



T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA
İNVAZİF ASPERGİLLOZ TANISINDA
GALAKTOMANNAN ANTİJENİNİN SAPTANMASINDA
ENZİM İMMÜNASSAY VE LATEKS AGLÜTİNASYON
YÖNTEMLERİNİN KULLANILMASI**

+

Dr. H. Nevgün SEPİN ÖZEN

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

“Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
2002.01.0103.002 numaralı proje ile desteklenmiştir”

Antalya, 2005

TEŞEKKÜR

Eğitimimde ve tez çalışmamda emeği geçen tez danışmanı hocam Prof.Dr. Meral Gültekin başta olmak üzere, hocalarım Prof.Dr. Gönül Mutlu, Prof.Dr. Dilek Çolak, Prof.Dr. Tümer Vural, Doç.Dr. Dilara Öğünç, Yrd.Doç.Dr. Gözde Öngüt'e yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Uzman arkadaşım Dr. Betil Özhak'a yardımları ve moral desteği için teşekkür ederim.

Ayrıca tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma merkez laboratuvarı ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana mutlu ve huzurlu bir ortam sağlayarak, tüm zorlukları aşıp başarıya ulaşmamda en büyük desteğim olan başta annem olmak üzere eşime, tüm kardeşlerime teşekkür ederim.

Dr. H. Nevgün Sepin ÖZEN
Antalya, 2005

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	İii
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe ve Taksonomi	2
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Morfolojik Özellikler	5
2.4. Üreme Özellikleri	6
2.5. Patogenez	6
2.6. Virulans Faktörleri	7
2.7. Klinik	10
2.8. Tanı	14
2.9. Tedavi	19
2.10. Korunma ve Kontrol	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Hastalar	22
3.2. Örneklerin Sayı ve Özelliklerinin Belirlenmesi	23
3.3. Sandviç ELISA Aspergillus GM Ag Testinin Uygulanması	24
3.4. Lateks Aglütinasyon Aspergillus GM Ag Saptama Yöntemi	25
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	32
ÖZET	33
KAYNAKLAR	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

İA	İnvazif Aspergilloz
GM	Galaktomannan
Ag	Antijen
DNA	Deoksiribonükleik Asit
CFU	Colony Forming Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIA	Radio Immunassay
SDA	Sabouraud Dekstrozu Agar
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
PAS	Periyodik Asit-Schiff
kDa	Kilo Dalton
PNL	Polimorfonüveli Lökositler
KOH	Potasyum Hidroksit
mm	Milimetre
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ g	Mikrogram
ELISA	Enzyme-linked immunabsorbant assay

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Aspergilloz için risk faktörleri	11
2.2. Aspergillus infeksiyonlarının sınıflandırılması	12
3.1. Hemotolojik maligniteli, hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı.	22
3.2. EORTC/MSG tanı kriterine ve febril nötropeni ataklarına göre vaka kategorisi	23
Şekil	
Şekil 1 Aspergillus'un Yapısı	6

1. GİRİŞ

Canlıların beş aleminden birini oluşturan mantarlar, ökaryotik hücre yapısına sahiptirler ve infeksiyonlarda fırsatçı patojen olarak rol alırlar. Fırsatçı mantar infeksiyonları belirli bir bölgeye bağlı olmaksızın bütün dünyada görülebilen, vücut direnci bozulmuş kimselerde ortaya çıkan invazif hastalıklar yaparlar (1).

Küf mantarları arasında çok önemli bir yere sahip olan *Aspergillus* türleri doğada çok yaygın olarak bulunan ve çeşitli faktörlerin varlığında fırsatçı infeksiyonlar yapabilen mantarlardır. Çürümüş organik maddelerde, samanda, tozda, yiyeceklerde, suda ve havada bulunabilirler. *Aspergillus* türlerinin hematolojik maligniteli, yüksek doz kortikosteroid tedavisi alan ve transplant hastaları gibi immün yetmezlikli hastalarda sıklıkla fatal seyreden invazif aspergilloz (İA) önemli bir fungal infeksiyondur. IA immünsüprese hastalarda önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Hastalığın belirti ve bulguları nonspesifik olup kültürün duyarlılığının düşük olması nedeniyle fungal kültürlerde patojenin üretilme şansı düşüktür. Bu nedenle tanıda yeni arayışlara geçilmiş ve mantar tarafından salınan ve dolaşıma geçen maddelerin saptanmasını temel alan tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile fungal DNA, sandviç ELİSA veya lateks aglütinasyon (LA) yöntemleri ile galaktomannan (GM) antijeninin (Ag), ELİSA yöntemi ile $\beta(1-4)$ antijeninin saptanmasıdır (1, 2).

Bu çalışmada; Akdeniz Üniversitesi Hematoloji Birimi'nde yatan IA gelişimi yönünden yüksek risk taşıyan febril nütropenik erişkin hastaların serum örneklerinden GM Ag varlığının sandviç ELİSA ve lateks aglütinasyon yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Aspergillus türleri; doğada hemen hemen her yerde çok yaygın özellikle çürümüş organik maddelerde, samanda, tozda, yiyeceklerde suda yaşarlar ve havada da bulunabilirler. Aspergillus türleri içinde patojen ve fırsatçı patojen olan türler vardır. Yaklaşık 200 çeşit Aspergillus türü bulunmasına rağmen, insanlarda hastalık yapanların sayısı oldukça azdır. *Aspergillus fumigatus* , *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger* insanlarda en sık infeksiyon oluşturan Aspergillus türleridir *Aspergillus terreus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niveus* ve *Aspergillus nidulans* insanlarda nadiren hastalık yaparlar (3) .

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Mantar infeksiyonlarına ilişkin bilinen en eski belge M.Ö. 2000-1000 arasına tarihlenen Hindu kutsal yazıtında (Samhita) bulunmaktadır ve ayaktaki misetomadan söz edilmektedir.

G. Bauhin (1560-1624) mantarlar üzerine araştırmalar yapmış ve "Pinax Theatri Botanici" adlı eserinde 100 kadar mantarın özelliklerini bildirmiştir.

Mikolojinin kurucusu sayılan İtalyan botanist P.A. Micheli 1729'da Nova Plantarum Genera'da mantarla ilgili araştırmalarını yayınlamıştır. H. Peroson (1761-1836), mantarlara ilişkin incelemelerini, taksonomik bir yapıt olan "Synopsis Methodica Fungorum" (1801)'da toplamış, ayrıca Mycologia Europea üç cilt halinde yayınlamıştır. Bu konuda ayrıca "Mycologia Europea" (1822; 1828) adlı çalışmaları da yayınlamış; mantarları iki sınıf, altı takım ve 71 cinse ayırarak sınıflandırmıştır. E. Fries (1794-1878), bugünkü mantar sistematığının esasını kurmuş, "Systema Mycologicum" adlı eseri hazırlamıştır (3, 4, 5).

Mantarlar, 1969'da Whittaker tarafından yeniden açıklanıp birçoklarınınca benimsendikten sonra, doğadaki canlıları beş evrene ayıran yeni sistemde; bitkiler, hayvanlar, protistler ve monerlerden ayrı bir evren olarak kabul edilmektedir. Bu evreni oluşturan canlılar; basidiocarpus'larının biçiminden dolayı şapkalı mantarlar denilen ve çıplak gözle görülen belirli yapıdaki mantar türlerinden, iri bir amip gibi görünen çok çekirdekli yapışkan küflere; tek hücreli ve ancak mikroskopta

görülebilenlere kadar çeşitlidir. Mantarları inceleyen bir bilim dalı olan mikoloji sözcüğü aslında Yunanca şapkalı mantar anlamına gelen "mykes" kelimesinden kaynaklanmaktadır. G. Banti'nin ölümle biten bir beyin feohifomikozunda etkeni tanımlanmak üzere gönderdiği Saccardo bu yeni türe *Torula bantiana* adını vermiştir. Emmons da bir beyin feohifomikozundan ayırdığı aynı etkeni *Cladosporium trichoides* olarak tarif etmiş; daha sonraki karşılaştırmalı çalışmalarla bu mantarın sınıflandırmadaki bugünkü yeri de Hoog, Kwon-Chung ve McGinnis tarafından *Cladophialophora bantiana* olarak belirlenmiştir. "Hyalohifomikoz" terimi Ajello ve McGinnis tarafından etkenin konak dokusundaki şeklinin hücre duvarında pigment bulunmayan bölmeli hifli mantarlarla oluşan mikozları tarif etmek üzere önerilmiştir. Benzer şekilde konak dokusunda bölmeli ve koyu renkte hifli mantarlarla oluşan deri altı ve sistemik mikozlar için de "feohifomikoz" terimi önerilmiştir. Bunlar şemsiye terimlerdir ve hyalohifomikoz teknik olarak aspergilloz, psödalleşeriyaz, şeffaf hifli mantarların oluşturduğu keratomikoz, fusarioz ve bazidyomikozu kapsar. Fakat pratikte aspergilloz iyi tanındığından, hyalohifomikoz adı esasen saydam duvarlı Hifomisetlerden seyrek rastlanan fırsatçı mantarların sebep olduğu infeksiyonları ifade etmek için kullanılmaktadır. Her iki terim de belirli bir klinik sendromu temsil etmemekte, ancak etkenin tanımı yapılınca kadar kolaylık sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (2, 4, 6).

Genel ve özel mikoloji alanında mantar morfolojisi ve fizyolojisi ile ilgili bilgiler, taksonomi, mikozların epidemiyolojisi ilerleyen zaman içerisinde hızla değişmekte, gelişmekte ve yoğunlaşmaktadır.

Aspergillus türlerinin; telemorfik genuslar seksüel (eşeyli) formları, anomorfik genuslar ise aseksüel (eşeysiz) formlarıdır. Taksonomik olarak *Aspergillus* cinsi Deuteromycota bölümünün Hyphomycetes sınıfının Moniliaceae ailesinde yer alır. Telemorfik şekilleri Eumycota bölümünün Ascomycota altbölümünde, Eurotiomycetes sınıfının Eurotiales takımı ve Trichocomaceae ailesinde yer almaktadır (7, 8).

2.2. Epidemiyoloji

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde, toprakta ve özellikle çürüten organik maddelerde yaygındır. Sahip oldukları zengin enzim sistemleriyle organik materyalleri ayrıştırarak kullanabildikleri ve diğer mikroorganizmalar için çok düşük nem düzeylerinde bile gelişebildikleri için, depolanmış tahıl ve tohumlarda, unlarda, deri ve tekstil ürünlerine kadar çeşitli gıda ve eşyalarda; ayrıca dış ortamda, hastane ve evlerin iç ortamlarındaki havada asılı olarak bol bulunurlar. Günümüzde *Aspergillus* cinsinin kabul edilmiş 200'den fazla türü bulunmakta ve yeni türler de tanımlanmaktadır (9). İA'a en sıklıkla sebep olan türler *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* olup daha nadir olarak hastalığa sahip olanlar *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Neosartoria fisceri* olarak sayılmaktadır (10).

Aspergillus türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidyumlar genelde 2-5 µm çapındadırlar ve hava ile taşınırlar. Aspergilloz çoğunlukla havadaki konidyumlarının solunumla alınmasıyla bulaşırsa da ameliyatlar sırasında dokuyu infekte edebilmekte; kontamine hastane takımları ile de vücuda girebilmektedir. Bu mantarlarla kontamine yapıştırıcı bantların primer kutanöz aspergilloza kaynak olduğu bildirilmiştir. Normal sağlıklı kişilerde kornea ve deriden travmalarla da girebilmektedir. İnvazif aspergilloz daha sıklıkla bağışıklığı baskılanmış hastalarda ortaya çıktığından hastane içi havasında *Aspergillus* konidyumlarının bulunması önemlidir (11,12). Havadaki *Aspergillus* yoğunluğu ile invazif hastalık veya kolonizasyon arasındaki korelasyonu araştıran moleküler epidemiyoloji çalışmaları yapılmış olup dış ortam konidyum düzeyi 1000-5000 cfu/m³ olarak bildirilmiştir (13, 14, 15).

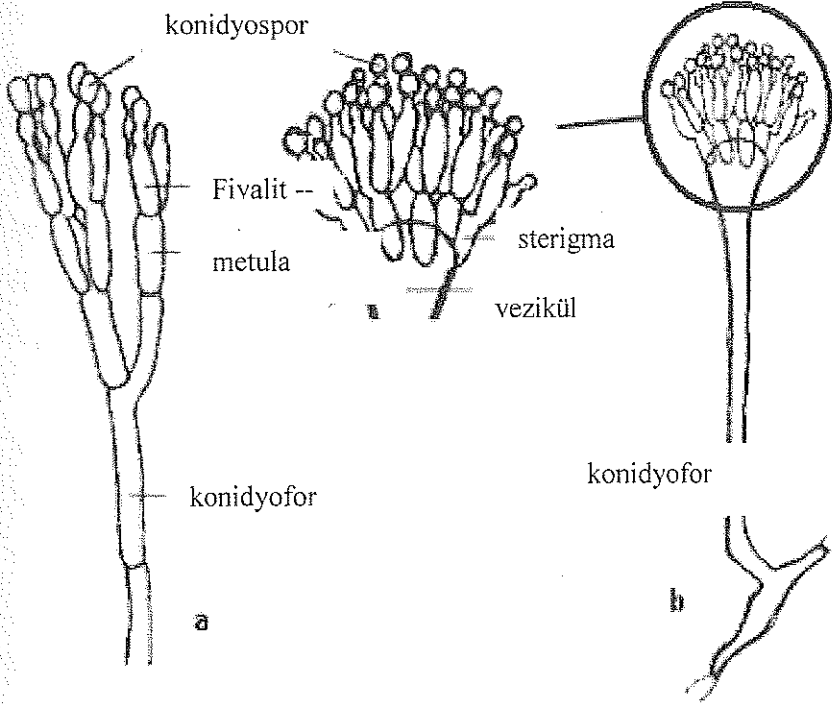
2.3. Morfolojik Özellikleri

Koloniler genellikle hızlı gelişirler; renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, siyaha yakın kahverengi veya yeşil tonlarında harelidir; sık konidyoforların oluşturduğu bir keçe görünümündedir. Koloni rengi daima, vegetatif hiflerin, konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır. Besiyerine dağılan pigment üretebilirler ve bu pigmentin rengi koloninin hava miselli kısmının renginden farklı olabilir. Hifler bölmelidir, ince veya kalın olabilir; hif hücreleri sıklıkla çok çekirdeklidir. Miselyum birçok enzimler ve bazı mikotoksinler üretme yeteneğine sahiptir. Vegetatif hifin “ayak hücresi” denen özelleşmiş bir hücresinden dik olarak çıkan konidyofor denen konidyum taşıyıcı hiflerin ucu şişkinleşmiştir, yukarı doğru oluşturdukları yuvarlak veya oval biçimindeki baş kısmına “vezikül” denir. Vezikül üzerindeki üreyen sporlara göre tür ayrımı yapılır (10, 16).

Konidyum yapıcı hücreler olan “fiyalidler”(sterigmata) ya doğrudan vezikülün üzerinde (uniseriate) veya metulaların üzerinde (biseriate) doğarlar ve altındaki sap denilen hücre ile birlikte konidyumlu baş denen tipik görünümü oluştururlar. Konidyoforun uzunluğu; bölmeli, bölmesiz veya dallanmış oluşu ve duvarının düz, pürüklü, dikenli olması gibi özellikleri türlere göre farklıdır. Yeni bir duvarla sarılmış olan konidyumların oluşumu sırasında konidyum yapıcı hücrenin (fiyalid) kendisi büyümeyen ve bunun dış tabakası konidyumu örtmek üzere uzamaz (enteroblastik gelişim). Konidyumlar ardarda dizilerek tesbih şeklinde zincirler oluştururlar ve böyle bir zincirde en genç hücre en diptekidir. Konidyum zincirleri ya sütunlar halinde veya ışınsal dizilim gösterirler. Konidyumlar bir hücreli, duvarları düz veya pürüzlü, dikenli, şeffaf veya pigmentli olabilirler. Bu özellikler türlerin ayırımında önem taşır (9, 10, 16, 17). Mikroskopik görünümüne göre *A. fumigatus*'un; düzgün yüzeyli ve kısa konidyoforları, tek sıralı fiyalitleri olup vezikülün 2/3 üst yarısından başlar. Konidyoforun eksenine paralel dizilim gösterirler. *A. flavus*; yüzeyi pürüklü veya dikensi çıkıntılı konidyoforlar, tüm kesecik yüzeyini kaplayan ve tüm yönlerde uzanan sterigmata ve pürüklü yüzeyli konidyumların yaptığı zincirler oluştururlar. *A. niger*; düzgün yüzeyli konidyofor,

çift çift sıralanmış, tüm keseciği örten ve ışınsal bir dizilim gösteren fialitler oluşturur. Şekil 1'de *Aspergillus*'un yapısı gösterilmiştir (18,19).

Şekil 1: *Aspergillus*'un yapısı



2.4. Üreme Özellikleri

Aspergillus türleri termotolerandır. İnsana patojen türler 37°C'de ürerler. İnvazif infeksiyonlardan en sık soyutlanan *A. fumigatus* 45°C'de de iyi ürer. Sikloheksimit *Aspergillus* türlerinin üremesini inhibe eder. Her besiyerinde kolonileri hızla gelişir. *Aspergillus* türlerinin birbirinden ayrımı üreyen kolonilerin özellikleri ve mikroskopik görünümüne göre yapılır. *Aspergillus* kolonileri kadifemsi veya pamuğumsu örgüdedir. Beyaz, sarı, sarımsı, yeşil ve kahverengi veya siyah renklidir. Koloni tabanı beyaz, sarı veya sarımsı kahverengidir (7, 20, 21).

2.5. Patogenez

Küf morfolojisindeki mantarlara doğada ve insanın çevresinde sık rastlanır ve hastalık yapabilmeleri (patojeniteleri) ile ilgili temel mekanizma onların dokudaki

ısıya ve redoks potansiyeli gibi diğer koşullara uyum gösterebilme ve konağın savunmasına karşı dayanma yeteneklerinde saklıdır. Yüksek virülansa sahip konidi veya diğer elemanlarının yeterli sayıda alınmasıyla bağışıklığı tam kimselerde de infeksiyon oluşturabilen mantarlar "primer patojenler" olarak nitelendirilmektedir. En önemli ortak özellikleri konağa yerleştikleri sırada kendi yapılarında, hücre duvarlarının içeriğinde, metabolizmalarında, enzim sistemlerinde ve çoğalma biçimlerinde büyük değişiklikler oluşturabilme yetenekleridir. İnsan vücudunda mantar infeksiyonlarına karşı doğal direnç vardır. İnsanda mantar hastalığı bulunması, herhangi bir yolla savunma mekanizmasının zayıflamış olduğunu gösterir (1, 11, 22). İstatistiklere göre bu infeksiyonlarda cinsiyet, yaş ve ırk önem taşımaktadır ve etkenler sınırlı coğrafya dağılımı göstermektedirler.

Mantarlar patojenlik özelliklerine, konağın direncine, vücuda giriş kapısına ve alınan mantar miktarına göre değişik tarzda görülebilen mikozlar oluştururlar. İnfeksiyonun başlangıç yerine göre mantar infeksiyonları geniş gruplara ayrılabilir. Buna göre patojen mantarların sebep olduğu infeksiyonlar, "yüzeyel mikozlar" ve "derin mikozlar" olarak ikiye ayrılabilir. Yüzeyel mikozlarda epidermis, saçlar, tırnaklar ve mukozaların en üst tabakaları tutulmaktadır, daha derine nüfuz ve sistemlere yayılma yoktur. Derin mikozlarda ise daha derin tabakaların tutulması söz konusudur ve iç organlara yayılma olabilir (23, 24).

2.6. Virülans Faktörleri

Derin mikozlara sebep olan patojen mantarlar konak dokusunda bazı faktörlere bağlı olarak hastalık oluştururlar. Virülans faktörleri olarak bilinen bu faktörler mikozun patogeneğinde belirleyici rol oynarlar. Hifomisetlerde belirlenen virülans faktörleri sıcaklık toleransı, dimorfizm, kapsül veya hücre duvarı bileşikleri ve enzim üretimidir. Virülans faktörleri mantarın adezyonunu, kolonizasyonunu, yaygın olmasını ve konak ortamında canlılığını sürdürmesini sağlar ve konağın bağışık yanıt mekanizmalarını etkisizleştirmeye çalışır. Mantarın sahip olduğu virülans faktörleri ile konağın savunma mekanizmaları arasındaki ilişkiler derin mikozların patogeneğinde rol oynar (1, 25, 26).

2.6.1. Mantarla ilgili faktörler

Aspergillus'lar konak vücuduna girdiğinde (i) solunan mantar elemanlarına karşı alerjik yanıt oluşturabilir, (ii) vücut içindeki hava boşluklarında kolonizasyon ve (iii) dokuya invaze olabilirler. *Aspergillus*'lar konak dokusuna girebilmek için insanın solunum yolları epitellerine yapışabilmeli ve nüfuz edebilmeli; etrafındaki hücreleri, özellikle *Aspergillus*'lara karşı konak savunmasında rol alan fagositöz yapıcı hücreleri öldürmeli ve konak dokusundaki koşullara uyum sağlayarak gelişmelidir (2, 16, 22).

Sıcaklık toleransı: Bir kısım *Aspergillus* türleri 37°C'de gelişme yeteneğinden yoksundur; bu özellik patojen olan türleri olmayanlardan ayırt etmekte yararlıdır.

Gelişme hızı: Mantarın gelişme hızı hastalık geliştirme ve patojenite ile ilişkili görülmektedir. En hızlı gelişen tür *A. fumigatus* olup 37°C'de çimlenme hızı besiyerine bağlı olarak 5-12 saattir.

Konidyum boyutu: *Aspergillus* konidyumları solunumla alındığında akciğerdeki alveollere ulaşabilecek kadar küçüktürler (2-5 µm) ve dokuya kolayca nüfuz edebilirler. Konidyumlar, hidrofobik protein tabakası sayesinde atmosfer koşullarına dayanma yeteneğindedir. Patojen türler içinde *A. fumigatus* laminini ve fibrojeni etkili biçimde bağlar ve invazyondan önce mantar elemanlarının konağın hava yollarına daha fazla adezyonunu sağlar (11, 20).

Adezinler: Konidyumlar, fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albümin, kollajen, surfaktan proteinler gibi konağın membranla ilgili çeşitli proteinlerini yüzeyel olarak bağlarlar (27, 28). Bu bağlanma özgül olmayan fizyokimya etkileşimleri ve/veya özgül reseptör ligand tanıma ile gerçekleşir. *A. fumigatus* konidyumlarının en dış tabakası hidrofobik proteinlerden (hidrofobinler) oluşur ve konidyumlara hidrofobik özellik kazandırır. *A. fumigatus*'un çimlenen konidyumlarında ve miselyumunda hidrofobik proteinler belirlenmişse de bunların yapı ve rolleri tam olarak ortaya konulmamıştır. Konidyumların yüzeyindeki karbonhidrat ve protein molekülleri konak proteinlerine spesifik olarak bağlanırlar. Fibrinojen, laminin, fibronektin ve kompleman bağları konidyumun iç ve dış duvar tabakalarıyla ilgilidir ve her protein farklı bir yerleşim gösterir. *A. fumigatus*

adezinlerinin in vitro aderens deneylerinde bu mantarın konidyumlarının akciğer hücrelerine özgül olarak bağlandığı gösterilmiştir (11, 12).

Pigmentler: Pigmentten yoksun olan *A. fumigatus*'un yabani tip kökenlerinin yeşil konidyumlu olan kökenlerden daha az patojen olduğu belirlenmiştir. Dehidroksinaftalen melanin biyosentezinde işlev gören iki gen ALB1 ve ARP1 yeni klonlanmıştır (11, 12).

Toksik moleküller: *A. fumigatus* birkaç toksik ikincil metabolit üretir, en önemlisi gliotoksindir. Bu molekül akut olarak toksik ve geniş ölçüde bağışıklığı baskılayıcı özelliğe sahiptir. Gliotoksinin makrofaj ve nötrofil fagositozunu önlediği; B ve T hücre aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiş ancak patogeneze katılıp katılmadığı henüz belirlenmemiştir. Bu mantarın diğer toksik ikincil metabolitleri de epitel yüzeyine tutunma süresini uzatmaya yarar, invazyonu uyarabilirler. Bunlara ek olarak toksik etkili 18-kDa Rnaz ve 30 kDa hemolizin üretmektedir. Bunlardan 18-kDa Rnaz ASPF1 veya restriktosin olarakta bilinmektedir. Konidyumların hücre duvarında bulunur ve invazif aspergillozlu hastaların idrarında ve dokuda da salgılanmakta olduğu, dokuda mantarın etrafını çevreleyen nekrozlu bölgelerde de bulunduğu belirlenmiştir ve son derece güçlü toksisiteye sahiptir. Hemolizin, *A. fumigatus*'un hemolitik bileşigidir. Ftioik asit de çok sayıda *A. fumigatus* kökeni tarafından üretilir ve granülom oluşumunda rol alır, olasılıkla başlıca virülans faktörlerinden biri olduğu öne sürülmektedir (23, 25, 28).

Enzimler: Patojen mantarın konağın dokusunda ilerleyebilmesi için bazı enzimlere sahip olması gerekir. Akciğerin matriksi başlıca elastin ve kollajenden oluştuğu için elastogenolik ve kollagenolik enzimler başlıca rolü oynamaktadır. *A. fumigatus*'da bulunan çeşitli proteazlar, ribotoksin, fosfolipazlar, hemolizin ve diğer toksinler gibi çeşitli virülans faktörleri sayılmaktadır. *Aspergillus*'ların bir miktar süperoksitdismutaz, en az iki katalaz ve mannitol ürettikleri belirlenmiştir; bu maddelerin mantarı oksijen molekülünün, hidrojenperoksit, hidroksil radikallerinin ve fagositler tarafından üretilen diğer serbest radikallerinin tahribinden koruyabilirler (2, 22, 29, 30).

2.6.2. Konakla ilgili faktörler

Konak savunması: Burunda ve akciğerlerde *Aspergillus*'lara karşı ilk immünolojik savunma hattı konidyumları içeri alarak öldüren makrofajlardır. Hifler başlıca nötrofiller tarafından öldürülür, monositler ve makrofajlar da bu işleme katılır. Sporlar ve hifler komplemanı bağlarlar ancak hifler içeri alınamayacak kadar büyük olduklarından öldürme işlemi hücre dışında gerçekleşir. Aspergillozlu bir hastada histolojik yanıt, bağışıklığa bağlı olarak granümatöz yanıtta hiflerle grift haldeki ciddi nekroza kadar olabilir. AIDS'lilerde ve kronik granümatöz hastalıkta nötropeni ve nötrofil fonksiyon bozuklukları invazif *Aspergillus* için önemli risk faktörleridir. Kortikosteroidler makrofajların *Aspergillus* sporlarını, nötrofillerin ve mononükleer hücrelerin de hifleri öldürmesini bozar. Bu olumsuz etkinin bir dereceye kadar granülosit-koloni stimüle edici faktörle tedavi edilerek veya (in vitro) granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktörle muamele edilerek azaltılabildiği öne sürülmüştür. Veriler, T hücre işlevinin de, özellikle İA'un kronik şekillerinde önemli olduğunu göstermektedir (31).

İnokulum ve inkübasyon periyodu: İA gelişmesi; duyarlı bir konağın yeterli inokulumla karşılaşmasına bağlıdır.

Sonuç olarak, patojene özgü virülans faktörleri ile konağın savunma mekanizması hakkındaki bilgiler henüz tam değildir. (31, 32).

2.7. Klinik

Aspergillus türlerinin toksik, allerjik etkileri, kolonizasyonu ve invazyonu ile ilgili hastalıklara genel olarak aspergilloz denir. *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar çoğu kez hastanın altta yatan risk faktörleri ile ilişkilidir (Çizelge 2.1). Sağlıklı bireylerde de infeksiyonlar görülür.

Çizelge 2.1. Aspergilloz için risk faktörleri (7).

Aspergillus İnfeksiyonlarında Risk Faktörleri

Nötropeni
Akut lökoz
İmmünsüpresyon
Organ transplantasyonu
Alkol bağımlılığı
Karaciğer işlev bozukluğu
Antibiyotikler
Kronik hastalıklar

Aspergillus türlerinin neden olduğu hastalıklar Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (33).

Çizelge 2.2. Aspergillus infeksiyonlarının sınıflandırılması

A) Sağlıklı konaklarda hastalık

● Toksikoz, mikotoksikoz

Mikotoksin alınması

Diğer metabolitlerin alınması

● Allerjik manifestasyonlar

Allerjik astma

Allerjik rinit

Allerjik sinüzit

Ekstremsk allerjik alveolit

Hipersensivite pnömonisi

Allerjik bronko-pulmoner aspergilloz

● Yüzeyel infeksiyonlar

Kutanöz infeksiyon

Otomikoz

Sinüzit

Saprofit bronko-pulmoner aspergilloz

Trakeo-bronşit

●İnvazif infeksiyon

Tek organ tutulumu

Çoğul organ tutulumu

B) Doku hasarı ve yabancı cismin eşlik ettiği infeksiyonlar

●Keratit ve endoftalmit

●Yanık yara infeksiyonları

●Osteomyelit

●Prostatik valv endokarditi

●Vasküler graft infeksiyonu

●Aspergilloma (mantar topu)

●Ampiyem ve plöral aspergilloz

●Peritonit

C) İmmünsüprese hastalarda infeksiyon

●Primer kutanöz aspergilloz

●Sino-orbital infeksiyon

●Pulmoner aspergilloz

İnvaziv trakeobronşit

Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz

Akut invazif pulmoner aspergilloz

●Santral sinir sistemi aspergillozu

●İnvazif dissemine aspergilloz

2.7.1. Akciğer aspergillozu

Allerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA): Bronş ve bronşiyolları tutar. Peribronşiyoler infiltrasyonla birlikte eozinofilik infiltrasyon görülür. Balgamin mikroskopisinde eozinofiller, Charcot-Leyden kristalleri vardır. Hastalık

kronikleştiğinde bronşiyoler fibrozis solunum yetersizliğine yol açar. Bu hastalıkta sıklıkla *A. fumigatus* ve *A. flavus* etkindir (21, 32).

Tanı, şu kriterlere göre konur:

- Epizodik bronşiyal obstrüksiyon,
- Periferik kan eozinofilisi,
- A. fumigatus* antijeni ile deri reaksiyonu,
- A. fumigatus*'a karşı presipitan antikorların varlığı,
- Total serum IgE'sinin yüksekliği,
- Karaciğer infiltrasyonu,
- A. fumigatus* spesifik serum IgE ve IgG'sinin varlığı,
- Proksimal bronşiektazi

Aspergillom (mantar topu, miçetom): Pulmoner infiltrasyon bölgelerindeki kaviterlerin içinde ya da konjenital akciğer kistleri ve eski tüberküloz kaviterleri içinde oluşur. Paranazal sinüsleri de atake eden aspergillomalar bildirilmiştir. Kaviterler hava ile temas halinde olabilirse, Aspergillus vezikül ve konidyumları gelişir. Tamamen kapalı boşluklarda sadece hifler bulunur. Mantar topu içindeki hifler kompakt, deforme ve genelde ölüdürler. Birçok olguda mantar, boşluk çevresindeki dokuya invaze olmaz. Aspergillomlar zaman zaman hemoptizilere ve erozyonlara neden olurlar (33, 34).

İnvazif pulmoner Aspergilloz (İA): Genellikle immünsüpresyonlularda, nötropenik transplant alıcılarında, lösemili ve lenfomalılarda görülür. *A. fumigatus* ve *A. flavus* sık görülen iki tür olmakla beraber, *A. terreus* da etkindir. İnvazif pulmoner Aspergilloz önce nekrotizan pnömoni ile başlar. Belirtileri öksürük, ateş, solunum zorluğudur. Pulmoner invazyon semptomları gelişir. Hastalık kan damarlarına yayılır. Santral sinir sistemi akciğer dışı yayılımı en sık tutulan yerdir. Mantar hifleri, epitel hücreleri arasında çoğaldıktan sonra kan damarlarına invaze olur. Hastalık ilk başta akut seyrederek, ancak ilerlerse kronik seyirli nekrotizan ve ölümcül bir aspergilloz tablosu görülür. Akut akciğer invazif aspergillozunda; dispne, yüksek ateş ile birlikte akciğer filmlerinde minör infiltrasyon görüntülerinin saptandığı akut bir pnömoni tablosu vardır. Tedavi edilmeyen olgularda pnömoni ölümle sonuçlanır. Mortaliteyi konağın direnci belirler (33, 34).

Toksik aspergilloz: Aspergillus konidyumlarının yoğun olarak solunmasından sonra

alveoler bir reaksiyon sonucu ortaya çıkan dispne halidir. Alveoler reaksiyon kısa sürer ve hiçbir belirti bırakmadan kendiliğinden düzelir (33).

Allerjik (astmatik) aspergilloz: *Aspergillus* konidyumları ile uzun süreli karşılaşma sonucunda ortaya çıkan akut allerjik tipte bronş obstrüksiyonu ile seyirli klinik tablodur. Hastalarda *Aspergillus* konidyumlarına karşı özgül IgE ve eozinofili görülür. Klinik tablo kısa sürmesine karşın Konidyumlarla tekrar karşılaşıldığında hastalık tekrar nüks eder (34, 37).

Alveoler infiltratif aspergilloz: Solunan konidyumların, akciğerlerde doku infiltrasyonu yapmaksızın bir ya da birden çok odakta çoğalması sonucu dispneye neden olur. Akciğer filmlerinde yangısal reaksiyon bulguları görülebilir. Balgamdan *Aspergillus* üretilir ve hastaların serumlarında *Aspergillus*'a özgü IgG titresi yükselir (21, 31, 32, 34, 35, 36, 38)

2.8. Tanı

2.8.1. Örneklerin alınması, taşınması, saklanması ve işlenmesi

Mantar örneklerinin farklı infeksiyonlar nedeni ile değişik bölgelerden alınması gerekir. Bunlar transtrakeal aspirat, balgam, biyopsi materyalleri olabilir. Balgam örnekleri sabah erken saatte alınırsa *Aspergillus*'u yakalama şansı artar. Çift örneklerle çalışmak izolasyonu daha fazla artırır. *Aspergillus* için kan kültürlerinden izolasyon oranı çok düşüktür. Mantarlara özgü besiyerlerine ekilen materyal 28-30°C'de inkübe edilmeli, ayrıca 37°C'de de üreme özelliği kontrol edilmelidir. Klinik örneklerden her izole edilen *Aspergillus* patolojik değildir. Çünkü *Aspergillus* her zaman solunum örneklerinden, deri kazıntısı ve diğer örneklerden izole edilebilir. Bu nedenle, mikroorganizmanın direkt incelemede gösterilmesi ve kültürde defalarca üremesi önemlidir (16, 12,37).

Etken kabul edilme kriterleri şunlardır:

- *Direkt incelemede hifal elementlerin görülmesi
- *İzole edilen küfle direkt incelemenin uyumu
- *Birden fazla sayıda aynı mantar kolonisinin bulunması
- *Değişik örneklerden aynı küfün izolasyonu
- *İzole edilen küfün 37°C'de üreyebilmesi gereklidir.

Direkt incelemede; klinik örneklerde KOH, kalkoflor beyazı, dokuda Gomori-metanamin gümüş boyası gibi özel mantar boyası ile hif morfolojisi incelenir. Hiyalin, septalı, yaklaşık 4 mm genişlikte ve ikiye dallanmalar yapan (çatallı) hifler görülür. Kullanılabilen bazı boyalar, örneğin Blankophor, kalkoflor beyazı mantar hücresi duvarındaki glukan ve kitin gibi polisakkaritlere afinite gösterir. Tırnak, deri, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL), balgam ve biyopsi örneklerinin incelenmesinde bu boyalar kullanılır. Fungal elemanlar boyandıklarında parlak sarı floresans verirler. Histopatolojik incelemede ise özel mantar boyası olan Gomori metanamin silver (GMS) veya PAS kullanılmalıdır. Hematoksilen-eozin ile iyi boyanmazlar. Canlı hifler bazofilik, ölü ve masere doku içindeki hifler eozinofilik boyanırlar. *Aspergillus* hiflerinin görünüşü infeksiyon tiplerine göre değişebilir. Akut invazif infeksiyonlarda *Aspergillus* hifleri; hiyalin duvarlı, sık septalı (3-6µm boyutlarında), ana gövdeden 45°C açı yapan dallarla dokuya doğru büyürler. Hifler doku içine doğru birbirine paralel ya da radyal bir şekilde uzanırlar. Miçelyumlar infeksiyon kronikleştikçe atipik görünüm kazanarak septalarını kaybederler. Histolojik inceleme ile *Aspergillus* denen örneklerden mantar varlığının muylaka izole edilerek ya da immünojik incelemelerle doğrulanması gerekir. Poliklonal floresan antikolar kullanarak *Aspergillus* 'ları diğer hiyalin mantarlardan ayırmak mümkün olmuştur (1, 17, 38).

2.8.2. İmmünolojik tanı

İmmünolojik testler hızlı olup değişik klinik durumları aydınlatıcıdır. Kültürlerin negatif olduğu zamanlarda veya başka hastalıklar tarafından gizlendiğinde serolojik testler yararlıdır. Kanda, *Aspergillus* antikor ya da antijenlerinin araştırılması etkeni saptamak için çok önemlidir. Serolojik tanıda antikorların gösterilmesi; ABPA hastalarının %70 - 100'ünde, aspergillomalı hastaların ise %98-99'unda IgG presipitinleri gösterilmektedir. "Double immün difüzyon", "Counter immün elektroforez (CIE)", ELISA, İmmun blot testleri bu amaçla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle ELISA çok duyarlı ve özgül bir test olarak görülmüştür. Sağlıklı kişilerde *Aspergillus* 'a karşı gelişen IgG antikorları saptanması problem yaratmaktadır. Antijenlerin gösterilmesi; bağışık ödüllü hastalarda yaygın aspergilloz tanısı için, serum ve idrarda galaktomannan antijeni gösterilir. Bu antijen

A. fumigatus, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. ustus* ile enfekte hastalarda saptanmıştır. Galaktofuran tanı için araştırılan bir diğer antijendir. Bu amaçla %74 duyarlı, %90 özgül RİA, %95'in üzerinde duyarlı ve özgül olan ELİSA ve lateks aglütinasyon testleri kullanılmaktadır. Serolojik testlerin duyarlılıkları farklı olmakla birlikte kullanılabilir (30, 40, 46).

Tanıda RIA, IFAT testleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Sandviç ELISA yöntemi ile *A. fumigatus* galaktomannan antijeni invazif *Aspergillus*'lu hasta serumlarında 1 ng/ml'ye kadar saptanabilmektedir. Kan ve idrarda galaktomannan varlığı ve titre artışı haftada iki kez yapılan test ile belirlendiğinde değer taşımaktadır. *Aspergillus* GM Ag invazif aspergillozisli hastaların serumlarında saptanabilmektedir. Galaktomannan *Aspergillus* türlerinin üremeleri esnasında salgılanan hücre duvar polisakarididir (37, 39, 40, 41).

Galaktomannan antijeni kullanılarak ELISA, indirekt hemagglütinasyon, lateks aglütinasyon yöntemleri ile serumda antikor aranmaktadır. Serumda galaktomannan antijeninin "double-sandwich" ELISA yöntemiyle tayini (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad), son yıllarda invaziv aspergilloz (İA) tanısı için geliştirilen yeni bir serolojik testtir. Galaktomannan, *Aspergillus*'un bir ekzoantijeni olup, galaktomannan testinin, IA açısından yüksek riskli hastalarda, hastaneye yatışlardan itibaren haftada en az iki kez alınan serum örneklerine uygulanması, yani bir tarama testi olarak kullanılması önerilmektedir. Yöntem, 0.5 ng/ml miktarındaki galaktomannanı saptayabilecek duyarlılıktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda galaktomannan antijen testinin erken tanıya yardımcı olabileceği gösterilmiştir. FDA verilerine göre test, klinik belirtiler ortaya çıkmadan (olguların % 65.2'sinde), konvansiyonel akciğer grafisindeki bulgular gelişmeden (olguların % 71.5'inde) ve kültür sonuçları pozitif olmadan (olguların % 100'ünde) ortalama 5-8 gün önce pozitifleşmektedir. Yine FDA tarafından değerlendirilen veriler sonucunda, testin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 80.7 ve % 89.2 olarak saptanmıştır. Ancak, diğer çalışmalarda rapor edilen sonuçların özellikle duyarlılık yönünden önemli ölçüde farklılıklar gösterebildiği görülmektedir (duyarlılık: % 67-100; özgüllük: % 86-98.8). Testin duyarlılığı non-nötropenik olgularda nötropenik olgulara kıyasla daha düşük

bulunmuştur. Bunun nedeni muhtemelen nonnötropenik olgularda antijenin kandan temizlenebilmesi ve kan galaktomannan düzeylerinin düşük kalmasıdır. Ticari olarak mevcut olan galaktomannan kiti, serum için standardize edilmiş olmakla birlikte, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı ve idrar ile yapılan çalışmalarda mevcuttur. BAL örnekleri seruma kıyasla hem nötropenik hem de nonnötropenik olgularda daha duyarlı sonuçlar vermiş, ancak idrar örnekleri ile seruma kıyasla daha düşük özgüllük ve daha geç pozitifleşme saptanmıştır (42, 43, 44).

Galaktomannan antijen testinin tanıdaki değeri, en çok kemoterapi alan ya da hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda çalışılmıştır. Bunun dışında karaciğer ve akciğer nakli yapılan olgulara ilişkin veriler de mevcut olmakla birlikte daha sınırlıdır. Karaciğer nakli yapılan olgularda testin duyarlılığı % 55.6, özgüllüğü ise % 93.9-98.5 olarak saptanmıştır. Akciğer nakli yapılan olgularda ise testin duyarlılığı oldukça düşük (% 30), özgüllüğü ise yüksek oranlarda (% 95) bulunmuştur. Akciğer nakil olgularında, testin sistemik invaziv aspergillozlu bir olgu ile pulmoner invaziv aspergillozlu olguların % 29'unu saptayabildiği, ancak trakeobronşiti olan yani lokal invaziv aspergilloz gelişmiş olan olguları saptayamadığı gözlenmiştir. Galaktomannan testinin uygulandığı olgu sayısının artması ile birlikte, bu test ile ilgili en önemli sorunlardan birinin yalancı pozitiflik olduğu ortaya çıkmıştır. Yalancı pozitiflik, hematolojik maligniteli ya da hematopoetik kök hücre nakli yapılan olgularda % 5-14, karaciğer nakil olgularında % 13 ve akciğer nakil olgularında % 20 oranında saptanmıştır. Yalancı pozitiflik, diğer bazı mantarlarla (*Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *Paecilomyces variotii*) çapraz reaksiyon, besinlerde (süt, pirinç, proteinden zengin ürünler gibi) bulunan galaktomannan antijeninin, hasar görmüş barsak mukozasından translokasyon yoluyla kana geçmesi (yalancı pozitif antijenemi), prematüre bebeklerde *Bifidobacterium* türlerinin lipoteikoik asidi ile çapraz reaksiyonu ve hastanın amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, ürikaz, sitotoksik kemoterapötikler gibi ilaçlar kullanıyor olması sonucu gözlenebilmektedir. Piperasilin-tazobaktam alan olgularda, galaktomannan tayini için serumun alınma zamanının sonucu etkileyebileceği, serumun ilacın, vadi düzeyinde olduğu dönemde

veya ilaç dozu verilmeden önce alındığı durumda, ilaca bağlı yalancı pozitif sonucun daha az olası olduğu gözlenmiştir. Bugünkü veriler galaktomannan antijen testinin, diğer testlerle birlikte kullanıldığında ve özellikle ardışık ve birden fazla serum örneği pozitif olarak saptandığında IA tanısına yardımcı olabileceğini göstermektedir. Test sonuçları özellikle yalancı pozitiflik yönünden dikkatler değerlendirilmelidir (42, 43, 44, 45, 46).

2.8.3. Moleküler yöntemlerle tanı

İnvazif aspergilloz immünsüprese hastalarda yüksek mortalite sebebi olması nedeni ile hızlı tanısı çok önemlidir. DNA'nın moleküler tekniklerle araştırılması hızlı ve yüksek düzeyde duyarlıdır. Oligonükleotid primerleri ile *A. fumigatus*'un ribozomal genini amplifiye etmişlerdir. Bu primerler yüksek oranda duyarlı ve özgül olup 1 pg genomik molekülü saptayabilmektedir. PCR testi ile *A. fumigatus* özgül primerler kullanılarak uygun örneklerden sekiz saat içinde tanımlanmaktadır. Kültür ve PCR sonuçları % 93 uyumlu bulunmuştur. Moleküler teknikler sadece tanı için değil izolatların doğru identifiye edilmesi ve tiplendirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Mantarın genotipik değişkenliğinden doğan tiplendirme zorluklarının üstesinden gelebilmek için geliştirilmiştir. Ligaz zincir reaksiyonu (LCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) ile genetik finger printing yapılarak soy ilişkisinin genomik DNA yoluyla gösterildiği epidemiyolojik randomize amplified polymorphic DNA (RAPD) typing ve fingerprinting ile izolatların tiplendirildiği çalışmalar vardır. Tanıda kullanılmak üzere real time PCR'ı da içine alan çeşitli PCR teknikleri geliştirilmiştir. Çeşitli araştırmacılar kemik iliği transplantlı hastalardan aldıkları ardışık kan örneklerini prospektif olarak incelemişler ve tanıda faydalı olduğunu göstermişlerdir. Ancak PCR temelli yöntemler standardize olmadığı için henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır (42, 43, 44, 46, 48, 49).

2.8.4. Deri testleri ile tanı

ABPA düşünülen hastalarda aspergillus antijenleri ile yapılan deri testi duyarlılığında iki tip reaksiyon ölçülür: Tip I (erken) ve Tip II (Arthus reaksiyonu). Tip I reaksiyonu deride 15-20 dakika içinde beliren kızarıklık ve şişlikle karakterize iken Tip II reaksiyonunun gelişmesi için 4-8 saatlik bir süreye gereksinim vardır.

İmmünsüpresif hastalarda deri testlerinin genellikle negatif olduğu bildirilmiştir. Bu gibi durumlarda antijen saptanması önerilmektedir. Ayrıca konakçı bağışık cevabına bağlı olmaksızın, hastaların vücut sıvılarında D-mannitol ve oksalik asit gibi metabolitlerin gösterilmesi aspergilloz tanısında yeni bir yaklaşımdır (44, 48).

2.9. Tedavi

Amfoterisin B (genellikle 1mg/kg/gün) ve lipozomal şekilleri aspergilloma ile yaygın aspergillozda sık kullanılan antifungaldir. İtrakonazol paranazal sinüs aspergillozu, aspergilloma, ABPA ve osteomyelit olgularında kullanılmaktadır. Vorikonazol ve terbinafil yaygın aspergilloza etkili görülmektedir. Her iki ilaç da bir çok aspergillus türüne invitro olarak etkili bulunmuştur (50, 51).

Aspergillomada hastalığın yavaş ilerlemesinden dolayı hastaların prognozu iyidir. Tedavi; belirti, bulguların ağırlığı ve altta yatan kronik akciğer hastalığına göre belirlenir .İtrakonazol (200 mg/gün) yararlı olabilir. Ağız yolundan ilaç kullanmak sakıncalı ise; damar yolundan amfoterisin B (0.6-1 mg/kg/gün) verilebilir. Sık aralıklarla hemoptizi atakları veya ağır hemoptizi söz konusu ise cerrahi olarak kolonizasyonun bulunduğu akciğer lobu çıkarılır (50).

Klinik olarak invazif aspergilloz kuşkuyla hastalara hemen tedavi başlanmazsa mortalite % 70-90'dır. Tedavi edilenler ise %25-30'dur. Tedavide ilk seçilecek ilaç amfoterisin B'dir. İnvazif aspergilloz tedavisinde bazı ilkeler vardır. İmmünsüpresyonlu hastalar invazif aspergilloz yönünden her zaman korunmalıdır. Odalara toz tutucu filtreler takılmalı, odalarına bitki ve çiçek getirilmemeli ve besinler pişirilerek verilmelidir. Hastanın dışarı çıkması zorunlu ise; yıkım ve onarım bölgelerinden uzak kalmalarıdır. Bütün bunlara karşın hastanın yeterince izole edilmediği düşünülürse intranazal ve nebulize amfoterisin B kullanılmalıdır (51,52).

Toksik aspergillozda alveoler reaksiyon kısa sürer ve hiçbir belirti bırakmadan kendiliğinden düzelir.

ABPA tanısının konulmasından sonra hastalardaki bronkospazmı çözmek ve akciğerlerde oluşabilecek bronşektazi gibi kalıcı yapısal değişiklikleri önlemek için steroid başlanır. Ayrıca uzun süreli itrakonazol (400mg/gün) kullanılmasının total antijen titresini azalttığı gösterilmiştir (52, 53,54).

Sonuçta; özellikle immünsupresyonlu hastaların yaşamını tehdit eden *Aspergillus* infeksiyonlarının klinik şekilleri, belirti ve bulguları farklıdır. Klinik ve laboratuvar bulgularına göre ayırıcı tanıya gidilir ve tedavi ilkeleri saptanır.

İnvazif fungal infeksiyonların (İFİ) tanısı, tanısal alandaki gelişmelere karşın günümüzde halen tedavi sonucunu etkileyecek derecede erken konamadağından , antibakteriyel tedavilere karşın ateşi devam eden hastalarda ampirik antifungal tedavi standart uygulama olmaya devam etmektedir. *Aspergillus* türleri ile fungal infeksiyon için yüksek risk grubunda yer alan allojenik Hematolojik kök hücre transplant (HKHT) hastalarında ampirik antifungal tedavi, *Aspergillus* ve diğer küf mantarlarını kapsayacak etkinlikte bir antifungal ile yapılmalıdır.

Son yıllarda bu özelliklere sahip görünen yeni etkili antifungal ajanlar geliştirilmesine karşın, henüz yeterli çalışmalarda test edilmemeleri nedeniyle halen ampirik antifungal tedavide seçilecek antifungal ajan geni. etki spektrumu ile amfoterisin B'dir. Bir polyen makrolid antibiyotik olan amfoterisin B deoksikolat (amfo B-d) 40 yıldan uzun süredir İFİ'ların tedavisinde altın standart olarak kalmıştır. Çoğu fungusun hücre membranında yer alan ergosterole bağlanarak etkisini gösterir. Bu bağlanma membran bütünlüğünü bozarak depolarizasyona ve membran permeabilitesinde artışa yol açarak hücre ölümüne neden olur. Amfoterisin B-d'in önemli yan etkileri vardır. Ateş, üşüme-titrete, baş ağrısı, bulantı, kusma, anafilaksi gibi infüzyon ilişkili yan etkileri yanı sıra, doz artımını sınırlayan en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Amfoterisin B-d'in kullanımını sınırlayan yan etkileri nedeniyle amfoterisin B'nin üç lipid formülasyonu geliştirilmiştir. Lipozomal amfo B, amfo B-lipid kompleks ve amfo B koloidal dispersiyon. Her üç formülasyonun nefrotoksisitesi amfoterisin B-d'a göre anlamlı olarak daha azdır. Nötropenik hastalarda ampirik kullanımda klasik amfoterisin B ile lipid formülasyonlarının etkinlikleri eşdeğer görünür. Febril nötropenik hastalarda ampirik antifungal tedavide triazol grubundan itrakonazol ve vorikonazol ile ekinokandin sınıfından kaspofungin gelecekte amfoterisin B'ye alternatif seçenekler olabilir. Bu gruptan flukonazol *Aspergillus* türlerine etkin olmadığı ve sıklıkla profilakside kullanıldığı için HKHT alıcılarında ampirik tedavide uygun bir seçim değildir. *Aspergillus* türlerine karşın

aktivite gösteren itraconazol ve vorikonazolün intravenöz ve oral formülasyonları vardır. Febril nötropenik hastalarda lipozomal amfoterisin B kadar etkin olduğu gösterilen vorikonazolün en önemli yan etkisi hastaların % 30'unda gözlenen genellikle hafif ve geçici olan görme bozukluklarıdır. Yeni bir antifungal sınıfını oluşturan ekinokandinlerden kaspofungin fungal hücre duvarında yer alan 1,3- β -D-glukan sentazı inhibe ederek etkisini gösterir. *Aspergillus* türlerine karşı lipozomal amfoterisin B kadar etkili olduğu ve anlamlı olarak daha düşük bir yan etki profiline sahip olduğu gösterilmiştir. İnvazif *Aspergillus* infeksiyonlarının tedavisinde günümüzde birincil seçenek halen amfoterisin B'dir (49,55, 56, 57, 58).

2.10. Korunma ve Kontrol

Aspergilloz riski taşıyan kişilerin özellikle hastane ortamında korunmaları sağlanmalıdır. Bunun için;

- 1) Yüksek etkili partiküler filtreler (HEPA) ile havanın temizlenmesi
- 2) Hasta izolasyonunun sağlanması
- 3) Hasta odalarından bitkilerin kaldırılması, hastane inşaatları esnasında bariyerlerin kullanılması,
- 4) Bazı özel gıda maddelerinin (buğday, mısır, fındık vs) *Aspergillus* kontaminasyonu nedeniyle invaziv pulmoner aspergilloz riski olan hastalara önerilmemesi gerekir (59, 60) .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisi'nde yatan İA gelişimi yönünden yüksek risk taşıyan febril nötropenik 82 erişkin hastayı kapsamaktadır. Bu hastaların serum örneklerinde, sandviç ELISA (Platelia Aspergillus, Biorad, Fransa) ve lateks aglütinasyon (Pastorex Aspergillus, Biorad, Fransa) yöntemleri kullanılarak GM Ag varlığı incelemiştir.

3.1. Hastalar

Nisan 2002 – Ocak 2003 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisi'nde yatan beş gün süreli antibakteriyel tedaviye karşın yanıt alınamayarak, 123 febril nötropeni atağı geçiren, 82 febril nötropenik hasta çalışmaya alındı.

Hematolojik maligniteli hastaların 46'sı erkek (E), 36'sı kadın (K) olup, tanılarına göre kadın erkek sayıları Çizelge 3.1. de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. Hemotolojik maligniteli, hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı.

Tanı	Erkek	Kadın
Akut Myeloblastik Lösemi (AML)	32	19
Akut Lenfoblastik Lösemili (ALL)	9	11
Lenfoma	4	3
Multiple Myelom	1	2
Aplastik Anemi	-	1
Toplam	46	36

Oral 38.5 °C ateşin olması ve nötrofil sayısının $\leq 500 \text{ mm}^3$ olması durumunda hasta febril nötropenik kabul edildi.

Hastalar Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu / Ulusal Alerji Enstitüsü ve Enfeksiyon Hastalıkları Mikozlar Grubu (EORTC / MSG)'nin invaziv fungal enfeksiyonlar vaka tanım kriterlerine göre dört (4) kategoriye ayrıldı.

1. Kanıtlanmış invaziv aspergillozis enfeksiyonu bulunanlar (Proven)
2. Yüksek olasılıkla invaziv aspergilloz enfeksiyonu bulunanlar (Probable)

3. Düşük olasılıkla İFİ bulunanlar (Possible)
4. İnvaziv fungal infeksiyonu bulunmayanlar.

EORTC / MSG'nun mikrobiyolojik tanım kriterleri içinde yer alan ELISA yöntemi ile Aspergillus GM Ag saptanması çalışmamızda araştırdığımız yöntemlerden biri olduğu için tanı kriterlerinden çıkarılarak hastalar kategorize edilmiştir.

Bu tanıma göre febril nötropeni ataklarına göre vaka kategorisi Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. EORTC/MSG tanı kriterine göre ve febril nötropeni ataklarına göre vaka kategorisi

EORTC/MSG tanı kriterine göre vaka kategorisi	Febril nötropeni atağı sayısı
Kanıtlanmış invaziv aspergilosis (Proven)	1
Yüksek olasılıkla invaziv aspergilosis infeksiyonu bulunanlar (Probable)	2
Düşük olasılıkla invaziv aspergilosis infeksiyonu bulunanlar (Possible)	29
İnvaziv fungal infeksiyonu bulunmayanlar	91
Toplam atak sayısı	123

3.2. Örneklerin Sayı ve Özelliklerinin Belirlenmesi

Febril nötropenisi olan ve beş gün süreli antibakteriyel tedaviye yanıt alınamayan 82 hastanın 123 febril nötropeni atağında 367 serum örneği toplandı. Haftada bir veya iki kez her hastadan bir ile ondört arasında olacak şekilde hastaların ateşleri düşene dek serum örnekleri toplandı.

AML'li 51 hastanın 80 atağında toplam 238 serum örneği;

ALL'li 20 hastanın 29 atağında toplam 94 serum örneği;

Lenfomalı yedi hastanın sekiz atağında toplam 22 serum örneği;

Multiple myelomalı üç hastanın üç atağında altı serum örneği;

Aplastik anemili bir hastanın iki atağında yedi serum örneği; toplanarak -20°C'de saklandı.

3.3. Sandviç ELISA Aspergillus GM Ag Testinin Uygulanması

Seçilen hasta grubunda serum örneklerinden Aspergillus GM Ag sandviç ELISA (Platelia Aspergillus, Biorad, Fransa) yöntemiyle araştırıldı.

3.3.1. Kit İçeriği

- EBA – 2 antigalaktomannan monoklonal antikor ile kaplı mikrolak
- Konsantre inkübasyon tamponu
- Konsantre yıkama solusyonu
- Pozitif kontrol serumu
- Negatif kontrol serumu
- Konjugat (Anti-galaktomannan monoklonal antikor içerir.)
- Substrat (% 4 DMSO'lu sitrik asit ve sodyum asetat solüsyonu içerir.)
- Stop solüsyonu (1.5 N sülfirik asid içerir.)

3.3.2. Testin Yapılışı

1. Tüm reagenler ve örnekler oda ısısına getirildi.
2. 300 µl serum örneği 100 µl treatment solüsyon ile karıştırıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
3. 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Supernatan GM Ag saptanmasında kullanıldı.
5. 50 µl supernatan alınarak EBA – 2 anti galaktomannan monoklonal antikorla kaplı mikrolaklara konuldu.
6. Her testte bir pozitif kontrol (her ml'sinde 5 ng GM Ag içermektedir), iki kalibratör (her ml'sinde 1 ng GM Ag içermektedir) ve bir negatif kontrol (GM Ag içermemektedir) hasta serumları ile birlikte çalışıldı.
7. Üzerine 50 µl konjugat ilave edilerek 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
8. Inkübasyon sonunda mikrolaklar yıkanarak üzerlerine 100 µl substrat (o-fenilen diamin hidroklorid) eklenerek 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. 450/620 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

3.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Aspergillus GM Ag varlığına veya yokluğuna eşik değer (cut-off) standardı kalibratörlerin optik dansitelerinin toplamını ikiye bölünmesiyle elde edildi. Her bir serumun Index değeri örnek optik dansitesinin cut-off değerine bölünmesiyle elde edildi.

$$\text{Cut off değeri} = \frac{\text{kalibratör 1} + \text{kalibratör 2}}{2}$$

$$\text{Index değeri} = \frac{\text{Örnek optik dansitesi}}{\text{Cut off değeri}}$$

Buna göre;

Index değeri < 1 olan serum örnekleri negatif

≥ 1 Index değeri < 1.5 olan serum örnekleri gray zon

Index değeri ≥ 1.5 olan serum örnekleri pozitif olarak değerlendirildi.

Ardışık iki serum örneğinde GM Ag saptanması halinde gerçek pozitif olarak kabul edildi.

3.4. Latex Aglutinasyon Aspergillus GM Ag Saptama Yöntemi

Seçilen hasta grubunda serum örneklerinden Aspergillus GM Ag lateks aglutinasyon (Pastorex Aspergillus, Biorad, Fransa) yöntemiyle çalışılmıştır.

3.4.1. Kit İçeriği

1. Tek kullanımlık lateks kartları
2. Pozitif kontrol (75 ng/ml'de galaktomannan içerir.)
3. Negatif kontrol
4. Glisin buffer içinde galaktomannan'a karşı antikorla kaplı lateks partikülleri
5. Serum treatment reajeni
6. Karıştırıcı çubuk.

3.4.2. Testin yapılışı

1. Tüm reajanlar ve örnekler oda ısısına getirilmiştir.
2. Her çalışmada pozitif kontrol serum örnekleriyle birlikte çalışıldı.

3. 300 µl serum örneği 100 µl treatment solüsyon ile karıştırıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
4. 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Supernatan GM Ag saptanmasında kullanıldı.
6. 40 µl supernatan alınarak aspergillus latex solusyonu ile karıştırıldı.
7. Yaklaşık 200 rpm'de 1 dakika kadar çalkalandı.
8. Aglütinasyon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Aspergillus GM Ag varlığına veya yokluğuna karar vermek için pozitif kontrolle örnekler karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

EORTC / MSG'nun invaziv fungal infeksiyonlar vaka tanım kriterlerine göre dört (4) kategoriye ayrılan hasta gruplarından; kanıtlanmış İA'ı bulunan bir hastanın artriti vardı. Ponksiyonla infeksiyon bölgesinden alınan eklem sıvısının kültüründe *Aspergillus fumigatus* üredi. Bu hastanın tüm serum örneklerinde *Aspergillus* GM Ag negatif bulundu.

Yüksek olasılıklı İA kategorisine giren iki hastanın birinde bronkoalveolar lavaj örneğinin direkt kalkoflor beyazı boyası ile incelenmesinde hifler saptandı. Aynı örneğin kültüründe ise *Aspergillus fumigatus* üredi. Bu hastada ateşin yedinci gününden itibaren ELISA testi ile, 22. gününden itibaren lateks aglütinasyon testi ile serum örneklerinde GM Ag saptandı. Bu hastada ancak 24. günde High Resolution Computarise Tomografi (HRCT)'de nodüller saptandı.

Yüksek olasılıklı İA kategorisine giren diğer hastada bronkoalveolar lavaj örneğinin direkt kalkoflor beyazı boyası ile incelenmesinde hifler saptandı. Aynı örneğin kültüründe ise *Aspergillus fumigatus* üredi. Bu hastada ateşin sekizinci gününden itibaren hem ELISA hem de lateks aglütinasyon testi ile serum örneklerinde GM Ag saptandı. Bu hastada ancak 14. günde HRCT'de nodüller saptandı.

Her iki hastaya da amfotersin B başlanmış ve tedavi seyri sırasında GM düzeyleri düşmüştür.

Düşük olasılıklı İFİ kategorisine giren 29 ataktan iki farklı hastanın iki farklı atağında ard arda alınan serum örneklerinde GM Ag saptandı. Birinci hastada atağın birinde ateş odağı saptanmadı. HRCT'si normaldi. Ancak ateşin yedinci gününden itibaren hem ELISA hem lateks aglütinasyon yöntemleri ile GM Ag saptandı. İkinci hastanın febril nötropenik atağında akciğerde konsolidasyon ve nodül saptandıktan bir gün sonra hem ELISA hem lateks aglütinasyon yöntemleri ile GM Ag saptandı. Bu hastanın diğer serum örneklerinde her iki antijen saptama yöntemi ile GM Ag pozitif bulundu.

İFİ bulunmayanlar kategorisinde üç atakta hastalardan alınan ardışık iki serum örneğinde hem ELISA hem lateks aglütinasyon yöntemleri ile GM Ag saptandı. Aynı gruptaki farklı üç atak incelendiğinde bir atakta ardışık serum örneklerinin sadece birinde ELISA, diğer iki atakta ise ardışık serum örneklerinin birinde (her bir atakta sadece bir pozitiflik) lateks aglütinasyon yöntemi ile GM Ag saptandı.

Kesin tanının otopsi veya biyopsi örnekleri ile konabilmesi nedeniyle çalışmamızda sadece üç epizotta kesin veya yüksek olasılıklı tanı konabilmiştir. Duyarlılık ve özgüllük bu tanı konan vakalar ve İFİ'si bulunmayan hastalarda hesaplanmıştır.

Buna göre hem ELISA hem de lateks aglütinasyon testi için duyarlılık % 66.7 özgüllük % 96.7 olarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

İA gelişimi yönünden yüksek risk taşıyan hematolojik maligniteli febril nütropenik erişkin hastaların serum örneklerinde Aspergillus GM Ag varlığı Sandviç ELISA ve lateks aglütinasyon yöntemleri ile çalışılmıştır.

Son yıllarda İA tanısında önemli iki gelişme olmuştur.(61). Bunlardan biri HRCT ile akciğerin lezyonlarının değerlendirilmesidir. Diğer gelişme galaktomannan antijeninin serum örneklerinde saptanmasıdır.(61). GM antijeninin saptanmasında kullanılan iki farklı ticari kit bulunmaktadır. Bu kitlerden biri ELISA yöntemiyle diğeri ise lateks aglütinasyon yöntemiyle GM Ag'ni saptamaktadır. Bizim çalışmamızda da GM Ag'nini ELISA ve lateks aglütinasyon yöntemiyle saptayan bu iki ticari kit kullanılmıştır.

Birçok çalışmada GM Ag saptanmasının erken hastalık döneminde klinik ve radyolojik bulgular oluşmadan önce belirlenebilmesi testin önemini artırmaktadır. HRCT ile "halo" işareti gibi İA'in erken dönemlerinde görülen lezyon saptanabilir. Ancak bu bulgular İA için özgül olmadığı gibi diğer etkenlerle oluşan infeksiyonların seyrinde de görülebilir. Caillot ve arkadaşları febril nütropenik hastalarda İA tanısında HRCT'nin önemli olduğunu fakat bakteriyel mikoplazma, viral bronkopnömoni görüntüsü ile karışabileceğini ve tanıyı desteklemek için diğer testlerin de kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (62). Bizim çalışmamızda da yüksek olasılıklı İA kategorisine giren iki hastanın birinde bronkoalveolar lavaj örneğinin direkt inceleme ile hifler saptanıp, kültüründe Aspergillus fumigatus üremiştir. Bu hastada ateşin yedinci gününden itibaren ELISA testi ile, 22. gününden itibaren lateks aglütinasyon testi ile serum örneklerinde GM Ag pozitif bulunurken ancak 24. günde HRCT'de nodüller saptanmıştır. Yüksek olasılıklı İA kategorisine giren diğer hastada ateşin sekizinci gününden itibaren hem ELISA hem de lateks aglütinasyon testi ile serum örneklerinde GM Ag saptandı ancak 14. günde HRCT'de nodüller saptanabilmiştir (63, 64).

GM Ag ELISA testinin duyarlılığını Pinel ve ark. 807 İA'lu hastada yaptıkları çalışmada %50, Herbrecht ve ark. % 29.4, Marr ve ark. % 43, Maertens ve ark. 94, Sulahien ve ark. % 90.5 olarak saptamışlardır (65, 66, 67, 68, 69). Yapılan çalışmalarda testlerin duyarlılığı % 29 - % 100 olarak bildirilmekte olup değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda hem ELISA testi hem de lateks aglütinasyon testi için duyarlılığı % 66.7 olarak saptanmıştır. Bu testlerin duyarlılık sonuçlarının değişken olması infeksiyon bölgesine, infeksiyon etkeni olan *Aspergillus* türlerin, infeksiyon bölgesinin özelliklerine (besin maddeleri, pH, oksijen düzeyi vb), hastanın antifungal tedavi almasına, immünsüpresyon derecesine, laboratuvarın deneyimine, GM antikorlarının varlığına, örneklerin saklanması gibi faktörlere bağlanabilir (46).

Yeğenoğlu ve ark. İA kuşkusu ile farklı ünitelerden gönderilen immun sistem yetmezlikli 41 hastaya ait 71 kan örneğindeki GM Ag varlığını saptayarak, duyarlılığını % 90 , özgüllüğünü % 95 olarak bildirmişlerdir. Kwak E.J. ve arkadaşlarının İA şüpheli 154 karaciğer transplantlı hastada yaptıkları çalışmada özgüllüğü % 98.5, duyarlılığı % 87 olarak bulmuşlardır (70, 71). Paris'de Saint Louis Hastanesi Hematoloji Servisi'nde yatan 347 çocuk ile kemik iliği transplantasyonu yapılmış 450 hastada IA tanımı için GM belirlenmesinin özgüllüğü ve duyarlılığı araştırılmış; özgüllüğünün % 94, duyarlılığının % 90.6 olarak bildirmişlerdir (69). GM Ag ELISA testinin özgüllüğünü Pinel ve ark. yaptıkları çalışmada % 99.6, Herbrecht ve ark. % 94.8, Marr ve ark. % 99, Maertens ve ark. 98.8, Sulahien ve ark. % 95 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda da benzer olarak ELISA testi ile özgüllük oranı yüksek (% 96.7) saptanmıştır (65, 66, 67, 68, 69).

Galaktomannan testinin uygulandığı olgu sayısının artması ile birlikte bu test ile ilgili en önemli sorunlardan birinin yalancı pozitiflik olduğu ortaya çıkmıştır. Yalancı pozitiflik hematolojik malignensili yada hematopoetik kök hücre nakli yapılan olgularda % 5-14 , karaciğer nakil oldularında % 13 ve akciğer nakil olgularında % 20 oranında saptanmıştır. Yalancı pozitiflik diğer bazı mantarlarla (*Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *Paecilomyces Variotii*) çapraz reaksiyon, besinlerde (süt, pirinç, proteinden zengin ürünler gibi) bulunan galaktomannan antijeninin hasar görmüş barsak mukozasında translokasyon yoluyla kana geçmesi

(yalancı pozitif antijenemi), prematüre bebeklerde Bifidobacterium türlerinin lipoteikoik asidi ile çapraz reaksiyonu ve hastanın amoksisilin-klavulonik asit, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, ürikaz, sitotoksik kemoterapatikler gibi ilaçlar kullanıyor olması sonucu gözlenebilmektedir. Bugünkü veriler galaktomannan antijen testinin diğer testlerle birlikte kullanıldığında ve özellikle ardışık ve birden fazla serum örneği pozitif olarak saptandığında İA tanısına yardımcı olabileceğini göstermektedir. Test sonuçları yalancı pozitiflik açısından dikkatle değerlendirilmelidir (73). Uzun süreli nötropenisi olan veya transplantasyon yapılmış hastalarda İA tanımı için GM Ag aranmasının değerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada duyarlılık % 89.9, yalancı pozitiflik oranı % 14 olarak belirlenmiştir (71). Bizim çalışmamızda İA'si bulunmayan 91 ataktan üçünde (%3.2) ELISA ile ardışık örneklerde pozitiflik elde edilmiş olup, bu sonuçlar yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Paul ve ark. çalışmalarında İA riski olan 61 hastadan 532 serum örneğinde ELISA testinin lateks aglütinasyon testinden daha erken pozitifleştiğini göstermişlerdir (74). Bizim çalışmamızda yüksek olasılıklı İA kategorisine giren iki hastanın birinde ateşin yedinci gününden itibaren ELISA testi ile, 22. gününde itibaren lateks aglütinasyon testi ile serum örneklerinde GM Ag saptandı, diğerinde ELISA yöntemiyle lateks aglütinasyon yönteminden 15 gün önce antijen saptanabilmiştir. ELISA yönteminin analitik duyarlılığının 0.5- 1 ng, lateks aglütinasyon yönteminin 15 ng olması nedeniyle GM Ag ELISA yöntemi ile daha erken saptanabildiği düşünülebilir (47, 61).

Hematolojik maligniteli hastalarda aspergillozun PCR ve seroloji yöntemleri ile tanımının karşılaştırıldığı bir çalışmada PCR tekniklerinin çok daha duyarlı ve klinik bulgularla uyumlu olduğu bildirilmiştir. Hematolojik maligniteli hastalarda İA'un erken tanımı için metodların ve en iyi örnekleme yönteminin araştırıldığı bir başka çalışmada ise klinik, mikrobiyolojik ve histolojik veriler değerlendirilmiş, antijen belirlenmesi için lateks aglütinasyonu ve sandviç ELISA teknikleri ile PCR testleri kullanılmıştır. Sandviç ELISA'nın basit, etkili ve hızlı bir tarama testi olduğu, PCR tekniklerinin de erken tanıma olanak verdiği gözlemlenmiştir (43).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuçlar

1. Aspergillus GM Ag lateks aglütinasyon yöntemi testi için duyarlılık % 66.7 özgüllük % 96.7 olarak saptanmıştır
2. Aspergillus GM Ag sandviç ELISA yöntemiyle duyarlılık % 66.7 özgüllük % 96.7 olarak saptanmıştır .
3. Kesin tanı konmuş hasta sayısı az olmasına karşın çalışmamıza göre febril nötropenik hastalarda her iki antijen saptama yönteminin özgüllük ve duyarlılığı aynı bulunmuştur.
4. ELISA yöntemiyle Aspergillus GM Ag'i daha erken saptanabilmektedir.
5. İnvazif aspergillozda antifungal tedaviye erken dönemde başlanması yaşam kurtarıcı olduğundan febril nötropenik hastaların takibinde ELISA yönteminin kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Öneriler

1. Yurdumuzda İA infeksiyonlarının serolojik tanısına yönelik az sayıda çalışma olmasına rağmen yurt dışında yapılan çok sayıda çalışmada erken dönemde tanı koyabilme olasılığını artırdığından Aspergillus GM Ag ELISA yöntemine dikkat çekilmelidir.
2. Çalışmamız sonucunda hastanemizde febril nötropenik hastaların takibinde daha önceden lateks aglütinasyon yöntemi kullanılırken ELISA yöntemiyle daha erken GM Ag'ni saptandığından bu yöntem kullanıma girmiştir.

ÖZET

İnvazif aspergilloz hematolojik malignite nedeniyle tedavi gören, yüksek doz korikosteroid tedavisi alan ve transplant hastaları gibi immün yetmezlikli hastalarda sıklıkla fatal sonlanan fungal infeksiyondur.

Bu çalışma febril nötropenik hastalarda ELISA ve lateks aglütinasyon yöntemleri kullanılarak galaktomannanın seri ölçümünün tanısai değerini ölçen prospektif bir çalışmadır.

Nisan 2002 – Ocak 2003 tarihleri arasında İA yönünden yüksek risk altında olan 82 hastanın 123 febril nötropeni atağında serum GM Ag düzeyleri saptandı.

Özgüllük % 96.7 olarak bulundu. Kesin ve yüksek olasılıklı İA'si olan hastalarda sensitivite % 66.7 olarak saptandı. Duyarlılık ve özgüllük benzer bulunmuş olsa da kesin ve yüksek olasılıklı tanı konan üç hastanın birinde ELISA yöntemi ile daha erken pozitif sonuç elde edildi.

Sonuç olarak, kesin ve yüksek olasılıklı tanı konmuş sadece üç hastanın olması testlerin duyarlılığını doğru hesaplamızı engellemiştir. Bu testleri değerlendirebilmek için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: İnvazif Aspergilloz, galaktomannan antijeni, febril nötropeni

Kaynaklar:

1. Dennis MD, Fromppling RA. Morphology, taxonomy, and classification of the fungi. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM, 1995: 699-709
2. Richardson MD. *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. v.4 Ajello L, Hay RJ (v. Eds). Medical Mycology. 9th edition. London: 2000; 281-314.
3. Yücel A. Tıp bakımından önemli *Candida* türlerinin mikolojisi. Türk Mikrobiyol.Cem.Derg. 1987; 17(1-2):45-59.
4. Ainsworth GC, Sparrow FK. The Fungi. An Advanced Treatise. Academic Press. NewYork. 1973.
5. Arda M. Mikoloji . A.Ü.Vet.Fak.Y.366. Ankara, A.Ü. Basımevi; 1980: 11-14.
6. Ascioğlu S, Rex JH, 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, Walsh TJ. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Concensus. Clin Infect Dis 2002; 34: 7-14.
7. İnci R. Aspergilloz. Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi; 1999: 1093
8. G. S. de Hoog, J. Guarno. Atlas of Clinical Fungi CB, Netherlands.
9. Samson RA, Pitt JI, eds. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. New York: Plenum Press,1990.
10. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to Food-borne Fungi. 4th ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
11. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 2: 310-350.

12. Interdisciplinary forum on aspergillosis (Göttingen, Germany). Mycology Newsletter 2000; 1: 9-16.
13. Hosphental DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invazive aspergillosis: lack of correlation. Med Mycol 1998; 36: 165-168.
14. Leenders ACAP, van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk AD, Verbrugh HA. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. J Clin Microbiol 1999; 37: 1752-1757.
15. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, et all. Trends in the postmortem epidemiolgy of invasive fungal infections at a university hospital. J Infect. 1996;33:23-32
16. Raper KB, Fennell DI. *Aspergillus*. Baltimore, The Williams and Wilkins Company, 1965.
17. Klich MA, Pitt JI. A laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.
18. Bossche HV, Mackenzie DWR, CuWenbergh G, eds. *Aspergillus ve Aspergillosis* New York: Plenum Press, 1988.
19. Burik JH, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. J Clin Microbiol 1998; 36 : 3115-3121
20. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 781-803.
21. İnci R, Tümbay E. Akciğerin mantar infeksiyonları. Topçcu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, ed. İnfeksiyon Hastalıkları'nda. İstanbul: Nobel tıp Kitapevleri, 1996: 459-64
22. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*'ları n patojenlik belirtgenleri. Cerr Tıp Derg 2000; 31: 172-186 .
23. Rinaldi MG. Invaive aspergillosis. Rev Infect Dis 1983; 5: 1061-77
24. Shah A, Panjabi C. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review of a disease with a worldwide distribution. J Asthma 2002; 39: 273-289.
25. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Medical Mycology. Philadelphia

26. Bennett JE. *Aspergillus*. In: Fauci AS et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. New York:Mc Graw-Hill Co; 1998: 1156-8
27. Annaix V, Bouchara JP, Larcher G, Chabasse D, Tronchin G. Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 1992; 60: 1747-1755.
28. Tronchin G, Esnault K, Reiner G, Filmon R, Chabasse D, Bouchara JP. Expression and identification of lamininbinding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 1997; 65: 9-15.
29. Rippon JW. *Medical mycology*. Third edition. Philadelphia, WB Saunders Company, 1988.
30. Chris Tomee JF, Wierengha ATJ, Hiemstra PS, Kaufman HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 1997; 176: 300-303.
31. Denning DW. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; (Supl 2): 25-31
32. Tüter Y, Kuştimur S. Immün sistemin baskılanması ile patojenite kazanan saprofit küf mantarları. *OMÜ Tıp Dergisi* 1992; 3-4: 185.
33. Birinci Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi; 4-6 Mayıs 1999 İzmir
34. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*.1996;100:171-178
35. Sigler L, Verveij PE: *Aspergillus*, *Fusarium*, and Other Opportunistic Moniliaceous Fungi. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC (eds) eighth ed. ASM Press, Washington, 2003; 1726-60.
36. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases* 5th Edition. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000
37. Kaufman L, Standart PG, Jalbert M, Kraft DE. Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2206-9

38. Stevens DA, Kan VL, Judson MA et al. Practice guidelines for diseases caused by aspergillus. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 696-709.
39. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, et al. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive aspergillus infection in neutropenic patients. *J Clin Pathol* 1998; 51: 652 – 656.
40. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington CW Jr (Eds). *Diagnostic Microbiology*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott, 1997; 983-1057.
41. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 6: 1604-1610.
42. Klont RR, Meis JFMG, Verveij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; (Suppl 2): 32-37.
43. Manuel RJ, Ainscough S, Prentice HG, Berger LA, Yeghen T, Potter MN, Kibber C. The diagnosis of invasive aspergillosis: is early early enough? Abstracts of 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases (1-4 April, 2001, Istanbul, Turkey). *Clin Microbiol Infect* 2001; (Suppl 1): 33.
44. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Clin Infect Dis* 2001;97:1604-10.
45. Patterson TF, Miniter P, Patterson JE et al. Aspergillus antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 1995; 171:1553-8.
46. Menning-Kersten MASH, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJM, Verveij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004;363:325-27.
47. Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Comparison between PCR and Detection of Antigen in Sera for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:218-20.

48. Kami M, Ogawa S, Kanda I, Tanaka I, Machida U, Matsumura T, Sakamaki H, Hirai H. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol* 1999; 2: 536-537.
49. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S: Real-Time PCR Coupled with Automated DNA extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002;40 (6):2224-27.
50. Menning-Kersten MASH, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:349-57.
51. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 2):8-24.
52. Walsh JT, Goodman JL, Pappas P et al. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3487-96.
53. Jeffery GM, Beard MEJ, Ikram RB et al. Intranasal amphotericin B reduces the frequency of invasive aspergillosis in neutropenic patients. *Am J Med* 1991; 90:685-92.
54. Stevens DA, Lee JY, Schwartz D, et al. Randomised double blind study of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Abstract L-32. Presented at the Thirty-seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Toronto, September 28-October 1, 1997
55. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1996.
56. Conneally E, Cafferkey MT, Daly PA et al. Nebulized amphotericin B as prophylaxis against invasive aspergillosis in granulocytopenic patients. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5:403-6.

57. McGinnis MR, Rinaldi MG. Antifungal drugs: mechanism of action, drug resistance, susceptibility testing, and assay of activity in biologic fluids. In: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996; 176-311.
58. Çağırğan S, Türk Hematoloji Derneği Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Kursu, 1999: 1151-162
59. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 1407-12
60. VandenBergh M, Verweij P, Voss A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 221-227.
61. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen, Boogaerts M. Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic StemCell Transplant Recipients. J Infect Dis 2002; 186: 1297-306.
62. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, et al. Improvement management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic using early thoracic computed tomographic scan and surgery. J Clin Oncol 1997; 15: 139-47
63. Sayiner A. İnvaziv pulmoner aspergillosis: klinik ve radyolojik tanı. 5. Febril Nötropeni Simpozyumu Program ve Özet Kitabı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003; 95-7.
64. Alexander BD: Diagnosis of fungal infection: new Technologies for the mycology laboratory. Transpl Infect Dis 2002; 4(Suppl.3):32-37
65. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Detection of Circulating Aspergillus fumigatus Galactomannan: Value and Limits of the Platelia Test for Diagnosing Invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 2184-86.

66. Dördüncü Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 3 – 6 Mayıs 2005, Konya
67. Marr KA, Gugel A, Balajee A, Laverdiere M, McLaughlin L, Bentsen C, Leisenring W. A multi-centre evaluation of Bio-Rad aspergillus GM EIA: Data supporting FDA approval of the test using a low cut-off to define positivity. *Blood* 2003; 102: 970a.
68. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galaktomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients :a prospective validation. *Blood*. 2001 Mar 15; 97(6):1604-10
69. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Deraouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4 year prospective study. *Cancer*. 2001 Jan. 15; 91(2):311-8
70. Yeğenoğlu Y, Susever S, Uzun M ve ark. İmmün sistem yetmezliği olan İA kuşkulu hastalarda Platelia® Aspergillus Sandviç ELISA ile galaktomannan antijeni araştırılması. Dördüncü Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 3 – 6 Mayıs 2005, Konya
71. Kwak EJ, Husain S, Obman A et al. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive Aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 435-38.
72. Singh N, Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 44-69.
73. Verweij PE, Stynen D et al. Sandwich enzyme-linked immunabsorbent assay compared with Pastorex latexagglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immuncompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1912-14

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ