PZR yöntemi yoktur. Bu nedenle EORTC/MSG tanı kriterleri içine alınmamıştır. Pasma, serum, doku örnekleri, BAL, balgam gibi çok çeşitli klinik örnekler kullanılmıştır. İlk çalışmalar DNA' nın BAL' dan elde edilmesine yöneliktir. Moleküler tanıda hem yalancı pozitifliklere hem de yalancı negatifliklere rastlanılmaktadır. Konidyumların solunum havasında yoğun olarak bulunmasından dolayı yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilir. Geçekten de sağlıklı kişilerden elde edilen BAL örneklerinin %25 kadarı PZR ile pozitif çıkabilmektedir (65). Kan örneklerinin steril koşullarda hava geçirmeyen tüplere alınması gerekmektedir. Ancak laboratuvar ortamında amplikonlara bağlı kontaminasyonlarda gelişebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı DNA eldesi sırasında negatif kontrolle çalışılması otomatik ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması ve amplifikasyon için gerçek zamanlı PZR yönteminin tercih edilmesi önerilmektedir (17).

Gerçek zamanlı PZR, PZR amplifikasyonunu görünür hale getirme olanağı sağlayan floresan işaretli probalar veya şelat edici boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olduğu anında izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir Gerçek zamanlı PZR hata olasılığını azaltır, kantitatif sonuç verir, pozitif/negatif sorusunu hızla yanıtlar. Reaksiyonun optimizasyonu daha kolaydır, jel hazırlama, jele yükleme gibi basamakları ortadan kaldırır. Belirleme yöntemi olarak özel boyalarla işaretli probaların kullanıldığı Taqman[®], moleküler beacons, FRET[®], Scorpions[®], Amplifluor[™] gibi yöntemler ya da SYBR Green[®], etidyum bromür gibi özgül olmayan şelat edici boyaların kullanıldığı yöntemler kullanılır (20).

Yalancı negatiflikler *Aspergillus* DNA' sının beş dakikadan daha az olan yarı ömrü , DNA' nın geçici olarak kanda bulunması, antifungal profilaksi nedeni ile fungal yükün azalması, ekstraksiyonun etkinliği, amplifikasyonun başarısızlığı gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca sonuçların yorumlanması da çok önemli olmaktadır (124).

PZR temelli amplifikasyona dayanan teknikler klinik örneklerde genellikle 1-10 fg (1-5 cfu/ml) mantar DNA' sını saptayabilmektedir (31).

Moleküler testlerin birden fazla örnekte yapılması ve sıklığında haftada iki kez olması gerektiği vurgulanmıştır(101).

Bu yöntemlerle İA' un 6-8 saat içinde tanısı sağlanabilmektedir. Ancak çalışmalarda sınırlı sayılardaki hastalardan alınan örnekler değerlendirilebilmiştir. Bu nedenle PZR' nunun tanısal değerini saptamak için prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (98).

Hayvan modelleri

İnvaziv aspergilloz fareler, tavşanlar, sıçanlar, domuzlar, inekler, ördekler ve maymunlarda gösterilmiştir. *Aspergillus* çalışmalarında hayvan modelleri, antifungal ilaçların etkinliğinin test edilmesi (39,41), tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi (72,105) ve *Aspergillus* enfeksiyonlarının patogenezinin araştırılması (14,25) amacıyla kullanılmaktadır. Ancak araştırmacılar arasında modeller ile ilgili bir fikir birliği yoktur. Hayvan seçimi (suş, ağırlık ve cinsiyet), nötropeninin oluşturulması (doz, ürün, enjeksiyon sıklığı), konidiya konsantrasyonu ve enjeksiyon yolları açısından düşünce farklılıkları mevcuttur (90).

Kullanılan hayvan modellerindeki farklılıklara rağmen faydalı birçok sonuç elde edilmiştir (65).

- (I) Diğer fungal patojenlerde olduğu gibi, konidiya dozu ve öldürücülüğü arasında direkt bir ilişki bulunmuştur. Hayvan ağırlığı da önemlidir. Herhangi bir türde,

hayvan ne kadar ağırsa ona göre hastalığın oluşması için verilen konidiya miktarı da artar.

- (II) İA' da enfeksiyonun oluşumundaki farklılıklar ve inflamasyon, kullanılan immünsupresyonun tipi ile ilişkili bulunmuştur. Kolay kullanılması nedeniyle İA' da fareler ve tavşanlarda bağışıklık sisteminin baskılanması için kortizon ve siklofosfamidler tercih edilmektedir. Gebe hayvanlarda ilaçsız olarak İA gelişebilmektedir.
- (III) Genetik özellikleri göz önünde bulundurulmaksızın, pekçok fare suşu eşit olarak *Aspergillus fumigatus*' a karşı duyarlı bulunmuştur. C57BL/6, BALB/c veya CD2F1 farelerde aynı duyarlılık bulunurken sadece DBA2 gibi C5 defektli farelerin konidyaların giriş yoluna bakılmaksızın tamamıyla *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonuna karşı duyarlı oldukları rapor edilmiştir.
- (IV) İntranazal inokülasyon ile enfeksiyon doğal yolla oluşanlarla benzerlik gösterip, intravenöz yoldan daha uygun bulunmuştur.
- (V) Hayvan modelindeki önemli problem enfeksiyonun insandakilere uyum göstermemesidir. Deneysel olarak oluşturulan aspergilloz aynı zamanda yüksek konsantrasyonda verilen konidya ile elde edilen akut bir enfeksiyondur. İnsanlarda ise çoğunlukla az miktarda konidyaya devamlı ve azar azar maruz kalınması sonucunda ortaya çıkmaktadır.
- (VI) ABPA' lu hayvan modelleri geliştirilmiş ve bu klinik sendromun incelenmesi açısından faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Canlı olmayan antijenik ekstraktların (çözünür veya partiküler) tekrarlayan inokülasyonları (intraperitoneal veya intranazal) ile geliştirilmiştir.

Tedavi

İnvaziv aspergilloz olgularında tedavinin başarısı erken tanı, erken agresif sistemik antifungal tedavi ve bağışık yetmezliğin düzeltilmesine bağlıdır (61,127). *Aspergillus* türleri arasında antifungal ajanlara direnç giderek artmaktadır. İlaç seçiminde en önemli kriter fungisidal veya fungistatik ajanların seçimidir. Özellikle nütropenik vakalarda seçilecek ilacın fungisidal olması hastanın yaşaması açısından çok önemlidir. İA tedavisinde kullanılabilecek ilaçlar arasında amfoterisin B ve lipid kombinasyonları, azol türevleri ve ekinokandin türevleri (kaspofungin,mikafungin ve anidulafungin) sayılabilir (3).

Poliyen grubu ilaçlardan amfoterisin B deoksikolat İA tedavisinde onaylanmış standart ilaçtır. İA’ da önerilen tedavi dozu 1-1.5 mg/kg/gündür. Tedavinin sonlandırılması altta yatan hastalığın durumu, aspergillozun yaygınlığı, nütropeninin düzelmesi, immünsupresyonun derecesi gibi birçok faktöre bağlıdır. Başarılı tedavi için ilk iki hafta yüksek doz verilmesi, cevap alınamazsa başka bir ilaca geçilmesi önerilmektedir (61).

Amfoterisin B’ ye bağlı gelişen toksisiteyi azaltmak için amfoterisin B’ nin lipid ve lipozomal formülasyonları kullanılmaktadır. Bu ajanlar daha az nefrotoksiktir ve infüzyona bağlı reaksiyonlar daha nadir görülmektedir (39,78).

Yeni azol türevlerinden vorikonazol *Aspergillus’* a karşı fungisidal etkilidir. En önemli yan etkisi siklosporin, takrolimus ve sirolimus gibi bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar arasında görülen etkileşim ve vorikonazol kullanan hastaların yaklaşık %30’ unda ortaya çıkan görme bozukluklarıdır (3). Mayıs 2002’ de FDA tarafından İA’ da başlangıç tedavisi olarak onay almıştır (110).

Bir diğer azol türevi olan itrakonazol ve yeni azol türevlerinden posakonazolün İA’ da kurtarma tedavisinde yaklaşık %40 civarında etkin olduğu gösterilmiştir. İtrakonazolün ülkemizde sadece kapsül formülasyonu vardır ve gastrointestinal absorpsiyonu güvenilir

değildir. Posakonazol ülkemizde henüz ruhsatlanmamıştır ve dünyada da sadece oral süspansiyon biçiminde kullanılmaktadır (3).

Ekinokandin grubundan kaspofungin asetat intravenöz olarak günde tek doz kullanılan fungisidal etkili ilaçtır. Şubat 2001’ de FDA tarafından diğer tedavilere yanıtız veya tolere edemeyen İA olgularında kullanımı onaylanmıştır (110).

İA’ un yüksek mortaliteye sahip olması ve eldeki ilaçlarla tam olarak tedavi edilememesi nedeniyle kombine ilaç kullanımı gündeme gelmiştir. Bu konuda kesin bir görüş birliğı yoktur. Azol ve ekinokandinler hücrenin farklı bölgelerini (hücre membranı ve hücre duvarı) hedef aldıklarından vorikonazol ve kaspofungin kombinasyonu bazı olgularda kullanılmaktadır (73). Ancak kombinasyon antifungal tedavi ile antifungal öldürme ve klinik etkinlik azalabilir, ilaç etkileşimleri ve toksisite potansiyeli artabilir ve kanıtlanmış bir klinik yarar gösterilmediğı halde ilaç maliyetlerini ciddi boyutta arttırabilir. Bu nedenle kombinasyon tedavisi günümüz koşullarında standart bir yaklaşım olarak kabul edilmemelidir (116).

Nötropeni, İA için en önemli predispozan faktörlerden biridir ve eğer düzeltilmezse hastalığın prognozunu son derece olumsuz yönde etkiler, ancak İA’ u olan nötropenik hastalarda bağışıklık sisteminin düzeltilmesi için koloni stimulan faktör kullanımı veya lökosit transfüzyonu uygulanması rutin kullanımı önerilen yaklaşımlar değildir (3).

Tedavide yeni denenen yöntemler arasında umut verenlerinden biri de antikor kullanımıdır. Bunlar içinde Mycograb® ismiyle bilinen *Candida* ısı-şok proteini 90 (Hsp90)’ a karşı geliştirilen bir insan rekombinant antikorunun antifungal ajanlarla kombinasyonu klinik çalışmalarda denenmektedir (103).

Cerrahi tedavi: *Aspergillus* sinüziti, serebral miçetoma, enfekte prostetik kapak ve lokalize pulmoner enfeksiyon varlığında cerrahi olarak enfekte ve nekrotik dokuların eksizyonu başarı sağlamaktadır (110,127).

Korunma: İA enfeksiyonlarında mortalite ve morbidite çok yüksek olduğundan risk altındaki hastaların *Aspergillus* sporları ile temas etmesinin önlenmesi hastalıktan korunmada önemlidir. Bu nedenle yüksek riskli hastaların inşaat alanlarından uzak tutulması, HEPA filtresi içeren odalarda tutulmaları, bu odalarda çiçek bulundurulmaması önerilmektedir (55). Nötropenik hastalarda amfoterisin B nazal spreyi sinüs ve solunum yolu kolonizasyonunu önlemede yararlı bulunmuştur (128).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇLER

Laboratuvar Araçları

Etüv (Elektro-mag, Türkiye)

Otoklav (Sanyo, Japonya)

Pastör fırını (Elektro-mag, Türkiye)

Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)

Mikropipetler ve uçları (Beta Pette™, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

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

ELISA okuma cihazı (Elx800, BioTek, ABD)

İnkübatörlü ELISA okuma cihazı (BioTek Synergy HT, ABD)

Santrifüj cihazı (HERMLE Z380, Almanya)

Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

Platelia® *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa)

Fungitell™ (CAPE COD, ABD)

Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

Cam eşyalar, özeler, bistüriler

Kimyasallar ve Besiyerleri

Sabouraud dekstroza agar (Oxoid, İngiltere)

Mikolojik pepton 10.0 g/l

Glukoz 40.0 g/l

Agar 15.0 g/l

Laktofenol pamuk mavisi (Merck, Almanya)

Metilen mavisi

Gram boyası

Gentamisin (İ.E. ULAGAY, Türkiye)

Ampisilin (Mustafa Nevzat, Türkiye)

5 Fluorourasil (Biosyn, Almanya)

Sodyum lauril sülfat (%3)

KOH (%120)

Buzda soğutulmuş etanol (%75)

Celite 545

NaNO₂ (%5 [wt/vol])

KHSO₄ (%5 [wt/vol])

Amonyum sülfat (%12.5[wt/vol])

3-metil 2-tiazolon hidrazon HCl monohidrat

FeCl₃-6H₂O (%0.83 [wt/vol])

Glukozamin (10-g/ml)

YÖNTEM

İnokulumun hazırlanması

Aspergillus fumigatus standart suşu Sabouraud dekstroz agar plaklarında 27°C’ de 7 gün üretildikten sonra plak yüzeyleri steril fosfat buffer salin (PBS, pH 7.4)) ile iki kez yıkanmış ve oluşan konidyal süspansiyon spektrofotometrede sayılmıştır. Süspansiyona %0.1’ lik Tween 80 eklenip vortekslenmiştir (105).

Hayvan modelinin oluşturulması

Deney hayvanı olarak 160-180 gram ağırlığında, dişi, Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır

Deney koşulları, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde, etik kurul yönergesine uygun şekilde tamamlanmıştır.

Grup 1: Sağlıklı kontrol grubu (6 adet)

Grup 2: Nötropeni kontrol grubu (10 adet)

Grup 3: Akciğer aspergilloz grubu (35 adet)

Nötropeni oluşturulması

5-Fluorourasil 200 mg/kg tek doz olarak, Grup 1 dışındaki tüm hayvanların deri altına verilerek nötropeni oluşturulmuştur (13).

Akciğer aspergillozunun oluşturulması

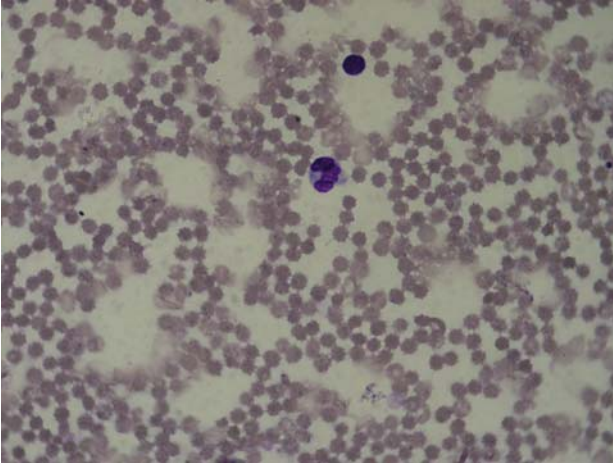
Nötropeni oluşturulması için uygulanan enjeksiyonu takip eden beşinci günde, deney hayvanlarında aspergilloz oluşturulması için 1×10^8 konidya/ml (65) *Aspergillus fumigatus* konidyası içeren süspansiyon, tek kullanımlık oksijen maskesinin 'nebülizatör' haznesine yerleştirilmiş ve her denek için 10 ml'lik süspansiyon beş dakika boyunca deneklerin solunum yolundan verilmiştir (111) (Şekil 1). Aynı gün bakteriyel süperenfeksiyon gelişimini önlemek için kas içinden tek doz 40 mg/kg ampicilin, 6 mg/kg gentamisin enjeksiyonu yapılmıştır (102).



Şekil 1. Deney hayvanlarına *Aspergillus fumigatus* konidiasının solunum yolundan verilmesi

Nötropeni kontrolü

Feda gününde alınan kan örneklerinden yapılan periferik yayma örneklerinde nadiren nötrofiller görülebilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Nötropeni kontrolü için alınan kan örneklerinden hazırlanan periferik yaymanın mikroskopik görüntüsü (Giemsa 100X)

Deneyin sonlandırılması ve alınan dokular

Denekler, enfeksiyonun 7. gününde kas içinden verilen 100mg/kg dozunda ketamin HCl anestezisi altında, kalpten kan alımı yolu ile feda edilmiştir. Her denekten bronkoalveoler lavaj örnekleri, kan ve serum örnekleri ile akciğer doku örnekleri alınmıştır.



Şekil 3. Akciğer aspergillozu oluşturulmuş deney hayvanlarında akciğerlerin makroskopik görünümü

Alınan örneklerle yapılan işlemler

EDTA' lı tüplere alınan kan örnekleri *Aspergillus* DNA'sının aranması için PZR işlemi yapılmak üzere ayrılmıştır. Heparinli tüplere alınan kan örneklerinin serumu beta glukon ve galaktomannan varlığının araştırılması için saklanmıştır. Bazı deneklerden lizis santrifügasyon kültürü yapılabilmesi için kültür tüplerine kan örnekleri alınmıştır.

Bronkoalveolar lavaj örnekleri, PZR ve beta glukan araştırılması için ayrılmıştır. En son olarak da akciğer dokusu birkaç parçaya ayrılarak, direkt mikroskopi, kültür, patolojik inceleme, kitin düzeyinin belirlenmesi ve dokudan PZR yapılması için paketlenmiştir. Bütün örnekler uygun ambalajlar içinde, işlem gününe kadar -20°C’de saklanmıştır.

Direkt mikroskopi

Doku örneklerinden hazırlanan direkt preperatlarda mantar elemanları aranmıştır.

Kültür

Lizis santrifügasyon sistemiyle (ISOLATOR™10 WAMPOLE, OXOID Blood Culture Systems, İngiltere) alınan kan örnekleri ve akciğer doku örnekleri Sabouraud dekstroza agar (SDA) plaklarına ekilerek 24 ve 37°C’ de inkübe edilmiştir.

ISOLATOR10 kan kültür sisteminin prensipleri: Tüpün içindeki materyal kandaki lökosit ve eritrositleri parçalar ve koagülasyon oluşumunu engeller. İçindeki ajanlar; 1.Pürifiye saponin. Hücreleri parçalar, mikroorganizmalar üzerine toksik etki göstermemektedir.

2.Saponinin köpükleşme eğilimini engelleyen polipropilen glikol 3.Sodyum polyenetolsülfonat. Kanın bakterisidal niteliğini nötralize eder, antikoagülan gibi etki eder.

Patolojik inceleme

Doku örnekleri periyodik asit shift (PAS) veya gomori gümüşleme boyaları ile boyanarak mantarlara ait hifler aranmıştır

Dokuda kitin ölçümü

- 1.Akciğer homojenatları santrifüj edilmiştir.
- 2.Pelletler sodyum lauril sülfatla karıştırılmış ve 100°C’de 15 dakika bekletilmiştir.
- 3.Santrifüjden sonra pelletler distile su ile yıkanmıştır.
- 4.Pelletler KOH ile karıştırılmış ve sonra 130°C’de 60 dakika bekletilmiştir.
- 5.Soğuduktan sonra buzda soğutulmuş etanol eklenmiştir.

6. Tüpler 15 dakika buz üstünde tutulmuş ve Celite 545 eklenmiştir.
7. Santrifüjden sonra pelletler yıkanmış ve NaNO_2 ve KHSO_4 içeren solüsyonla karıştırılmıştır.
8. Örnekler 15 dakika hafifçe karıştırıldıktan sonra santrifüj edilmiştir.
9. Üstte kalan sıvı alınmış, amonyum sülfat ve 3-metil 2-tiazolon hidrazon HCl monohidrat eklenmiştir.
10. Karışım 100°C 'de 3 dakika ısıtılmıştır.
11. Soğuduktan sonra $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eklenmiştir.
12. Yirmibeş dakika sonra 650 nm' de optik dansite ölçülmüştür.
13. Glukozamin ($10\mu\text{g/ml}$) standart olarak kullanılmıştır.

Kitin aktivitesi dokunun 130°C 'de KOH içinde bekletilmesi ile ortaya çıkan kitosanın, HNO_2 ile aldehit oluşturmaları ve oluşan aldehitin Fe^{+3} bileşiği ile reaksiyonunun, spektrofotometrede okunduktan sonra glukozamine oranlanması ile hesaplanmıştır (127).

ELISA ile *Aspergillus* antijeninin aranması

1-Testin prensibi

Platelia® *Aspergillus* kiti (Biorad, Fransa) serumda galaktomannanı saptayabilen immünoenzimatik sandviç mikrokaplama yöntemidir. Testte tavşan monoklonal antikorları EBA-2 kullanılır. Test 0.5-1 ng/ml galaktomannanı saptayabilecek hassaslıktadır.

2-Testi uygulamadan önce yapılacak işlemler

- a-ELISA çukurcukları paketinden çıkarılmış ve oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir.
- b-Yıkama solüsyonu (Tris NaCl Ph 7,4 buffer, %1 Tween 20 ve %0.01 sodyum metiolat) distile su ile 10 kat sulandırılmıştır.
- c-Kontrol serumları (pozitif, negatif ve eşik serumu) 1 ml steril su ile sulandırılıp iyice karıştırılmıştır.

d-Konjugat (peroksidaz ile işaretlenmiş anti-galaktomannan monoklonal antikorları) kullanılmaya hazırdır.

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

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

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

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

3-Testin uygulanışı

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

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

c-Aynı işlemler kontrol serumları için de yapılmıştır.

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

e-ELISA plağının üzeri yapışkan film ile kaplanmıştır.

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

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

h-ELISA plağında yıkama solüsyonunun kalmamasına dikkat edilmiştir.

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

j-Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir.

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

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

4-Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

a-Cut-off değeri eşik kontrol serumunun optik dansitesi olarak belirlenmiştir.

b-Her serum için indeks hesaplanmıştır:İndeks=örneklerin optik danitesi/eşik serumun optik dansitesi

İndeks ≥ 1.00 pozitif olarak değerlendirilmiştir.

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

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

Pozitif indeks= $OD \text{ pozitif kontrol} / OD \text{ kontrol eşik serum} > 2$

Negatif indeks= $OD \text{ negatif serum} / OD \text{ kontrol eşik serum} < 0.5$

Beta glukan testinin çalışılması

Mantarların hücre duvarında bulunan beta glukanın araştırılması için Fungitell™ (CAPE COD, ABD) glukan ölçüm kiti kullanılmıştır. Bu kit proteaz zimojen temeline dayalı olarak çalışır ve kinetik olarak ölçüm yapılabilen kolorimetrik bir prosedürü içermektedir.

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

1-Test uygulanmadan önce yapılacak işlemler

a-Glukan standartlarının hazırlanması:

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

Standart 2: 400 µl solüsyon 1 + 400 µl RGW (50 pg/ml glukan)

Standart 3 : 400 µl solüsyon 2 + 400 µl RGW (25 pg/ml glukan)

Standart 4: 400 µl solüsyon 3 + 400 µl RGW (12.5 pg/ml glukan)

Standart 5: 400 µl solüsyon 4 + 400 µl RGW (6.25 pg/ml glukon)

Standart 6: RGW solüsyonu (glukon içermemektedir).

b-Serum işleme solüsyonunun hazırlanması

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

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

2-Testin uygulanışı

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

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

c-Standartlardan 25' er µl dağıtılmıştır.

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

e-Pleyt 5 saniye çalkalanmıştır.

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

3-Sonuçların hesaplanması ve yorumlanması

Veriler toplandıktan sonra analizleri yapılmıştır. 0-40 dakika arasındaki her nokta için optik dansite değişiminin ortalama hızı hesaplanmış ve test edilen her örneğin glukon konsantrasyonu kaydedilmiştir.

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

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

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi

1-DNA'nın eldesi

Alınan BAL, doku ve kan örneklerinden mantarlara ait DNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edilmiştir.

1.Doku örnekleri önce steril petriler içinde bistüri yardımıyla çok ufak parçalara ayrılmıştır.

2.Örnekler steril 1.5 ml'lik ependorflar içine aktarılmıştır.

3.Tüplere doku parçalama solüsyonundan 100 µl eklenmiş ve pipet yardımı ile homojenize edilmiştir.

4.Her tüpe 10 µl Proteinaz K konulup 37 °C' lik etüvde yaklaşık 10 saat bekletilmiştir.

5.Dokuların tamamen erimesi için tüplere tekrar 100 µl doku parçalama solüsyonu ve 5 µl Proteinaz K konulmuş ve 65 °C' de 2 saat inkübe edilmiştir.

6.Takiben 95 °C' de 10 dakika bekletilmiştir.

7.Tüpler bir dakika 10000x rpm' de santrifüj edilmiş ve üst sıvı DNA saflaştırılmasına alınmıştır.

EDTA' lı tüplerdeki kan örnekleri ve kanlı görünen BAL örneklerine, saflaştırmaya alınmadan önce eritrositlerin uzaklaştırılması için RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyon protokolü uygulanmıştır.

1.Örneklerden 300 µl alınıp 1.5 ml' lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.

2.Üzerlerine 1.2 ml RBC solüsyonundan eklenmiş ve pipetaj ile iyice karıştırılmıştır. Sonra 5 dakika -20 °C' de bekletilmiştir.

3.Üç dakika oda sıcaklığında 10000x rpm' de santrifüj edilmiştir.

4.Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle alınmıştır.

5.Çökelek rengi kırmızı ve daha koyu ise 2. ve 3. basamaklar tekrar edilmiştir.

2-Saflaştırma basamakları

1.Yaklaşık 100 µl' lik örnekler üzerine 400 µl DNA lizis bağlama solüsyonundan eklenmiş ve vortekslenmiştir.

2.Karışım 65 °C' de 10 dakika , +4 °C' de 2 dakika bekletilmiştir.

3.Spin santrifüj yapıldıktan sonra üzerine 500 µl DNA çöktürme solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

4.Onbeş dakika 13000x rpm' de santrifüj edilmiştir.

5.Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

6.Beş dakika 13000x rpm' de santrifüj edilmiştir.

7.Üst kısım pipetle tamamen alınmış ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.

8.20 µl DNA dilüsyon solüsyonundan konulmuş, vortekslenip spin santrifüj edilmiştir.

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

3-DNA' nın çoğaltılması ve gösterilmesi

Elde edilen DNA' lar önce sıçan beta-aktin genini hedefleyen primerler kullanılarak çoğaltılmış ve örneklerde DNA varlığı kontrol edilmiştir. *Aspergillus* DNA' sının gösterilmesi için *Aspergillus*' a özgül primer-probe karışımı ile gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır (Tablo III).

Tablo III.PZR için kullanılan primer ve prob dizileri (71)

Hedef	Primer veya Prob dizisi
β-aktin	5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3 (F)
β-aktin	5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3 (R)
Panfungal primer (18SrRNA geni)	5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG (F) 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG (R)
Aspergillus 640 florofofor prob	5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C
Aspergillus floresan prob	5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC

Gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (Real Time PCR- LightCycler–Roche, ABD) yöntemi kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi için ‘LightCycler PCR ve Detection System’ (Roche Diagnostics) kullanılmıştır. PZR cam kapillerler içinde gerçekleştirilmiştir. Çoğaltmanın tespiti için üreticinin (Tenay, Türkiye) tarif ettiği şekilde ‘LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Kit’ ve özgül primer-probe karışımı (Tıbbi Molbiol, Almanya) kullanılmıştır. PZR karışımı (20 μ l) *Taq* polimeraz, 1x LightCycler tepkime tamponu, 3 mM magnezyum klorid ve 0.5 μ M primerleri içermiştir. Şablon DNA, 20 μ l tepkime karışımına 1 ng konsantrasyonunda eklenmiştir. Örnekler paralel olarak şu şekilde çalıştırılmıştır: 45 tekrarlanmış denatürasyon döngüsü (95 °C’de 30 sn), sertleştirme (62 °C’de 20 sn), zincir ekstansiyonu (72 °C’de 25 sn). Bu basamağı 40 °C’den 95 °C’ye erime-eğrisi analizi ve sonra 40°C’de soğutma işlemi takip etmiştir. PZR 45 dakikada tamamlanmıştır. PZR süreci daha sonra çift-zincirli DNA tespiti için floresan ölçme yoluyla görüntülenmiştir.

İstatistik: Veriler SPSS 10.0 istatistik paket programına girildi. İstatistiksel karşılaştırmada non-parametrik testler olan dört gözlü düzende (2x2) Yates düzeltilmeli ki-kare (χ^2) testi ile Fisher kesin ki-kare testi, korelasyon analizi için ise Pearson korelasyon analizi testi kullanılmıştır. Kitin düzeylerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmış, $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Deney grupları

Grup I: Sağlıklı kontrol grubu (6 sıçan)

Grup II: Nötropeni kontrol grubu (10 sıçandan 2 tanesi deney sırasında kaybedildi ‘8’)

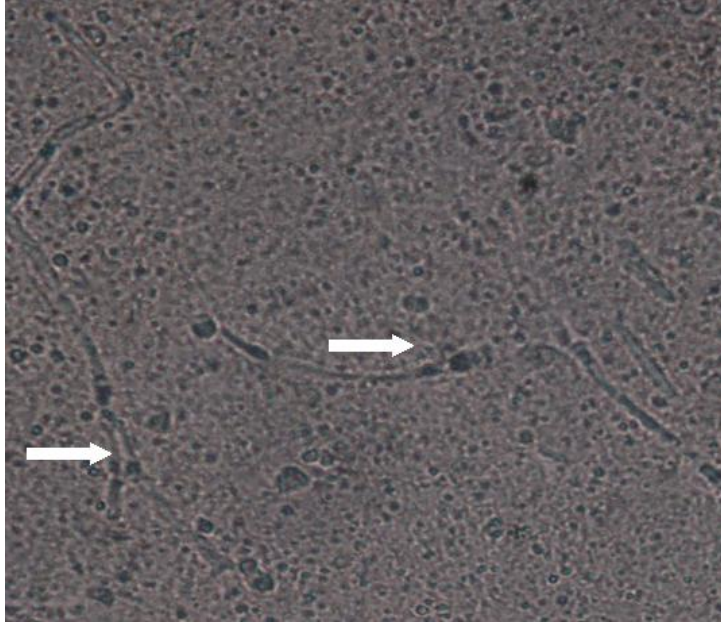
Grup III: Aspergilloz grubu (35 sıçandan 13 tanesi deney sırasında kaybedildi ‘22’)

Kontrol gruplarının sonuçları

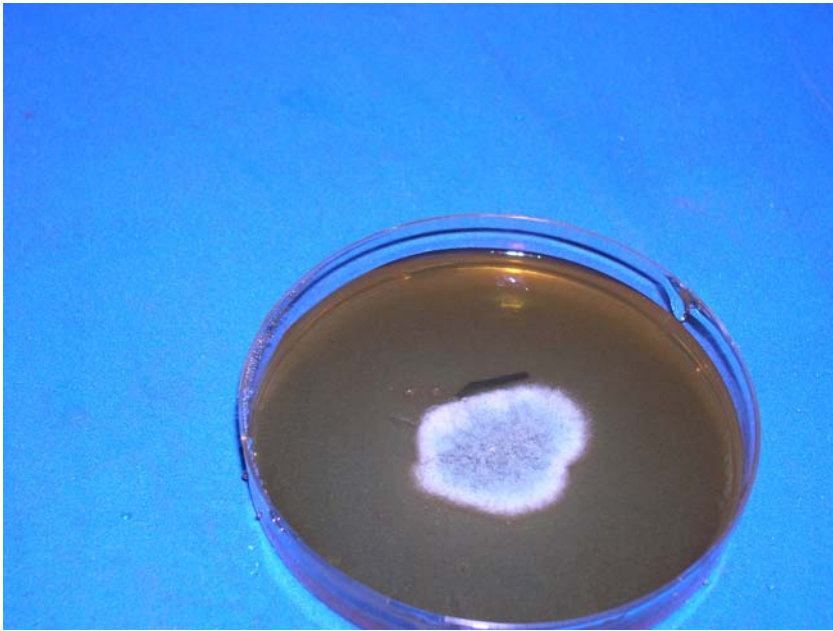
Birinci ve ikinci gruplardan alınan örneklerde direkt mikroskopide ve patolojik incelemelerde mantar elemanları görülmemiştir. Doku örneklerinden yapılan kültürlerde hiçbir üreme olmamıştır. Her iki grupta PZR uygulanan hiçbir örnekte (doku, kan, BAL sıvısı) *Aspergillus* DNA’ sı saptanmamıştır. Galaktomannan (serum) ve β -D glukan (serum ve BAL sıvısı) düzeyleri negatif olarak hesaplanmıştır.

Aspergilloz grubunun sonuçları

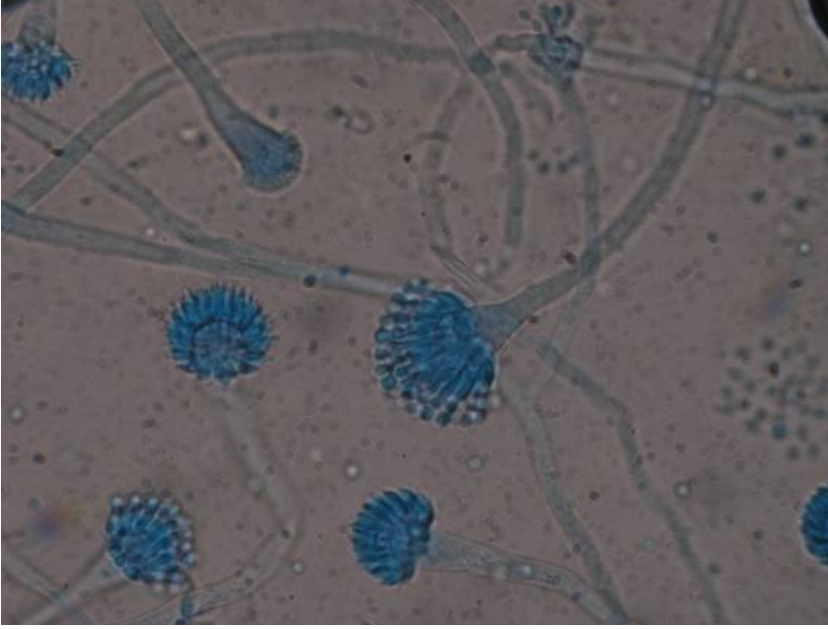
Akciğer aspergillozu oluşturulan 35 sıçandan 13 tanesi deney sırasında kaybedilmiştir. Kalan 22 sıçandan alınan doku örneklerinin 20 tanesinde *Aspergillus fumigatus* kolonileri izole edilmiştir (Şekil 4,5,6). Deneysel olarak enfeksiyon oluşturulan bütün deneklerde patolojik olarak aspergilloz varlığı doğrulanmıştır.



Şekil 4.Doku örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde septalı hiflerin varlığı (40x)



Şekil 5. Akciğer dokusundan üretilen *Aspergillus fumigatus* kolonileri



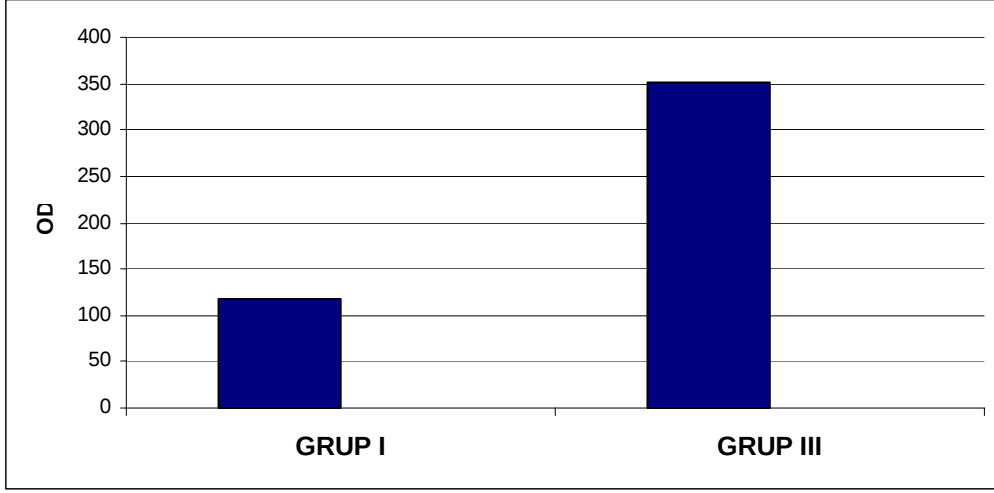
Şekil 6. Kültürde üremiş *Aspergillus fumigatus* kolonilerinin mikroskopik görüntüsü (laktofenol pamuk mavisi, 40x)

Doku kitin düzeyleri

Sağlıklı kontrol grubu ve enfeksiyon grubu arasında kitin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Grup I: Sağlıklı kontrol grubu (118.16 ± 58.60)

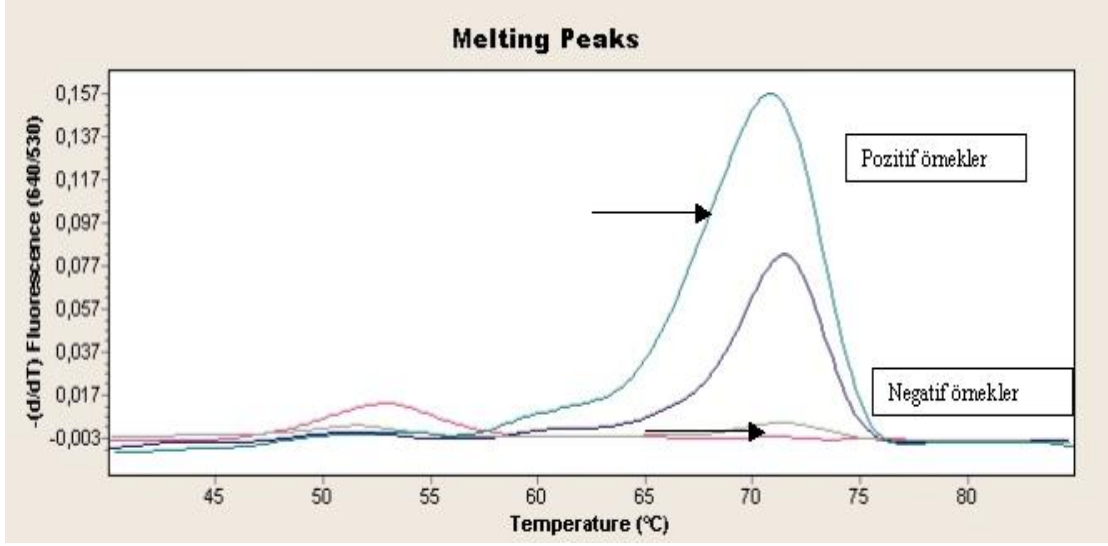
Grup III: Aspergilloz grubu (351.05 ± 84.39)



Şekil 7. Kontrol ve aspergilloz gruplarından alınan doku örneklerinde kitin OD (Optik dansite düzeyleri) ($p < 0.05$)

Gerçek Zamanlı PZR test sonuçları

PZR ile tam kan örnekleri, BAL sıvısı örnekleri ve doku örneklerinde *Aspergillus* DNA'sı araştırılmıştır. 19 tam kan örneğinde *Aspergillus* PZR çalışılabilmiş, 7 tanesinde (%30.7) pozitif bulunmuştur. BAL sıvısı 17 sıçandan alınabilmiş ve miktar azlıkları nedeniyle 12 sinde PZR testi çalışılmış ve 7' sinde pozitif bulunmuştur (%50.8). 22 tane doku örneğinin ise 4' ünde *Aspergillus* DNA' sı pozitif bulunmuştur (%18.1) (Şekil 8, Şekil10).



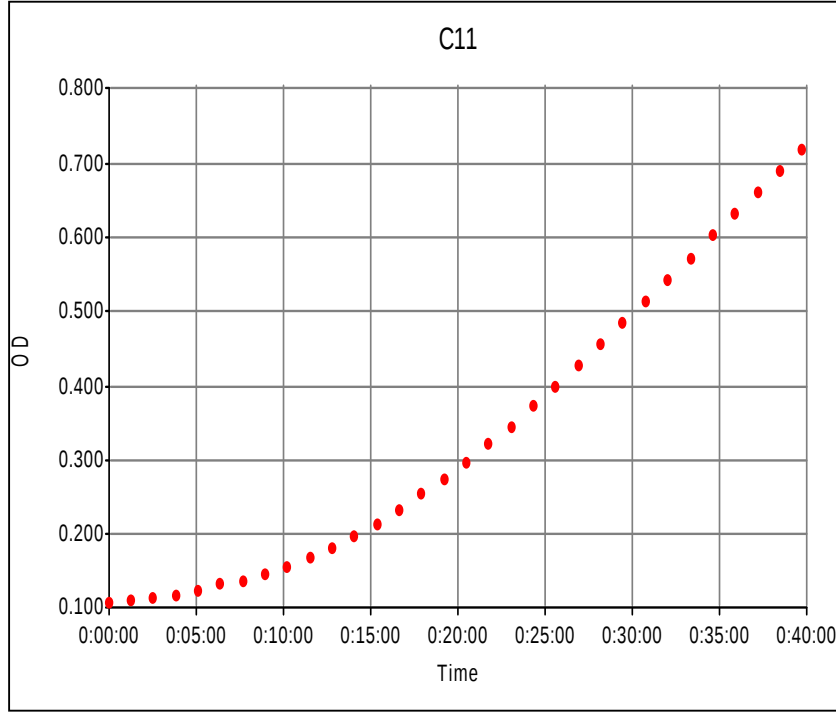
Şekil 8. *Aspergillus fumigatus* DNA'sının bulunduğu ve bulunmadığı örneklerde LightCycler ekranında floresansın gösterilmesi.

Galaktomannan antijeni test sonuçları

Galaktomannan antijen testi 20 serum örneğinde çalışılabilmiş ve 7' sinde pozitif bulunmuştur (%35) (Şekil 10). Pozitifliğe indeks değerinin 1.00' in üzerinde olması durumunda karar verilmiştir.

β Glukan test sonuçları

β glukan aktivitesi 22 serum örneğinde ve 17 BAL sıvısı örneğinde araştırılmıştır. Serum örneklerinin 11' inde (%50), BAL örneklerinin 9' unda (%52.9) pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 9, Şekil 10).

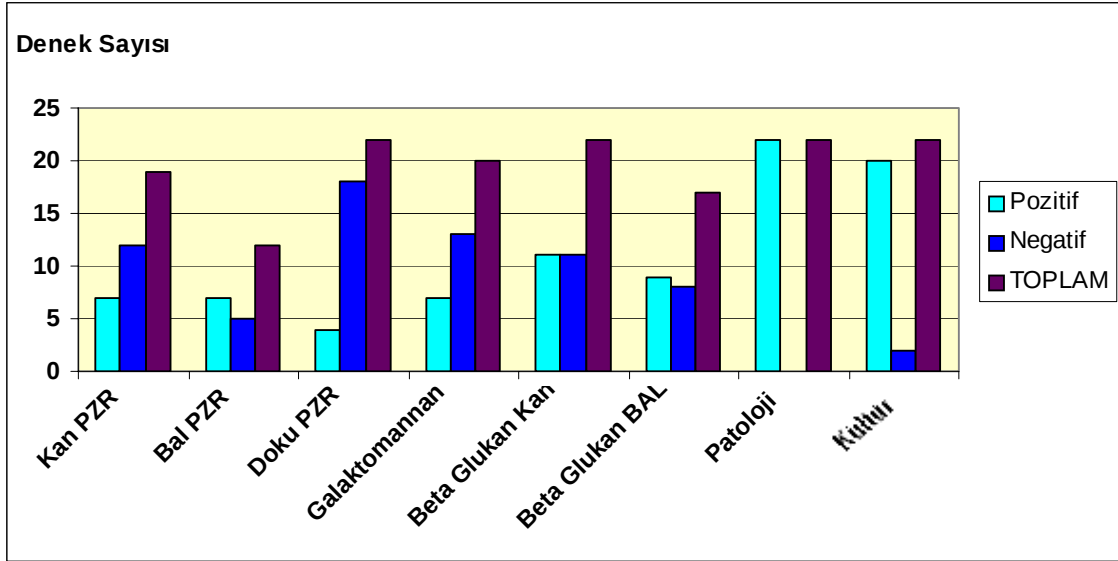


Şekil 9. β glukon pozitif bir örnekte okuyucu ekranında görülen aktivite eğrisi.
($R^2=0,8982$)

Aspergillozlu grupta çalışılan tüm testlerin sonuçları tablo IV' te verilmiştir.

Tablo IV. Aspergilloz oluşturulmuş gruba ait test sonuçları

SONUÇLAR	YÖNTEMLER							Kültür
	Kan PZR	BAL PZR	Doku PZR	Galaktomannan	β Gukan Kan	β Gukan BAL	Patoloji	
POZİTİF	7 (%36.8)	7 (%58.3)	4 (%18)	7 (%35)	11 (%50)	9 (%52.9)	22	20
NEGATİF	12	5	18	13	11	8	-	2
TOPLAM	19	12	22	20	22	17	22	22



Şekil 10. Aspergillozlu gruba ait test sonuçları

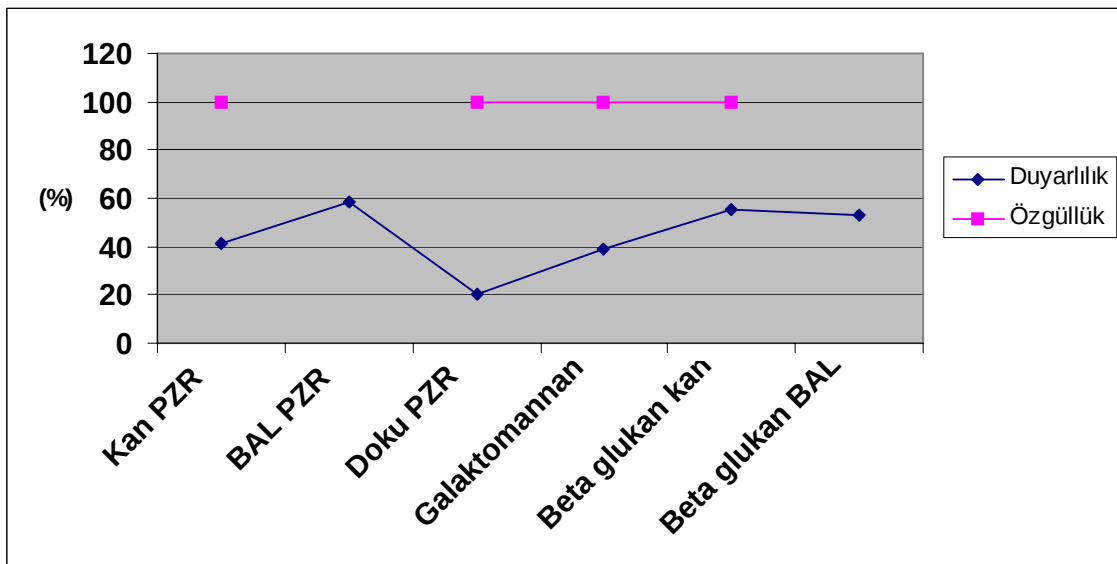
Aspergillozlu grupta çalışılan her test kültürle karşılaştırılarak özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer hesaplanmıştır. Yüzde olarak bu değerler sırasıyla kan örnekleriyle çalışılan PZR' u için 100, 41.2, 100 ve 16.7 olarak bulunmuştur. Kan PZR ve kültür arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.509$). BAL örneklerinde çalışılan PZR' u için duyarlılık %58.3, PPD %100 olmuş, özgüllük, NPD ve p değerleri hesaplanamamıştır. Akciğer doku örneklerinden çalışılan PZR' nunun özgüllük, duyarlılık, PPD ve NPD' i sırasıyla yüzde olarak 100, 20, 100 ve 11.1 olarak bulunmuştur. Kültürle doku PZR testi arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1.000$). Galaktomannan testi için yüzde olarak özgüllük 100, duyarlılık 38.9, PPD 100, NPD 15.4 hesaplanmış, kültürle galaktomannan testi arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.521$). Serum örneklerinin kullanıldığı β glukan testi için özgüllük,duyarlılık, PPD ve negatif prediktif değerler yüzde olarak sırasıyla 100, 55, 100 ve 18.2 olarak hesaplanmıştır. Kültür ve β glukan kan testi

arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.476$). Bronkoalveolar lavaj örnekleriyle çalışılan β glukan testi için duyarlılık %52.9, PPD %100 elde edilmiştir (Tablo V, Şekil 11).

Tablo V. Aspergilloz grubunda çalışılan testlere ait özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve p değerleri

TESTLER	Özgüllük %	Duyarlılık %	PPD %	NPD %	p
Kan PZR	100.0	41.2	100.0	16.7	0.509
BAL PZR	x	58.3	100.0	x	x
Doku PZR	100.0	20.0	100.0	11.1	1.000
Galaktomannan	100.0	38.9	100.0	15.4	0.521
β Glukan kan	100.0	55.0	100.0	18.2	0.476
β Glukan BAL	x	52.9	100.0	x	x

X: Hesaplanamadı



Şekil 11. Aspergilloz grubunda çalışılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri

Deney sırasında aspergillozlu 10 sıçandan alınan kan örnekleri ISOLATOR™ kan kültür sisteminin öngördüğü yöntem uygulandıktan sonra SDA besiyerlerine ekildi. Üç hafta bekletilen kültürlerde hiçbir üreme gözlenmedi. Aynı sıçanların tam kan örneklerinde çalışılan PZR testinde ise dört pozitiflik saptanmıştır (Tablo VI).

Tablo VI. Aspergilloz grubundan alınan kan örneklerinde Lizis Santrifüstasyon ve PZR test sonuçlarının karşılaştırılması

Sıçan numaraları	Lizis Santrifüstasyon yöntemi	Kan PZR yöntemi
1.	N	N
2.	N	N
4.	N	P
8.	N	P
12.	N	N
14.	N	P
16.	N	P
20.	N	N
21.	N	N
22.	N	N

N: Negatif

P: Pozitif

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda özellikle *Aspergillus* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlar başta olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden sistemik fungal enfeksiyonların insidansında bir artış görülmektedir. HIV enfeksiyonu veya solid organ ya da kök hücre nakli nedeniyle bağışıklığı baskılananlar veya yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar ve prematüre bebekler bu enfeksiyonlardan etkilenmektedirler. Ancak en yüksek riskli grup yoğun kemoterapi sonrası uzun süreli nötropenisi olan hastalardır (94).

İnvaziv aspergillozun epidemiyolojisindeki bu değişimle ilgili olarak antifungallere dirençli *Aspergillus fumigatus*' un neden olduğu enfeksiyonların insidansı da artış göstermiştir. Bunlara ilaveten son zamanlarda yaygın olmayan tedavisi zor fırsatçı küflerin (Zigomiçetler, *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp) etken olduğu enfeksiyonlarda da artış bildirilmektedir. Bu yeni mikozların klinik belirtileri İA' a benzer ve tipik olarak *Aspergillus*' a etkili antifungal ajan alan hastalarda görülür. Bundan dolayı aspergillozun diğer fırsatçı küf enfeksiyonlarından ayırdedilmesi gereklidir (4,23,121).

Nötropenik hastalarda fungal enfeksiyonlarda erken tanı için kullanılacak tanı araçlarının güvenilirliği sınırlıdır. Günümüzde kullanılan mikrobiyolojik, serolojik ve görüntüleme yöntemleri *Aspergillus* spp tarafından oluşturulan invaziv enfeksiyonların belirlenmesinde olduğu gibi erken tanının konulmasında da yetersiz kalmıştır (21).

İA' un klinik belirtileri özgül olmayıp değişkenlik gösterebilmektedir. Dolayısıyla olguların çoğu geç tanınır ve hatta bazen otopside saptanır. Mevcut yöntemlerin düşük duyarlılık ve özgüllüğünden dolayı, pozitif histopatoloji veya kültür sonuçları kanıtlanmış invaziv mikoz olarak kabul edilmiştir (10). Aynı zamanda kültür sayesinde tür tanımı ve

duyarlılık testleri yapılabilir. Tür düzeyinde tanımlama özellikle *Aspergillus terreus* gibi antifungallere dirençli yeni patojen türlerin saptanması nedeniyle çok önemlidir (75).

Kandan ve BAL sıvısından kültür sonuçları düşük olup özellikle kontaminasyonlar sıklıkla sorun olmaktadır. Çoğunlukla kritik ve trombositopenisi olan bu nötropenik hastalarda doku biyopsi örneklerinin alınması ise nadiren uygulanabilmektedir (61).

Mortalite ve morbiditenin düşürülmesi açısından erken tanı ve tedaviye başlanması konusu çok önemlidir. Bu yüzden çalışmalar, erken tanı koyarak bu hasta grubunda yüksek mortalitenin düşürülmesi amacıyla yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (61).

İA' un hızlı laboratuvar tanısı *Aspergillus* antijenlerinin immünolojik olarak tespiti (galaktomannan, β -D glukan) ve/veya kan ya da diğer vücut sıvılarında nükleik asitin saptanmasına dayanmaktadır (17,61,76).

Enfeksiyon için ana giriş yolu ve enfeksiyon bölgesi solunum yollarıdır. Özellikle intranazal inokülasyon doğal yolu taklit etmektedir. Akciğerlerde kan damarlarına invazyondan sonra mantar diğer organlara yayılmaktadır. Deneysel modellerde de hastalık bağışıklık sistemi baskılanmış hayvanlarda geliştirilmiştir. Bağışıklık sistemi sağlam fareler 10^8 konidyadan daha azını hastalık gelişmeden temizleyebilmiştir (72).

Bizim çalışmamızda nötropenik sıçanlarda geliştirilen invaziv pulmoner aspergilloz modelinde hızlı tanı yöntemlerinin performansları değerlendirilmiştir. Bu amaçla *Aspergillus fumigatus* kültürlerinden hazırlanan konidiya süspansiyonları sıçanların solunum yollarından verilmiştir (Şekil 1).

Yirmi iki adet nötropenik sıçandan alınan akciğer doku örneklerinin 20 tanesinin kültüründe etken *Aspergillus fumigatus* üremiştir (Şekil 5).

Aspergillus' un enfekte dokudan izolasyonu için uygun şartlar sağlanamazsa tanının konulması zorlaşmaktadır. Tarrand ve arkadaşları *Aspergillus* hifinin büyürken invivo hipoksik ortama uyum sağladığını ve invitro olarak büyümesinin 37°C' nin altındaki hipoksik ortamda belirgin olarak arttığını söylemişlerdir (75,113).

Aspergilloz enfeksiyonu sırasında yoğun olarak miçel oluşumunun gelişmesinden ve akciğerde germinasyonunu tamamlamamış konidiyaların uzunca bir süre kalabilmesinden dolayı CFU (colony forming unit) ölçülerine göre fungusun kantitasyonunun hastalığın şiddetini belirlemede iyi bir belirteç olmayacağı, bu nedenle fungal biyokütle ile uyumlu olan kitinin gösterilmesinin in vivo üremeyi daha uygun olarak yansıtabileceği bildirilmiştir (65).

Kitin sıcak konsantre alkali ortamda kitozana dönüşmektedir. HNO₂ ile reaksiyon sonucu oluşan kitozanın aldehid deriveleri kolorimetrik ölçümle saptanabilmektedir. Bu yöntemle miçelyumun sahip olduğu kitin miktarı 1 µg ya da daha fazla glukozamin eşdeğeri olarak ölçülmektedir (67).

Lehmann ve White (67), ilaç verilmemiş ve kortizon asetat verilmiş iki grup farede *Aspergillus fumigatus* miçelyumunun miktarını fungal kitin düzeyinin belirlenmesi ile göstermişlerdir. Bu çalışmada *Aspergillus fumigatus* miçelyumunun kortizon verilmiş hayvanlarda daha hızlı büyüdüğü gösterilmiştir. İlaç verilmemiş hayvanlarda miçelyal gelişime olan direnç mantara karşı konağın doğal direncine bağlanmıştır. Yine bu çalışmada invitro olarak miçelyal homojenatın volümü ile kitin miktarı arasında doğru orantılı bir ilişki gösterilmiştir.

Hayashi ve arkadaşlarının (44) nötropenik farelerde invaziv pulmoner aspergilloza karşı antifungal ilaçların etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışmada; antifungal ilaçların kullanımından sonra akciğerlerdeki kitin ve plazmadaki β-D glukozamin düzeylerinin belirgin bir şekilde baskılandığı ancak mantarın CFU değerinin değişmediği gösterilmiştir. Araştırmacılar

CFU değerinin hifal büyümeyi yansıtmadığını ancak kitin düzeylerinin hifal büyüme ile orantı gösterdiğini bildirmişlerdir.

Balloy ve arkadaşları (13) ise kortikosteroid ve kemoterapötik bir ajanla bağışıklığın baskılanmasından sonra geliştirdikleri deneysel İPA modelinde kitin ve galaktomannan konsantrasyonlarını kortikosteroid verilmiş hayvanlarda daha düşük bulmuşlardır. İnsanlarda gelişen aspergilloz enfeksiyonundaki gibi kemoterapötik ajan verilmiş denekler *Aspergillus fumigatus*' a karşı daha fazla duyarlılık göstermişlerdir. Çünkü parçalı lökositlerin yokluğunda mantar akciğer dokusunu hızlıca invaze ettikten sonra diğer organlara da yayılabilmektedir. Bu çalışmada kitin ve galaktomannan düzeyleri *Aspergillus* için bir canlılık indeksi olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda aspergilloz oluşturulmuş deney grubundan (Grup III) ve sağlıklı kontrol grubundan (Grup I) alınan akciğer dokularında kitin düzeylerinin tespiti yapılmıştır. Aspergilloz grubunda ölçülen kitin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 7). Böylece bu şekilde de enfeksiyon oluşumu doğrulanmıştır.

Bronkoskopik tanıda BAL sıvısının işlenmesi, lavajın tekniği, zamanı, sıvının miktarı gibi standardize protokollerin eksikliğinden dolayı kültürlerin performansı düşük kalmıştır (23). Deney sırasında alınan BAL sıvılarının miktarlarının azlığı nedeniyle kültürleri yapılamamıştır.

Laboratuvarlarda İA tanısında yardımcı kültür dışı yöntemlerden özellikle galaktomannan ve (1→3)- β - D gluklan olmak üzere fungal antijenlerin gösterilmesi üzerinde durulmuştur.

Galaktomannan, dokularda *Aspergillus* türlerinin büyümesi sırasında dolaşıma salınan ve İA' lu hastaların serumlarında tespit edilebilen polisakkarit hücre duvarının bir bileşenidir.

Sandviç ELİSA testi 0.5 ng/ml kadar düşük konsantrasyonlarda GM'I tespit edebilir. İA' un tanısında GM testinin rolünü değerlendiren çalışmalar daha yoğun olarak olarak lösemi için kemoterapi alan derin nötropenik hastalar ya da flukonazol profilaksisi altındaki kök hücre alıcılarında yapılmıştır (23).

GM antijenini saptayan *Platelia Aspergillus* kiti Avrupa' da bir süredir yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD' nde klinik kullanımı için FDA onayını almıştır. İA açısından yüksek riskli hastalarda GM tespiti için bu kitin kullanımı yüksek derecede özgül bulunmuştur. Fakat duyarlılık birkaç faktöre bağlı olarak %30-100 arasında değişmektedir. Bu faktörlerden bir tanesi pozitif GM sonucu için seçilecek eşik değeridir. Kesin pozitiflik için geçmişte ≥ 1.0 değeri kullanılmış olmasına rağmen eşik değer için indeks 0.7 kullanıldığında özgüllük değişmeden hastalık daha erken dönemde saptanabilmiştir (92). Musher ve arkadaşlarının çalışmasında (80) BAL sıvılarında düşük eşik değer indeksi kullanıldığında özgüllük %4 azalırken duyarlılık %15 artmıştır.

Hayvan modelleriyle ve insanlarla yapılan çalışmalar GM değerlerinin *Aspergillus* fungal yükü ile uyumlu olduğunu ve İA' un prognozunu izlenmesine yardımcı olabileceğini göstermiştir (23,80). İA' un profilaksisi için antifungal ilaç alanlarda, çocuklarda, kronik granülomatöz hastalıkta ve SOT alıcılarında GM testinin performansı kesinlik kazanmamıştır. Hastanın bağışıklık durumu, test öncesi enfeksiyon olasılığı, antiGM antikorlarının varlığı, antifungal tedavi, antibakteriyel tedavi ve diyet gibi diğer faktörlerde GM testinin performansını ve yorumlanmasını etkilemiştir (4,47,87,99).

Bizim çalışmamızda galaktomannan antijeni 20 serum örneğinde çalışılabilmiş ve yedisinde pozitif bulunmuştur (%35). Pozitifliğe indeks eşik değerinin ≥ 1.00 olması durumunda karar verilmiştir. Kültür sonuçları altın standart alındığında duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD' leri yüzde olarak sırasıyla 38.9, 100, 100 ve 15.4 olarak bulunmuştur.

β glukon testi için sınırlı sayıdaki çalışmalarda duyarlılık %55-100, özgülük %52-100 arasında değişmektedir (55,85,86,92,95).

Pickering ve arkadaşları (95) invaziv fungal enfeksiyonların tanısında (1→3) β -D glukon testinin performansını değerlendirmek için sağlıklı kişilerden ve kan kültürlerinde maya ya da bakteri üremiş hastalardan alınan serum ve plazma örneklerini kullanmışlardır. Kontrol grubunun hepsinde test negatif bulunmuştur. Onbeş kandidemik hastanın 13'ünde, 25 bakteriyemik hastanın ise 14'ünde test pozitif bulunmuştur. Bu son 14 pozitif sonuçlu hastanın 10'unun kan kültüründe gram pozitif bakteri üremiştir. Testin duyarlılığı %93.3, özgülüğü %77.2, PPD %51.9, NPD %97.8 olarak bildirilmiştir. Aynı zamanda serumda galaktomannan testi ve histoplazmin antijenleri de çalışılmıştır. Altı örnekte histoplazmin antijeni pozitif bulunmuştur. Galaktomannan antijeni pozitif 32 örneğin 31'inde aynı zamanda β -D glukon testi de pozitif bulunmuştur.

Fungal enfeksiyonların tanısına yardımcı olarak β -D glukon tayininin çok merkezli klinik değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada (135) pozitiflik için eşik değer 60 pg/ml alındığında duyarlılık %69.9 iken, 80 pg/ml olarak çalışıldığında duyarlılık %64.4' e inmiştir. Bu çalışmada eşik değer 60 pg/ml' de pozitif sonuç alınan üç hastaya *Fusarium spp* tanısı konulmuştur. *Mucor* ve *Rhizopus* türleriyle enfekte hastalarda her iki eşik değeriyle de negatif sonuç alınmıştır. Ayrıca 12 *Cryptococcus* enfeksiyonu olan hastanın üçünde 60 pg/ml eşik değeri ile pozitiflik saptanırken, 80 pg/ml değer alındığında iki hastada pozitif sonuç alınmıştır.

Her iki çalışmada da Kuzey Amerika Atlantik kıyılarında bulunan *Limulus polyphemus*' tan elde edilen β glukonı kullanan Fungitell testi kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda da Fungitell testi kullanılmıştır. Pozitiflik için ≥ 80 pg/ml değeri esas alınmıştır. Veriler toplandıktan sonra analizleri yapılmış, 0-40 dakika arasındaki her nokta için optik dansite değişiminin ortalama hızı hesaplanmış ve test edilen her örneğin glukan konsantrasyonu kaydedilmiştir (Şekil 9). Test serum ve BAL sıvısı örnekleri kullanılarak çalışılmıştır. Test 22 serum örneğinin 11' inde (%50), 17 BAL sıvısı örneğinin dokuzunda (%52.9) pozitif bulunmuştur (Tablo IV). Serum örneği çalışıldığında duyarlılık %55.0, BAL sıvısı örneği çalışıldığında ise %52.9 olarak bulunmuştur. PPD' ler ise ikisi içinde %100 olmuştur (Tablo V). Kontrol gruplarının ikisinde de test negatif bulunmuştur.

Kami ve arkadaşları (50) invaziv pulmoner aspergillozun tanısında Platelia testinin duyarlılığını (%58), β glukan testinden (%67) daha düşük bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da serum örneklerinde Platelia *Aspergillus* testinin duyarlılığı (%38.9) Fungitell testinin duyarlılığından (%55.0) daha düşük bulunmuştur (Tablo V).

β -D glukan testi için sellüloz membranla hemodiyaliz altındaki böbrek yetmezlikli hastalarda, intravenöz immünglobülin ile tedavi görenlerde, gazlı bez gibi glukan içeren materyallerle temas eden hastalarda ya da örneklerde yanlış pozitif sonuçların gelişebileceği bildirilmiştir (135).

Pickering ve arkadaşları (95), çalışmaları sırasında fazla işlem yapılan örneklerde kontaminasyon gelişebildiğini bildirmişlerdir. Yanlış pozitiflik gelişiminde Lentinan gibi antitümör polisakkaritleri, şizofillan (farklı mantar türlerinden elde edilmektedir), kemoterapi ya da radyoterapiyle mukozal hasara bağlı olarak diyetten ya da gastrointestinal sistemde kolonize olan *Candida*' ların kan dolaşımına geçmesi, fungal antibiyotik deriveleri gibi başka potansiyel ancak kanıtlanmamış faktörlerinde etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca hemolitik ve lipemik örneklerin testin performansını düşürebileceğinden kullanılmaması gerektiğini de belirtmişlerdir.

Pazos ve arkadaşları (92), nütropenik erişkin hastalarda İA' un tanı ve tedavisinin izlenmesinde (1→3) β -D glukana kromojenik testini galaktomannan testi ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Glucatell ve Platelia *Aspergillus* testleri İA açısından yüksek riskli olan 40 nütropenik erişkin hastanın taranmasında haftada iki kez retrospektif olarak kullanılmıştır. Beş kanıtlanmış, üç yüksek olasılıklı, üç düşük olasılıklı İA tanısı konulmuştur. Her iki testte kanıtlanmış İA olgularını %100 saptarken yüksek olasılıklı İA olgularını %66 oranında saptamıştır. Her iki testin kinetiği benzer olarak bulunmuştur. Duyarlılık %87.5, özgüllük %89.6, PPD %70, NPD %96.3 olarak çalışılmıştır. Her iki testte de %10 oranında yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir. β -D glukana testi daha erken pozitifleşme eğilimi göstermiştir. Bu çalışmada β -D glukana testi için elde edilen yüksek duyarlılığın Glucatell kitinin kullanılması ile ilgili olabileceği söylenmiştir. Çünkü β glukana için ticari testlerin duyarlılıkları farklı oranlarda bildirilmiştir (86). Ayrıca bu çalışmada ilk olarak tedaviye cevap alınan hastalarda β glukana düzeyleri azalırken, cevap alınamayanlarda yüksek kaldığı gösterilmiştir.

(1→3) β -D glukana zigomitler dışında ve daha az olarakta *Cryptococcus* türlerinde olmak üzere tüm mantarlarda bulunan bir hücre duvarı polisakkaritidir. Prokaryotlar, virüsler ve insan hücrelerinde β -D glukana bulunmamaktadır. Kanda ve normalde steril olan vücut sıvılarında bulunmasının invaziv fungal enfeksiyonlar için bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (87).

Obayashi ve arkadaşları (85), invaziv mikozlu olguların plazmalarında FungiTec G test ile yüksek konsantrasyonda β glukana düzeyini saptamışlardır. Çalışmalarında 20 pg/ml eşik değerini kullandıklarında 41 olgudan 37'sini tespit edebilmişlerdir. Çalışmalarının ilginç

bir yönü olarak fungal kolonizasyonda β glukan konsantrasyonu 20 pg/ml' nin üzerine çıkmamıştır.

Fungitec ve Glucatell, Odabaşı ve arkadaşları (86) tarafından çalışılmıştır. Antifungal profilaksi alan 283 AML' li ve myelodisplastik sendromlu hastalarda değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları invaziv fungal enfeksiyonların tanısında β -D glukan tespitinin kullanımı ile ilgili önemli ipuçları sağlamıştır. Kandidemik hastalarda ve sağlıklı bireylerde değerlendirme için 60 pg/ml eşik değerleri seçilmiştir. Bu değer kullanılarak her hastanın en az bir serum örneğinde klinik tanıdan 10 gün önce β -D glukan pozitif bulunmuştur. Testin özgüllüğü bir hastaya ait birden fazla örnek kullanıldığında yüksek bulunmuştur. NPD %100, tek örnek çalışıldığında özgüllük %96 iken ardışık örneklerle çalışıldığında %100 olmuştur. Bu iki ticari sistem karşılaştırıldığında her ikisi de beta glukan içeren polisakkaritler için özgül bulunmuştur. NPD çok yüksek bulunmuştur ve seri örneklerin test edilmesi testin özgüllüğünü arttırmıştır.

Platelia *Aspergillus* testinin yetersizliklerinin üstesinden gelmek için diğer kültür dışı tanı yöntemleriyle birlikte kullanılması düşünülmüş ve elde edilen sonuçlara göre β glukan' ın tamamlayıcı bir test olabileceği belirtilmiştir (92).

Serolojik deneylerin performansındaki umutsuzluklardan dolayı 1990' lı yıllardan beri fungal patojenleri yüksek duyarlılıkla erkenden saptamak amacıyla moleküler yöntemler üzerinde yoğun olarak durulmaktadır (21).

Aspergillus türlerinin tanısında patojenin karakterize edilmesindeki sıkıntılardan kaynaklanan birtakım problemler moleküler yöntemlerin önünde engel oluşturmuştur (17,21,124).

Diğer tanısı zor patojen organizmalarda olduğu gibi özellikle çok kopya sayılı gen başta olmak üzere fungal genomların identifiye edilip sekanslanması sonrası daha duyarlı ve hızlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir (21).

Patojenin kültür ve çevre örneklerinden identifikasyonu ve tiplendirilmesine duyarlı epidemiyolojik çalışmalar farklı PZR tekniklerinin ortaya çıkmasına neden olmuş, buna rağmen altın standart bir moleküler yöntem belirtilmemiştir (21,23).

Melchers ve arkadaşları (77) çok kopya sayılı 18S rRNA genini kodlayan primerleri kullanarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Aspergillus* türlerine ait DNA' nın gösterilmesinde etkili bir PZR deneyini açıklamışlardır. Daha sonra çoğu PZR deneyinde hedef olarak bu gen seçilmiştir.

Kappa ve arkadaşları (53), mantara özgül evrensel primer sistemi tasarlamış ve enfekte insan dokularında deneysel olarak özgüllüğünü göstermişlerdir.

Yamakami ve arkadaşları (129) konvansiyonel antijen deneyleri ile karşılaştırıldığında kandan daha yüksek oranda duyarlılık ve özgüllükle *Aspergillus* türlerini tanıyan iki aşamalı PZR tekniğini değerlendirmişlerdir.

Akut lösemili veya yüksek doz kemoterapi alan hastalar ve hematolojik kök hücre nakli yapılan hastaların prospektif çalışmaları sonucunda klinik belirtilerden yaklaşık beş gün önce olmak suretiyle PZR en erken invaziv fungal enfeksiyon belirleyicisi olarak değerlendirilmiştir (45).

Einsele ve arkadaşları (32) fungal patojenleri (*Aspergillus* türleri dahil) kanda yaklaşık olarak 1 cfu/ml miktarında (invitro ortamda) saptayan cinse ve türe özgü hibridizasyon aşaması sonrası çok kopya sayılı gen sekansını hedef alan bir PZR tekniği geliştirmişlerdir. Aynı araştırmacılar prospektif olarak kemik iliği nakli yapılan hastaların BAL örneklerinde pozitif PZR sonuçları ve İA arasında önemli bir korelasyon bulmuşlardır. Hava yollarında

daha önce olan *Aspergillus* kolonizasyonunun İA gelişimine ek bir risk oluşturabileceğini belirtmişlerdir (33).

Williamson ve arkadaşları (125) tarafından 37 kemik iliği alıcısı hastadan toplanan 175 kan örneği nested PZR ile değerlendirilmiştir. Burada tek pozitif sonuç kriteri söz konusu olduğu takdirde enfeksiyonun tanısında PZR' nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %79 olarak bulunurken, iki pozitif sonuç gerekli bulunduğu duyarlılık %81 özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada PZR sonuçları ile hastaların 2/3' sinde antifungal tedavi başlanmıştır.

Enfeksiyonun erken tanısı ve antifungal tedavinin izlenmesi amacıyla klinik olarak kan örneklerinin kullanılması gerektiğinde girişimsel bir işleme ihtiyaç duyulmadan alınabileceğinden en uygun örnek olarak değerlendirilmektedir. Ancak BAL örneklerinin kan örneklerine göre IPA' un erken tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllükle daha değerli olduğu gösterilmiştir (21,124).

Son yıllarda bazı yeni deneylerde gerçek zamanlı PZR teknolojisi başarıyla kullanılmıştır. LightCycler™ ve Taqman teknolojisinin her ikisi de çok hızlı amplikon saptanması ile invitro DNA amplifikasyonunu çok hızlı bir şekilde sağlayabilmektedir. Bu şekilde hem patojen gösterilmekte hem de patojen DNA' sının kantitasyonu hızlı bir biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Kişinin fungal yükünün belirlenmesinin tedavinin değerlendirilmesi açısından yol gösterici olması dolayısıyla fungal yükün duyarlı ve özgül bir şekilde gösterilmesi klinik açıdan çok önemli olmaktadır (17,21,22,59,100).

Gerçek zamanlı PZR sonuçları, en basiti çift iplikçikli DNA' nın minör oluklarına yerleştirilen Sybr Green floresan boyasının kullanımı olmak üzere birçok yoldan elde edilebilir. Amplikon özgüllüğü spesifik primerlerin ve erime eğrisi analizinin kullanımı ile

belirlenebilir. Ancak spesifik olmayan amplifikasyon ve primer dimerler erime eğrisi analizini ve kantitasyonu karıştırabilir (21).

Bolehovska ve arkadaşları (17), biyolojik örneklerden *Aspergillus* türlerinin saptanmasında gerçek zamanlı PZR tekniğinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Otuzüç haftalık sürede İA riski altındaki 179 hastadan 354 değişik örnek almışlardır. Altmışbeş hastadan (%36.1) alınan 103 örnekte (%29.10) pozitiflik saptamışlardır. Testin duyarlılığını 5 kopya/ml olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada *Aspergillus fumigatus* mitokondriyal tRNA ve rRNA gen bölgesinden seçilen 91 baz çifti büyüklüğünde ampikon kullanılarak çoğaltılmıştır. Yaygın olarak kullanılan iki türlü PZR yöntemi ile karşılaştırıldığında yüksek özgüllük ve duyarlılık elde edilmiştir.

Loeffler ve arkadaşları (72), İA tanısında PZR yönteminin duyarlılığını saptamak için enfekte fare ve tavşanların kan ve doku örneklerinde kantitatif kültür, PZR-ELISA ve kantitatif LightCycler testlerini karşılaştırmışlardır. Altmışdört kültür negatif akciğer doku örneği PZR ile pozitif bulunurken sadece iki PZR negatif örnekte *Aspergillus fumigatus* üremiştir. PZR yöntemi kültürden 19.4 kez daha fazla duyarlı bulunmuştur. Akciğer biyopsi örnekleri test edildiği zaman özellikle kompleman aktivasyonu ya da makrofaj ve nötrofillerin yüksek aktivitesi gibi immün reaksiyonlarla fungal büyümenin inhibe olduğu durumlarda PZR testlerinin kültüre göre yüksek duyarlılıkla daha faydalı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda aspergillozlu farelerden elde edilen 22 doku örneğinin sadece dördünde (%18) *Aspergillus* DNA' sını gösterebilirken, 19 kan örneğinin ise yedisinde (%36.8) *Aspergillus* DNA' sını saptayabildik (Tablo IV).

PZR' nin kullanımı ile ilgili, örnek tipi (serum, BAL), ekstraksiyon protokolü, amplifikasyon sistemi (nested, konvensiyonel), protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve

konvensiyonel) ya da pimer seçimi (*Aspergillus* ya da tüm küflere özgül, panfungal) gibi çok sayıda çözülmemiş sorun bildirilmiştir (23,61).

Mantarlar için kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemi çok önemlidir. Çünkü farklı örneklerde sadece insan DNA' sını bulunmamakta, aynı zamanda muhtemel fungal, bakteriyel, viral ve parazit DNA' sını da içerebilmektedir. Total DNA miktarı örnekten örneğe çok değişmektedir. Eğer DNA miktarı 500 ng/örnek' ten büyük ise LightCycler probe sistemi kullanıldığı zaman inhibisyon görülebilir. Bu nedenle rutin olarak her örnekte DNA konsantrasyonunun spektrofotometrede ölçülmesi ve gerekirse PZR analizinden önce dilüsyonlarının yapılması önerilmiştir (59).

Çalışmamızda DNA konsantrasyonları belirlenmediği için kültürde yoğun üreme olmasına karşın düşük PZR pozitifliğine bir neden olarak bu durum düşünülebilir.

Loeffler ve arkadaşlarının (72) çalışmasında altmışsekiz kan kültür örneğinin hiçbirinde *Aspergillus fumigatus* saptanmazken, PZR ile 68 örnekten 17' sinde (%25) *Aspergillus* DNA' sını tespit edilmiştir. Bu şekilde fareler doğal yolla enfekte olduğunda *Aspergillus*' un kan dolaşımında saptanabileceği gösterilmiştir. Kan örneklerinde fungus yükü relatif olarak düşük bulunmuştur (10^1 - 10^2 cfu/ml). Bu düşük yük İA' lu hastaların kan örneklerindeki fungus yükü ile benzer bulunmuştur. Fareler aynı koşullar altında aynı miktar konidyalara maruz bırakıldığı halde *Aspergillus* DNA' sını kan örneklerinin %25 inde saptanabilmiştir. İlginç olarak kan PZR pozitif bulunan hayvanların akciğerlerindeki fungus yükü, PZR negatif olanlarınkinden on kat daha fazla bulunmuştur. Bu nedenle akciğerlerdeki yüksek fungus yükü ile kanda fungal DNA' nın bulunması arasında korelasyon olabileceği söylenmiştir.

Çalışılan örnek türü direkt olarak ekstraksiyon yönteminin tekniğini etkiler. Örneğin miktarı ve türü ulaşılabilecek hedefi sınırlayabileceği gibi yöntemleri de karışık hale getirebilir.

Teknik açıdan daha çok aşaması olan yöntemler daha fazla DNA kaybına yol açabileceğinden daha çok deneyim gerektirmektedir. Ayrıca konidya ya da hif hedef alındığı zaman ek olarak hücre duvarının parçalanması gerekecektir (124). Fungal DNA' nın kontaminasyonundan dolayı zimolaz kullanımı terk edilmiş ve bunun yerine rekombinant litikaz kullanılmaya başlanmıştır (71). Cam boncukla parçalama yöntemi ile mekanik hasar, tespit limiti üzerinde herhangi bir etki göstermeden enzimatik olmayan daha ucuz bir tercih olarak değerlendirilmiştir (42).

Çalışmamızda doku örneklerinden elde edilen düşük duyarlılığın (%20) bir diğer nedeni olarakta ekstraksiyon sırasında litikaz enziminin kullanılmamış olması düşünülmüştür.

Son zamanlarda otomatik yöntemlerin kullanımı değerlendirilmiştir. Bunlar iş yükünü azalttığı gibi elle çalışılan yöntemlerle karşılaştırıldığında laboratuvarlar arası karşılaştırmaya imkan vermiş ve çalışma sırasında gelişebilecek kontaminasyonu azaltmıştır (27,59).

Klingspor ve Jalal (59) otomatik olarak fungal DNA ekstraksiyonunda MagNa Pure LightCycler Instrument kullanarak *Candida* ve *Aspergillus* türlerini tespit eden ve tanımlayan gerçek zamanlı PZR yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin uygulanışı yaklaşık altı saat sürmüştür. Çeşitli fungal patojenlerin 18SrRNA gen bölgesinden elde edilen oligonükleotid primerler ve problemleri kullanmışlardır. Şüpheli invaziv fungal enfeksiyonu olan hastalardan 1650 ardışık örnek değerlendirilmiş, 114 önekte (%6.9) pozitif PZR sonucunu elde etmişlerdir. Bunların %5.3' ü *Candida* pozitif, %1.7' si *Aspergillus* pozitif olarak değerlendirilmiştir. İlginç olarak *Aspergillus* için pozitif PZR sonuçları İA için yüksek riskli olan ciddi bağışık engelli hastaların sadece kan örneklerinde elde edilmiştir. Bazı hastalarda DNA erken evrede örneğin klinik bulgulardan önce tespit edilebilmiştir.

Kanıtlanmış aspergillozlu hastalarda standart kan kültürleri sıklıkla negatif sonuç vermiştir ve bu nedenle PZR pozitif sonuçlarla kültür sonuçlarının karşılaştırılması uygun

bulunmamıştır. Kanın içinde konidya ve hiflerin büyümesini inhibe eden maddelerin bulunabileceği teorisi geçerli kabul edilmemiş buna sebep olarakta kanlı agar besiyerinin *Aspergillus* türlerinin üretilmesi için mükemmel bir ortam olduğu belirtilmiştir. Buna rağmen kan kültür sistemlerindeki değişiklikler; çalkalayarak havalandırma ya da düşük oksijen basıncını önlemek için H_2O_2 eklenmesi *Aspergillus* izolasyonunu arttırmamıştır. Kan damarlarının invazyonunun tromboza neden olup etkilenmiş bölgeye olan kan akımını azaltabileceği, bu nedenle kan kültürlerinde çok düşük oranlarda üremenin görülebildiği söylenmiştir (72).

Kandaki lökosit ve eritrositleri parçalayıp koagülasyonu engelleyerek mikroorganizmanın üremesini arttıran lizis santrifüjasyon sistemi ile akciğer aspergillomasi olan bir hastanın kan örneğinden *Aspergillus fumigatus* üretilenmiştir (104). Creger ve arkadaşları (28), nötrojenik kanser hastalarında fungal organizmaların izolasyonu için konvensiyonel tekniklere karşı Isolator kültür sisteminin kullanımını retrospektif olarak karşılaştırmışlardır. Kırkiki yanlış pozitif sonuçtan 41' ini Isolator sistemi ile, birini ise konvensiyonel sıvı kültür sistemi ile elde etmişlerdir. Sonuçta bu sistem standart kan kültürlerinin üzerinde bir avantaj sağlamadığı gibi çok fazla yanlış pozitif sonuca da neden olmuştur.

Çalışmamızda aspergillozlu on sıçandan alınan kan örnekleri Isolator™ kültür sistemiyle değerlendirilmiştir. Üç hafta bekletilen kültürlerde herhangi bir kontaminasyon görülmemesine rağmen hiçbir üreme de olmamıştır. PZR sonuçlarıyla karşılaştırma uygun bulunmamakla beraber PZR testi ile bu on sıçandan dördünde pozitif sonuç alınmıştır (Tablo VI).

İnvaziv aspergillozun patogenezi iyi anlaşılamamıştır. Sporlar inhale edildikten sonra akciğer alveollerinde birikmekte ve hif formu gelişmektedir. Fungal DNA (sporlar ve/veya

hifler) bu evrede kan dolaşımına salınabilir. *Aspergillus*' un kandan iç organlara yayılımı klinik belirtilerin başlamasından çok önce gelişebilir (59).

Moleküler çalışmalarda uygunsuz bir örneğin alınması yanlış sonuçlara yol açabileceğinden doğru örneklerin seçilmesi çok önemlidir. Primer olarak hastanın durumu örnek seçimini belirler. Klinisyenler kritik hastalarda invaziv prosedürlerin uygulanmasını tercih etmez. Dolayısıyla hatta tercih edilen örnek bile olsa özellikle birden fazla BAL ve BOS örneğinin alınması genellikle zordur. Klinik uygulamalarda kan alınması kolaydır ve rutin taramada kullanılabilir (124).

Düşük pozitiflik düzeyi *Aspergillus*' un dolaşımında geçici süre bulunmasına bağlı olabilir. Sıklıkla fazla miktarda (≥ 4 ml) ve sık örnek alınması örnek miktarı ve PZR sonuçları arasında bir ilişki bulunduğundan dolayı bu problemi ortadan kaldıracaktır. Aynı zamanda hastaların sıklıkla test edilmesi kontaminasyon ve inhibisyonun etkisini de sınırlandırabilir (22,124). Kan örneklerinde kontaminasyonun az olmasına karşın hava kaynaklı sporların inhalasyonu ve akciğerde kolonizasyonu dolayısıyla BAL ve balgam örneklerinde yanlış pozitif PZR sonuçları görülmektedir (23)

Williamson tarafından yapılan küçük çaplı bir çalışmada (126) sitratlı tüplerde daha fazla ve EDTA' lı tüplerde daha az *Aspergillus* kontaminasyonu görülürken, birşey içermeyen tüplerde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Çalışmanın küçük olması bunun önemini açıklamada yetersiz kalmıştır. Ancak tanıda herhangi bir yanlış pozitif sonuç çok önemli olduğundan, moleküler süreçte kontaminasyonların oluşmadığı düşünüldüğü zaman klinik açıdan yanlış pozitifliğe yol açabileceğinden gözardı edilmemesi gerektiği belirtilmiştir.

Hemoglobinin PZR inhibisyonu etkisinden dolayı inhibitör kan bileşiklerinin uzaklaştırılması amacıyla titiz ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Garcia ve arkadaşları

heparin ve sitrat kullanımının PZR' nı inhibe ettiği halde EDTA' nın inhibe etmediğini göstermişlerdir (38).

Serum ya da plazma ile karşılaştırıldığında BAL örneklerinin kullanılması İA' un erken tanısı için daha az ümit uyandırmaktadır. Çünkü çok sayıda yanlış pozitif sonuç görülebilmektedir (23). Ayrıca *Aspergillus*'un solunum yollarında geçici olarak bulunmasına bağlı olarakta pozitif PZR sonuçları elde edilebilir. Sanguinetti ve arkadaşlarının çalışmasında (100), gerçek zamanlı PZR fungal hasarı kantitatif olarak gösterip, enfeksiyon ve kolonizasyon ayırımının yapılmasına yardımcı olarak konvensiyonel PZR tekniğine göre daha üstün bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada BAL sıvılarında çalışılan galaktomannan ELISA testi ile %100 pozitiflik elde edilmiştir.

Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR yöntemi ile aspergillozlu sıçanlardan alınan 12 BAL sıvısı örneğinin yedisinde (%58.3) pozitiflik elde ettik (Tablo IV).

PZR testlerinin başarısını etkileyen bir diğer faktör uygun amplifikasyon sistemidir. En uygun amplifikasyon ekstraksiyon yöntemine bağlı olan yüksek kalitede pürifiye DNA varlığına dayanmaktadır. Ekstraksiyon, inhibitörlerden etkilenmekle beraber onların ortadan kaldırılmasından ve dolayısıyla amplifikasyondaki yetersizlikten sorumlu olmaktadır. Oligonükleotidlerin tasarlanması da çok önemli olmaktadır. Pratikte özellikle 18S rRNA geni olmak üzere rRNA operonunun hedeflenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Panfungal primerlerin tasarlanması ile özgül problemler kullanılarak diğer mantarların tanısına da yardımcı olunmuştur (59,76,124).

PZR testleri sırasında kontaminasyon için bir diğer kaynak laboratuvar işlemleridir. Özellikle ekstraksiyon ve reaksiyon karışımlarının hazırlanması sırasında gelişebilmektedir. Ayrıca nadiren de olsa negatif kontrollerin amplifikasyon sırasında kontamine olabileceği bildirilmiştir (17). Bu nedenle çalışmamızda ekstraksiyon sırasında negatif örnekler

kullanarak kontaminasyon riski değerlendirilmiş ve bu negatif kontroller hiçbir örnekte pozitif olarak bulunmamıştır.

Aspergillus PZR ile ilgili en önemli konulardan biride sonuçların klinik açıdan değerlendirilmesidir. PZR sonuçları değerlendirilirken mevcut klinik bilgilerden de yararlanılmıştır. Antifungal tedavi ekstraksiyon üzerinde etki yapmasada PZR' nın saptadığı tespit limitini düşürmüş ve DNA kaybı da gözönüne alındığında negatif PZR sonucuna yol açabilmiştir. Daha etkili bir ekstraksiyon yönteminin ve daha fazla miktarda örnek kullanılmasının antifungal etkiyi engelleyebileceği belirtilmiştir (80,124).

Günümüzde tek PZR pozitifliğinin fungal hastalıkla ilişkili olmayacağı ve antifungal tedaviye karar verilemeyeceği, seri örneklerin değerlendirilmesinin gerektiği söylenmiştir. Ayrıca bir ya da daha fazla sayıda negatif kan PZR sonucunun İA' u kesin olarak dışlamayacağı da bildirilmiştir (22).

Yamakami ve arkadaşları doku invazyon derecesinin önemli olduğunu ve aspergilloma gibi daha az invaziv enfeksiyonlarda kanıtlanmış/yüksek olasılıklı IPA olgularıyla karşılaştırıldığında daha az pozitif sonuçların görüldüğünü bildirmişlerdir (130).

Çoğu çalışmada PZR sonuçları yorumlanırken hastalığın sınıflandırılması ve sonuçların gücünün değerlendirilmesi için EORTC-MSG fikir birliğinin kriterlerinden yararlanılmıştır (10). Kriterler birçok klinik çalışmanın daha kolay kıyaslanmasını sağlamıştır ve çalışma planlarını tartışmayı kolaylaştırmıştır. Bununla beraber muhtemel hastalık için özellikle nötropeni sırasında antibiyotiğe dirençli ateş gibi bazı kriterlerin gerçekte özgül olmadığı ve çalışmalara muhtemelen invaziv fungal enfeksiyonu olmayan hastalarında alınmasına yol açtığı belirtilmiştir (91).

Mevcut kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisinin İA' lu hastalar için yeterli duyarlılığa sahip olmamalarından ve her testin enfeksiyonun farklı zamanlarında

pozitifleşmesinden dolayı bu testlerin birarada kullanılmasının performanslarını arttıracığı düşüncesi kabul görmüştür (23).

Kawazu ve arkadaşları (58), hematoloji hastalarında İA tanısında gerçek zamanlı PZR, galaktomannan ve β -D glukon testlerinin tanısal değerlerini karşılaştırmışlardır. Sonuçta İA için bu haftalık tarama testleri arasında ELISA testini, eşik optik dansite indeks değeri 0.6 alındığında en duyarlı test olarak değerlendirmişlerdir.

Scotter ve arkadaşları (102), galaktomannan, PZR-ELISA ve gerçek zamanlı PZR testlerini kaspofungin asetat tedavisi alan ve almayan İA' lu sıçanlarda değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonuçları Tablo VII' de verilmiştir.

Tablo VII. Tedavi alan ve almayan İA' lu sıçanlarda Galaktomannan, PZR-ELISA ve GZ-PZR testlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya ait sonuçlar (102)

Yöntem	Duyarlılık (%)			Özgüllük (%)			PPD (%)			NPD (%)		
	A	B	T	A	B	T	A	B	T	A	B	T
PZR-ELISA	64.7	58.8	61.7	100	100	100	100	100	100	33.3	30	28
GM	47	23.5	35.2	100	100	100	100	100	100	25	18.7	19
GZ-PZR	11.7	17.6	14.7	100	100	100	100	100	100	15.7	17.6	16

A: Tedavi edilmiş sıçanlar

B: Tedavi edilmemiş sıçanlar

T: Toplam

Bu çalışmada konidyal süspansiyon intravenöz yolla verilmiştir. Bizim çalışmamızda GM testinin duyarlılığı %38.9 iken bu çalışmada %23.5, yine bizim çalışmamızda kan

örneklerinde GZ-PZR testinin duyarlılığı %41.2 iken bu çalışmada %17.6 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada GZ-PZR ile 17 örnekten üçünde (%17.7) pozitiflik, GM testi ile 17 örnekten dördünde (%23.5) pozitiflik elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise GM testi ile %35, GZ-PZR testi ile %36.8 pozitif sonuç alınmıştır. Ayrıca bu çalışmada karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında makroskopik olarak gözle görülür lezyonlar olduğu halde sıçanların %24'ünde tüm testler negatif çıkmıştır. Önemli bir nokta olarak bu çalışmada kaspofungin ile tedavi edilmiş hayvanlarda, muhtemelen ilacın hücre duvarı üzerine olan etkisinden dolayı galaktomannan düzeyleri yüksek olarak seyretmiştir.

Çalışmamızda kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisi tek başına invaziv aspergilloz için yeterli duyarlılık gösterememiştir. Diğer çalışmalarda da İA' un tanısında standart yöntemlerin bulunmamasıyla birlikte hastalığın seyrinin veya profilaktik ya da ampirik antifungal ilaç verilmesinin etkisi sonucunda kültür dışı tanı yöntemlerinin performansı önemli derecede değişkenlik göstermiştir.

Testlerin tarama amaçlı birarada kullanılabilmesi için kan örnekleri en uygun klinik örnek olarak değerlendirilmiştir. Bu sayede biyopsi gibi daha invaziv olan yöntemlere ihtiyaçta önlenmiş olacaktır. Ayrıca kültür dışı tanı yöntemlerinin performanslarını karşılaştırabilecek ve en uygun birlikteliğin belirlenmesini sağlayacak daha geniş klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada, deneysel hayvan modelinde oluşturulan invaziv aspergilloz enfeksiyonunun tanısında antijen testleri (galaktomannan, β -D glukon), moleküler yöntem (gerçek zamanlı PZR) ve lizis santrifügasyon kan kültür sisteminin erken tanıya katkılarının ayrıca dokuda kitin ölçümünün enfeksiyonun doğrulanmasına katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla testler sağlıklı kontrol grubu (Grup I), nötropeyi kontrol grubu (Grup II) ve aspergilloz grubu (Grup III)' ndan alınan kan (serum, tam kan), BAL sıvısı ve akciğer doku örneklerinde çalışılmıştır.

Grup I ve II' de çalışılan tüm testler negatif bulunmuştur. Aspergilloz grubundan alınan 22 akciğer doku örneğinin 20' sinde kültürde üreme olmuştur. Grup I ve III' ten alınan akciğer doku örneklerinde çalışılan kitin ölçümleri arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur ($p<0.05$). On adet aspergillozlu sıçandan alınan kan örnekleri lizis santrifügasyon kültür sistemiyle çalışılmış, hiçbir örnekte üreme olmamıştır. Gerçek zamanlı PZR ile 12 BAL sıvısının yedisinde (%58.3), 19 kan örneğinin yedisinde (%36.8), 22 akciğer doku örneğinin ise dördünde (%18) pozitiflik elde edilmiştir. Platelia® *Aspergillus* testi ile galaktomannan antijeni araştırılan 20 serum örneğinin yedisinde (%35) pozitif sonuç bulunmuştur. β glukon tespiti için serum ve bronkoalveolar lavaj sıvıları Fungitell™ kiti ile çalışılmıştır. Yirmiiki serum örneğinin 11' inde (%50), 17 BAL sıvısı örneğinin dokuzunda (%52.9) pozitiflik elde edilmiştir.

Sonuçta kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisi tek başına invaziv aspergilloz için yeterli duyarlılık gösterememiştir. Diğer çalışmalarda da İA' un tanısında standart yöntemlerin bulunmamasıyla birlikte mikroorganizmanın doğası, hastalığın seyri veya

profilaktik ya da ampirik antifungal ilaç verilmesinin etkisi sonucunda kültür dışı tanı yöntemlerinin performansı önemli derecede değişkenlik göstermiştir.

Testlerin tarama amaçlı birarada kullanılabilmesi için kan örnekleri en uygun klinik örnek olarak değerlendirilmiştir. Bu sayede biyopsi gibi daha invaziv olan yöntemlere ihtiyaçta önlenmiş olacaktır. Ayrıca kültür dışı tanı yöntemlerinin performanslarını karşılaştırabilecek ve en uygun birlikteliğin belirlenmesini sağlayacak daha geniş klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

SUMMARY

In the present study, the value of the molecular method (Real-Time PCR), antigen detection (galactomannan, glucan), and Lysis Centrifugation blood culture system (ISOLATOR™) was investigated in the diagnosis of invasive aspergillosis in the animal model. In addition, the determination of tissue chitin levels which was used for the confirmation of the presence of infection was studied.

These tests were studied in the blood (serum, whole blood), BAL fluid, and pulmonary tissue samples of different groups, named Group I as control group, Group II as neutropenia control group, and Group III as aspergillosis group.

All of the tests were found negative in Group I and II. A total of 20 of 22 pulmonary tissue samples yielded *Aspergillus* colonies in the aspergillosis group. There were a significant difference between Group I and III ($p < 0.05$) in terms of chitin levels of pulmonary tissue samples. A total of 10 rats with aspergillosis were tested using lysis centrifugation culture system and no growth was detected in any specimen. *Aspergillus* DNA was detected in 7 of 12 BAL fluid samples (58.3%), 7 of 19 blood samples (36.8%), and 4 of 22 pulmonary tissue samples (%18) using Real-Time PCR method. Galactomannan antigen was detected in 7 of 20 serum samples (35%) using Platelia® *Aspergillus* Galactomannan ELISA Assay. Quantitative detection of β -glucan levels were investigated by using Fungitell™ assay in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples. It was found to be positive in 11 of 22 serum samples (%50) and 9 of 17 BAL fluid samples (%52.9).

In conclusion, none of the non-culture-based diagnostic tests were shown as adequate in the diagnosis of invasive aspergillosis, individually. The confused nature of the

microorganism and the aspergillosis is related to the variability of the performance of non-culture-based diagnostic methods as reported in the literature.

The blood samples were evaluated as the most valuable clinical sample for the screening of suspected patients. Therefore, there will be no need for other invasive diagnostic methods such as biopsy. Future clinical studies are required for comparing the performance of the different non-culture based diagnostic methods and the optimal integration approaches of them.

KAYNAKLAR

1. Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, Mardani M, Girgawy E, Abi-Said D, Whimbey E, Hachem R, Raad I. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immüno-compromised patients. Arch Intern Med 160:2659-2664, 2000
2. Abbott KC, Hypolite I, Poropatich RK, Hsieh P, Cruess D, Hawkes CA, Agodoa LY, Keller RA. Hospitalizations for fungal infections after renal transplantation in the United States. Transpl Infect Dis 3:203-211, 2001
3. Akova M. İnvaziv aspergillozis İmmün sistemi baskılanmış hastalarda invaziv fungal infeksiyonlar. Akova M, Akan H (ed), Ankara 2006, S. 51-66
4. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl Infect Dis 4(Suppl. 3):32-37, 2002
5. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. Clin Infect Dis 43:15-27, 2006
6. Alp Ş. *Aspergillus* cinsi mantarların olası virülans faktörleri. Mikrobiyol Bült 40:109-119, 2006
7. Antonio DD, Pagano L, Girmenia C, Parruti G, Mele L, Candoni A, Ricci P, Martino P. Cutaneous aspergillosis in patients with haematological malignancies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19:362-365, 2000
8. Arıkan S. İnvaziv aspergilloz tanısında galaktomannan antijen testinin kullanımı. <http://www.febriinotropeni.net>, 2006
9. Arıkan S. Is serum β -D-glucan level helpful in diagnosis of invasive fungal infections? Doctorfungus Mycology Mailer February 2005

10. Aşcıoğlu S, Rex JH, Pauw de B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA and Walsh TJ, on behalf of the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Clin Infect Dis 34:7-14, 2002
11. Atasoy Ç, Fitoz S, Düşünceli E, Yağcı C, Akyar S. İnvazif pulmoner aspergillozis: konvansiyonel BT ve YRBT bulguları. Tanısal ve Girişimsel Radyoloji 7:353-358, 2001
12. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. Clin Infect Dis 32:1319-1324, 2001
13. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect Immun 73(1):494-503, 2005
14. Becker MJ, De Marie S, Fens HAMM, Haitsma JJ, Verbrugh HA, Lachmann Bakker-Woudenberg AJMI. Pathophysiology of unilateral pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. Med Mycol 44:133-139, 2006
15. Bilezikçi B, Demirhan B, Haberal AN, Arıkan Ü. Invasive pulmonary aspergillosis in solid organ transplant recipients: postmortem histopathologic findings. Türk J Med Sci 32:31-34, 2002
16. Birch M, Robson G, Law D, Denning DW. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. Infect and Immun 64:751-755, 1996
17. Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150:245-248, 2006

18. Bouza E, Munoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Infect 10 (Suppl. 1):76-85, 2004
19. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays 28:799-808, 2006
20. Bozdayı AM. Real-Time PCR (RT PCR). Turk J Biochem, 29:11, 2004
21. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. Med Mycol 43(Suppl.1):139-145, 2005
22. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Cornely OA, Wilhelm S, Reuter S, Kern W, Südhoff T, Mörz H, Hehlmann R. Prospective clinical evaluation of a LightCycler™-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. Br J Haematol 125,196-202, 2004
23. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycol 44:163-172, 2006
24. Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr Opin Infect Dis 15:569-574, 2002
25. Clemons KV, Stevens DA. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. Med Mycol 43(Suppl 1):101-110, 2005
26. Cooke FJ, Terpos E, Boyle J, Rahemtulla A, Rogers TR. Disseminated *Aspergillus terreus* infection arising from cutaneous inoculation treated with caspofungin. Clin Microbiol Infect 9:1238-1241, 2003

27. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-Time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of gaactomannan antigen in serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 40(6):2224-2227, 2002
28. Creger RJ, Weeman KE, Jacobs MR, Morrissey A, Parker P, Fox RM, Lazarus HM. Lack of utility of the Lysis-Centrifugation blood culture method for detection of fungemia in immunocompromised cancer patients. *J Clin Microbiol* 36:290-293, 1998
29. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 10 (Suppl. 1): 67-75, 2004
30. Dolen WK. Risk factors for allergic *Aspergillus* sinusitis. *Med Mycol* 44:273-275, 2006
31. Dupont B, Richardson M, Verweij PE, Meiss JFGM. Invasive aspergillosis. *Med Mycol* 38(Suppl.1):215-224, 2000
32. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, Bowden RA, Burik van J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35(6):1353-1360, 1997
33. Einsele H, Quabeck K, Muller KD, Hebart H, Rothenhofer I, Löffler J, Schaefer UW. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation. *Lancet* 352(9138):1443, 1998
34. El-Hamamsy I, Dürleman N, Stevens LM, Perrault LP, Carrier M. *Aspergillus* endocarditis after cardiac surgery. *Am Thorac Surg* 80:359-364, 2005
35. Feman SS, Nichols JC, Chung SM, Theobald TA. Endophthalmitis in patients with disseminated fungal disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 100:67-70, 2002

36. Franquet T, Müller NL, Gimenez A, Guembe P, Torre de la J, Bague S. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *RadioGraphics* 21:825-837, 2001
37. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9:499-511, 1996
38. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 40(4):1567-1568, 2002
39. Gavalda J, Martin T, Lopez P, Gomis X, Ramirez JL, Rodriguez D, Len O, Puigfel Y, Ruiz I, Pahissa A. Efficacy of high loading doses of liposomal amphotericin B in the treatment of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 11:999-1004, 2005
40. Gordon SM, Avery RK. Aspergillosis in lung transplantation: Incidence, risk factors, and prophylactic strategies. *Transpl Infect Dis* 3:161-167, 2001
41. Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resistance Updates* 3:364-383, 2000
42. Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol* 55:1187-1191, 2006
43. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. *Medicine (Baltimore)* 78(4):220-227, 1999
44. Hayashi R, Kitamoto N, Iizawa Y, Ichikawa T, Itoh K, Kitazaki T, Okonogi K. Efficacy of TAK-457, a novel intravenous triazole, against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 46(2):283-287, 2002

45. Hebart H, Loeffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, Martin H, Engel A, Bunjes D, Kern WV, Schumacher U, Kanz L, Einsele H. Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infect Dis 181:1713-1719, 2000
46. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev 9:469-488, 1996
47. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 5:609-622, 2005
48. Jantunen E, Ruutu P, Niskanen L, Volin L, Parkkali T, Kahköla-PK, Ruutu T. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients. Bone Marrow Transplant 19:801-808, 1997
49. Kalkanci A, Kustimur S, Sucak GT, Senol E, Sugita T, Adams G, Verkley G, Summerbell R. Fulminating fungal sinusitis caused by *Valsa sordida*, a plant pathogen, in a patient immunocompromised by acute myeloid leukemia. Med Mycol 44:531-539, 2006
50. Kami M, Fukuti T, Ogawa S. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 33:1504-1512, 2001
51. Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA Topoisomerase II gene. Microbiol Immunol 46(12):841-848, 2002
52. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: Mikoloji, patogenezi, laboratuvar tanımı, antifungal direnç ve duyarlılık deneyleri. Cerrahpaşa J Med 34:140-157, 2003

53. Kappa R, Okeke CN, Fauser C, Maiwald M, Sonntag HG. Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *J Med Microbiol* 47:811-820, 1998
54. Karabay O, Madariaga MG, Kocoğlu E, Ince N, Kandirali E. *Trichosporon asahii* fungemia in a patient with non-hematological malignancy. *Jpn. J. Infect Dis* 59:129-131, 2006
55. Karabey S. Mantarların etken olduğu hastane infeksiyonlarından korunma. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. Yeğenoğlu Y, Erturan Z (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:46 2003, S. 67-74
56. Karacan Ö, Akçay Ş, Eyüboğlu FÖ, Çelik N, Çolak N, Timurkaynak F, Demirhan B. Solid organ transplant alıcılarında invaziv pulmoner aspergillozis. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 51(2):177-182, 2003
57. Kauffman CA. The changing landscape of invasive fungal infections: Epidemiology, diagnosis and pharmacologic options. *Clin Infect Dis* 43:1-2, 2006
58. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of Real-Time PCR, Double-Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-Glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders *J Clin Microbiol* 42:2733-2741, 2004
59. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 12:745-753, 2006
60. Kojima R, Tateishi U, Kami M, Murashige N, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Kusumoto M, Miyakoshi S, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takue Y. Chest computed tomography of late invasive aspergillosis after

- allogenic hematopoietic stem cell transpantation. Biol Blood Marrow Transpl 11(7):506-11, 2005
61. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: An update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21(3):161-172, 2002
 62. Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 9:34-46, 1996
 63. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique efficacy of Amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother 46:1773-1780, 2002
 64. Kurup VP, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev 4:439-456, 1991
 65. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 12:310-350, 1999
 66. Leblond IT, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy 60:1004-1013, 2005
 67. Lehmann PF, White LO. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. Infect Immun 12:987-992, 1975
 68. Leibovitch I, Lai T, Raymond G, Zadeh R, Nathan F, Selva D. Endogenous endophthalmitis: a 13 year review at a tertiary hospital in South Australia. Scand J Inect Dis 37:184-189, 2005
 69. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 32:358-366, 2001
 70. Lo Re III V, Fishman NO, Nachamkin I. Recurrent catheter related *Rhodotorula rubra* infection. Clin Microbiol Infect 9:897-900, 2003

71. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmeyer L, Schumacher U, Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler System. *J Clin Microbiol* 38:586-590, 2000
72. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najwar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Dietz K, Bialek R, Einsele H. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 185:1203-6, 2002
73. Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 39:797-802, 2004
74. Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Intern J of Antimicrobiol Agents* 27S:S3-S6, 2006
75. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol* 43(Suppl.1):125-128, 2005
76. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol* 126:289-297, 2004
77. Melchers WJ, Verweij PE, H van den P, Belkum van A, Pauw de BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 32:1710-1717, 1994
78. Merhav H, Nakache R, Houri I, Wasserlauf RO. Liposomal Amphotericin B (Ambisome) is safe and effective in the treatment of invasive mycosis in organ transplant patients. *Transplant Proc.* 33:2937-2938, 2001

79. Miyabe S, Kouzika I, Ochi K, Tanaka K, Kurado H, Kenmochi M, Okada T, Tomisawa H, Sugiyama Y. Two cases of *Aspergillus* sinusitis with bone destruction. *Auris Nasus Larynx* 30:115-121, 2003
80. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 42:5517-5522, 2004
81. Mutlu G. *Aspergillus* ve Aspergilloz. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.36 1999, S. 17-35
82. Mutlu G. Aspergilloz. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. Yeğenoğlu Y, Erturan Z (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:46 2003, S. 221-232
83. Nash G, Irvine R, Kerschmann L, Herndier B. Pulmonary aspergillosis in acquired immune deficiency syndrome: autopsy study of an emerging pulmonary complication of human immunodeficiency virus infection. *Human Pathology* 28: 1268-1275, 1997
84. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect Dis Clin N Am* 17:135-158, 2003
85. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A, Ito A, Yamaguchi H, Shimada K, Kawai T. Plasma (1→3) beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 345:17-20, 1995
86. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Zeichner LO. β -D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with

- acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 39:199-205, 2004
87. Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 12(11):1060-1076, 2006
88. Pasqualotto AC, Denning DW. Diagnosis of invasive fungal infections-current limitations of classical and new diagnostic methods. *Business Briefing:Eur Oncol Rev* 1-11, 2005
89. Patterson TF. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 43:115-119, 2005
90. Patterson TF, Aspergillosis. *Clinical Mycology*. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (ed) 2003, 221-240
91. Pauw de BE, Patterson TF. Should the consensus guidelines specific criteria for the diagnosis of invasive fungal infection be changed. *Clin Infect Dis* 41:S377-80, 2005
92. Pazos C, Ponton J, Palacio AD. Contribution of (1→3)- β -D-Glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 43:299-305, 2005
93. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 43:3-14, 2006
94. Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. *Clinical Mycology*. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA(ed) Churchill Livingstone, Philadelphia 2003, S:3-19

95. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1→3)- β -D-Glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol 43:5957-5962, 2005
96. Ram FJA, Arentshorst M, Damveld RA, vanKuyk PA, Klis FM, Hondel van den AMJJ. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall. Microbiol 150:3315-3326, 2004
97. Reiss E, Lehmann PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. Infect Immun 25:357-365, 1979
98. Richardson MD, Kokk M. *Aspergillus*. Clinical Mycology. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA(ed) Churchill Livingstone, Philadelphia 2003, S:273-296
99. Roilides E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in infants and children. Med Mycol 44:199-205, 2006
100. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, Sorda ML, Franco A, Fadda G. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol 41:3922-3925, 2003
101. Saraçlı MA. Aspergilloz tanısında moleküler yöntemler. *Aspergillus*. Ener B (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:56 2006, S.195-201
102. Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. Clin Diag Lab Immunol 12:1322-1327, 2005

103. Segal BH, Chung JK, Walsh TJ, Klein BS, Battiwalla M, Almyroudis NG, Holland SM, Romani L. Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 42:507-515, 2006
104. Seki M, Maseki S, Hashiguchi K, Tomiyama Y, Tomono K, Tashiro T and Kohno S. *Aspergillus fumigatus* isolated from blood samples of a patient with pulmonary aspergilloma after embolization. *Internal Medicine* 39(2):188-190, 2000
105. Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 12:376-380, 2006
106. Silveira F, Paterson DL. Pulmonary fungal infections. *Curr Opin Pulm Med* 11:242-246, 2005
107. Simarro E, Mann F, Morales A, Sanz E, Perez J, Ruiz J. Fungemia due to *Scedosporium prolificans*: a description of two cases with fatal outcome. *Clin Microbiol Infect* 7:645-647, 2001
108. Singh N. Invasive aspergillosis in organ transplant recipients: new issues in epidemiologic characteristics, diagnosis and management. *Med Mycol* 43(Suppl.1): 267-270, 2005
109. Singh N, Husain S. *Aspergillus* infections after lung transplantation: Clinical differences in type of transplant and implications for management. *J Heart Lung Transplant* 22:258-266, 2003
110. Somer A. İnvaziv *Aspergillus* infeksiyonları ve tedavisi. *Güncel Pediatri* 4:154-158, 2006
111. Steinbach WJ, Benjamin DK, Trasi SA, Miller JL, Schell WA, Zaas AK, Foster WM, Perfect JR. Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 42:417-425, 2004

112. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immnosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 33:497-500, 1995
113. Tarrand JJ, Han XY, Kontoyiannis DP. *Aspergillus* hyphae in infected tissue: evidence of physiologic adaptation and effect on culture recovery. J Clin Microbiol 43:382-386, 2005
114. Tomee JF Ch, Werf van der TS. Pulmonary aspergillosis. Neth J Med 59:244-258, 2001
115. Tomee JFCH, Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. Clin Exp Allergy 30:476-484, 2000
116. Uzun Ö. Antifungal kombinasyon tedavisi. ANKEM Derg. 20(Ek 2):36-37, 2006
117. Valluri S, Moorthy RS, Liggett PE, Rao NA. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis in an immunocompetent individual. Int Ophthalmol 17(3):131-5, 1993
118. Verweij PE, Figueroa J, Burik JV, Holdom MD, DeI-Cas E, Gomez BL, Mendes-Giannini MJ. Clinical application of non-culture based methods for the diagnosis and management of opportunistic and endemic mycoses. Med Mycol 38(Suppl. 1): 161-171, 2000
119. Verweij PE, Meis JFGM. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. Transpl Infect Dis 2:80-87, 2000
120. Wald A, Leisenring W, Burik van JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow tansplantation. J Infect Dis 175:1459-1466, 1997

121. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 10(Suppl. 1): 48-66, 2004
122. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl Infect Dis 1:247-261, 1999
123. Warris A, Gaustad P, Meis JFGM, Voss A, Verweij PE, Abrahamsen TG. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. J Hosp Infect 47:143-148, 2001
124. White PL, Barnes RA. *Aspergillus* PCR-Platforms, strengths and weaknesses. Med Mycol 44:191-198, 2006
125. Williamson EC, Leeming JP, Palmer HM, Stewart CG, Warnock D, Marks DI, Millar MR. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. Br J Haematol 108(1):132-139, 2000
126. Williamson ECM. Molecular approaches to fungal infections in immunocompromised patients. University of Bristol, 2001
127. Wingard JR, Leather HL. Diagnosis and therapy of invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell transplant recipients. Curr Treat Option Infect Dis 5:517-527, 2003
128. Withington S, Chambers ST, Beard ME, Inder A, Allen JR, Ikram RB, Schousboe MI, Heaton DC, Spearing RI, Hart DNJ. Invasive aspergillosis in severely neutropenic patients over 18 years: impact of intranasal amphotericin B and HEPA filtration. J Hosp Infect 38, 11-18, 1998

129. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 34(10):2464-2468, 1996
130. Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol 36:3619-3623, 1998
131. Yapar N, Şener A, Kuruüzüm Z, Yücesoy M, Yüce A. Bir üniversite hastanesinde bir yıllık dönemde izlenen invazif fungal infeksiyonların değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 18(2):67-70, 2005
132. Yeo FS, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 15:465-484, 2002
133. Yıldırım ŞT. *Aspergillus'* a karşı kazanılmış bağışıklık; TH1/TH2 dengesi. *Aspergillus*. Ener B (ed). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:56 2006, S.103-113
134. Yücesoy M. *Aspergillus* türleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Kongre kitabı 2004, S. 15-17
135. ZeichnerLO, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA, Rex JH. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) β -D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis 41:654-659, 2005

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Fatsa’ da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul Küçükaly Merkez İlkokulu, Küçükaly 50. Yıl Lisesi ve Kadir Has Lisesi’ nde tamamladım. 1995 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi’ nden mezun oldum. Sivas, İstanbul ve Ankara illerinde pratisyen hekim olarak görev aldım. 2003-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ nda araştırma görevlisi olarak çalıştım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.