



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

**HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARIN
İNVAZİV ASPERGİLLOZİS VARLIĞI AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİNDE POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU YÖNTEMİNİN TANI DEĞERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. C. Aylin ERMAN DALOĞLU

Antalya, 2016



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

HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARIN İNVAZİV ASPERGİLLOZİS VARLIĞI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİNDE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİNİN TANI DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. C. Aylin ERMAN DALOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Dilara ÖĞÜNÇ

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.04.0103.001 numaralı proje no ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve sonsuz desteğini esirgemeyen değerli hocam öğretim üyesi Prof. Dr. M.Dilara ÖĞÜNÇ'e,

Eğitimim süresince birçok konuda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, gerek yurt içinde gerek yurt dışında mesleki deneyimler edinmemi sağlayan, her konuda yol gösteren başta Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Dilek ÇOLAK'a, Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN'e, Prof. Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a, Doç. Dr. Derya MUTLU'ya, Doç.Dr. Betil ÖZHAK BAYSAN'a, Prof. Dr. Mete EYİGÖR'e, Uzm. Dr. Esvet MUTLU'ya ve Uzm. Dr. İmran SAĞLIK'a,

Yıllar boyu anabilim dalı olarak birlik ve beraberliğimizi sağlayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kurucumuz saygıdeğer Prof. Dr. Gönül MUTLU, sayın Prof. Dr. S. Tümer VURAL'a ve anabilim dalı sekreterimiz Ayşe AYDIN'a,

Tezimde istatistik bilgilerinin oluşturulmasında katkıları olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Levent DÖNMEZ ve Biyoistatistik uzmanı Başak OĞUZ'a,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte keyifle çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, tüm çalışmalarım süresince çalışma ortamım içerisinde sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın bütün çalışan ve personeline,

Bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan, yaşamım boyunca bana verdikleri her türlü destek ve duydukları güven ile her zaman yanımda olan annem, babam, ablam, abim ve tüm aileme,

Her türlü zorluğu kolayca aşmamı sağlayan, her daim beni mutlu eden biricik eşim ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kısaltmalar Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Şekiller Dizini	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	5
2.2. Sınıflandırma	10
2.3. <i>Aspergillus</i> Türleri ve Fizyopatogenez	10
2.4. Klinik	13
2.5. Klinik Tanı	22
2.5.1. Fungal infeksiyonlarda EORTC tanımları	22
2.5.2. Radyolojik tanı	24
2.5.3. Ayırıcı tanı	25
2.6. Laboratuvar Tanısı	25
2.6.1. Konvansiyonel yöntemler (Direk mikroskopi, kültür, histopatoloji)	25
2.6.2. Serolojik yöntemler	29
2.6.3. Moleküler yöntemler	32
2.6.4. Mantar metabolitlerinin gösterilmesi	32
2.6.5. Yeni geliştirilen kitler	32
2.7. Tedavi ve Önlem	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Etik Kurul Onayı	41
3.2. Hastalar ve Örnekler	41
3.3. Galaktomannan Antijen Arama	42
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
3.4.1. Ticari Kit ile DNA İzolasyonu	44
3.4.2. Artus Qiagen <i>Aspergillus</i> diff RG PZR testi	45
3.4.3. MycAssay (Myconostica) <i>Aspergillus</i> real-time PZR testi	47
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	50

4. BULGULAR	51
4.1. Epizodlardaki Görüntüleme Yöntemleri ve Histopatoloji Bulguları	52
4.2. Epizodlardaki Klinik Kültür Üremeleri	53
4.3. Epizodlardaki Antibakteriyel ve Antifungal Kullanımı	53
4.4. Galaktomannan Antijen Testi Bulguları	54
4.5. Artus Qiagen <i>Aspergillus</i> Real-time PZR Sonuçları	57
4.6. MycAssay Myconostica Real-time PZR Testi Bulguları	57
4.7. GM Antijen Testi, Real-time PZR Testlerinin Karşılaştırılması	59
4.7.1. GM antijen testi ve Artus Qiagen PZR testi karşılaştırılması	59
4.7.2. GM antijen testi ve MycAssay Myconostica PZR testi karşılaştırılması	60
4.7.3. Artus Qiagen PZR ve MycAssay Myconostica PZR testlerinin karşılaştırılması	60
4.8. Hasta Özelliklerinin Epizod düzeyinde Yöntemler Üzerine Etkisi	63
4.8.1. GM Antijen Testi	63
4.8.2. Artus Qiagen PZR Testi	65
4.8.3. MycAssay <i>Aspergillus</i> PZR Testi	66
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ	83
7. ÖZET	84
8. ABSTRACT	86
9. KAYNAKLAR	88
10. EKLER	102
Ek 1. Hasta İzlem Formu	102

KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Akkiz İmmün Yetmezlik Sendromu
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
BAL	Bronko Alveolar Lavaj
BDG	Beta-D-Glukan
EAPCRI	European <i>Aspergillus</i> PCR Initiative
EIA	Enzym Immunoassay
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
EORTC/MSG	European Organisation for Research on Treatment of Cancer/Mycoses Study Group
FDA	Food and Drug Administration
GM	Galaktomannan
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
HKHT	Hematolojik Kök Hücre Transplantasyonu
İA	İnvaziv Aspergilloz
İFİ	İnvaziv Fungal Enfeksiyon
İK	İnvaziv Kandidiazis
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MM	Multiple Myelom
NPD	Negatif Prediktif Değer
PPD	Pozitif Prediktif Değer
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	Radio Immun Assay
SOT	Solid Organ Transplantasyonu
TZP	Piperasilin/Tazobaktam
YRBT	Yüksek Rezolüsyonlu Bilgisayar Tomografisi

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Aspergillus</i> virölans faktörleri	12
2.2. <i>Aspergillus</i> enfeksiyonlarının sınıflandırması	14
3.1. Artus Qiagen <i>Aspergillus</i> real-time PZR sonuçlarının yorumlanması	47
3.2. MycAssay <i>Aspergillus</i> real-time PZR sonuçlarının yorumlanması	49
4.1. Hasta düzeyinde demografik özellikler	52
4.2. Görüntüleme yöntemi ve histopatoloji bulguları	53
4.3. Hastaların klinik kültür örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar	53
4.4. Olası (probable) İA epizodlarının galaktomannan indeks düzeyleri ve diğer özellikleri	55
4.5. Tek GM testi pozitifliği ile referans tanının karşılaştırılması	56
4.6. Ardışık GM testi pozitifliği ile referans tanının karşılaştırılması	56
4.7. EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde Tek ve ardışık GM, Artus Qiagen PZR ve MycAssay PZR duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, doğruluk, pozitif ve negatif olabilirlik oranları	58
4.8. Bütün İA epizodları değerlendirildiğinde Tek ve ardışık GM, Artus Qiagen PZR ve MycAssay PZR duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, doğruluk, pozitif ve negatif olabilirlik oranları	58
4.9. İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve Qiagen PZR testlerinin sonuçları	59
4.10. İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve MycAssay PZR testlerinin sonuçları	60
4.11. EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde GM antijen testi, real-time testlerinin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları, pozitif ve negatif olabilirlik oranları	61
4.12. Kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki GM ve PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde testlerin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları, pozitif ve negatif olabilirlik oranları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sık görülen <i>Aspergillus</i> türlerinin kültür üremeleri ve laktofenol ile boyanma özellikleri	28
4.2. Real-time PCR görüntüsü	63



1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnvaziv fungal infeksiyonlar (İFİ) özellikle immünyetmezlikli hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan, giderek önemi artan bir klinik tablodur. Son yıllarda transplantasyon, kemoterapi, Akkiz İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS), kortikosteroid veya immünsüpresif ajanların kullanıldığı değişik risk faktörlerine sahip hasta sayısındaki artış beraberinde İFİ insidansındaki artışı getirmiştir. Transplant hastalarında ve hematolojik maligniteli hastalarda kullanılan yeni agresif tedaviler daha uzun süreli ve derin immünsüpresyona yol açmaktadır. Buna ek olarak tıbbi bakımdaki gelişmeler bu hastaların yaşam sürelerini uzatmış sonuçta İFİ’ a savunmasız bir hasta grubu oluşmasına yol açmıştır (1-3).

İFİ insidansı ve oluşan klinik tablonun ciddiyeti hastanın altta yatan hastalığı, immünsüpresyonun derecesi, coğrafik bölge ve etken patojen gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Farklı patojenler İFİ oluşturabilmektedir. Geçmişte *Candida* türleri en sık İFİ etkeni iken son yıllarda değişen epidemiyoloji sonucunda *Aspergillus* türleri en sık İFİ etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Azol grubu antifungal ilaçların profilakside kullanımından önce *Candida* türleri ile oluşan invaziv fungal infeksiyonlar özellikle hematolojik maligniteli ve hematopoetik kök hücre transplantasyon (HKHT) hastaları başta olmak üzere kanser hastalarında sık görülen infeksiyonlardı (1, 2). Son yıllarda invaziv kandidiazis (İK) insidansı invaziv prosedürler, intravenöz kateterler, intravenöz hiperalimantasyon gibi kandidemi için risk oluşturan uygulamaların yaygın kullanımı ile yoğun bakım ve cerrahi ünitelerinde ciddi bir artış göstermiştir. Kandidemi için risk oluşturan bu prosedürler hematolojik maligniteli ve hematopoetik kök hücre transplantasyon (HKHT) hastalarında da sık kullanılmaktadır, ancak bu hasta grubunda İK’in epidemiyolojik etkisi azalmış ve invaziv aspergillozis (İA) insidansı *Candida* infeksiyonlarının insidansını geçmiştir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda gösterildiği gibi bunun nedeni öncelikle azol profilaksisinin uygulanması gibi fungal infeksiyonları önlemek için uygulanan stratejilere bağlıdır. Ancak yeni antifungal ajanların tedavide kullanıma

girmiş olmasına rağmen İK hematolojik maligniteli hasta grubunda yüksek mortalite oranı ile ilişkili olmaya devam etmektedir (4, 5).

Pagano ve arkadaşlarının 4 yıllık bir dönemi inceledikleri çalışmalarında İFİ'nin %64'ünde küf mantarlarının etken olduğu bunlarında %90'ından *Aspergillus* türlerinin sorumlu olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacıların ardışık olarak yaptıkları çok merkezli çalışmalarda aspergillozise ait mortalite hızı 1987-1998 yılları arasında %48, 1999-2003 yılları arasında %38.5, 2004-2007 yılları arasında ise %27 olarak saptanmıştır. 2004-2007 yılları arasında yapılan çalışmada flukonazol ve itrakonazol ile profilaksi yapılmasına rağmen hastaların 2/3'ünde İA gelişmesi dikkat çekicidir (6, 7).

Tedavideki gecikme mortalitenin artmasına yol açacağından İFİ'nin erken ve doğru tanısı önem taşımaktadır. Ancak hematolojik maligniteli hasta grubunda İFİ tanısını koymak zordur. Klinik semptomlarla İFİ'ı bakteriyel ve viral infeksiyonlardan ayırmak güçtür. EORTC (Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu) / MSG (ABD Mikozi Çalışma Grubu) tanıda kesinliğe göre İFİ'ı proven, probable ve possible olarak sınıflandırmıştır. Bu kriterlere göre proven İFİ tanısı; steril prosedürlerle alınmış doku örneklerinin kültürü, sitopatolojik, histopatolojik veya direkt mikroskopik incelenmesi ile konur. Ancak hematolojik maligniteli hasta grubunda trombositopeni nedeniyle kanama riskinin olması doku örneklerinin alınmasını güçleştirmektedir. Ayrıca kültür yönteminin duyarlılık, özgüllüğü düşüktür ve geç sonuç elde edilir (8, 9).

Kan kültürleri ile dissemine kandidiazis vakalarının %50-60'ı tanımlanabilirken bu oran aspergilloziste çok düşüktür. Bu nedenle negatif kan kültürü ile İFİ ekarte edilememektedir. Kültür ile tanının güç olması nedeniyle fungal infeksiyonların tanısı için 'surrogate marker' adı verilen ve doğrudan infeksiyon etkenini göstermese de, bunun varlığına işaret eden veriler kullanılır. Bunlar arasında en sık kullanılanları radyolojik görüntüleme yöntemleri ve serolojik testlerdir. Radyolojik görüntüleme yöntemleri arasında en sık kullanılan yüksek rezolüsyonlu akciğer tomografisidir. Burada halo işareti ile birlikte veya tek başına iyi sınırlı lezyon varlığı, hava-hilal belirtisi ve kavitasyon varlığı probable (olası) ve possible (şüpheli) İFİ tanısını destekleyen klinik faktör kriterleri içinde yerini almıştır. Ancak bunların patognomonik olmadığı ve halo

bulgusunun mantar infeksiyonlarının yanında bakteriyel infeksiyonlar ve solid tümörlerde de görülebileceği bilinmektedir (1, 8, 9).

Serolojik yöntemlerden Galaktomannan (GM) antijeni ve Beta-D-glukan (BDG) varlığının araştırılması İFİ tanısında en önemli gelişmelerdendir. GM antijeninin plazma, serum, BAL veya BOS örneklerinde saptanması EORTC/MSG kriterleriyle probable İFİ'nin tanımlanmasında mikolojik kriterler arasında yerini almıştır. 1995-2005 yılları arasında yapılan 27 çalışmayı içeren bir metaanalizde GM antijenemi testinin duyarlılığı %70 özgüllüğü %92 olarak saptanmıştır. Başta antifungal kullanımı olmak üzere infeksiyon bölgesi, altta yatan hastalık, immünsüpresyon düzeyi gibi çeşitli faktörler GM antijenemi testinin performansını etkilemektedir. Testin değerlendirilmesinde bu faktörlerin göz önünde tutulması gereklidir (1, 8, 9). GM'dan farklı olarak BDG mukormikozis etkenleri ve Cryptococcus türleri dışındaki birçok mantar türlerinde bulunmaktadır. Testin İFİ'ı saptamadaki duyarlılığı (%77) özgüllüğünden (%85) daha düşüktür. Birçok tıbbi ürünün glukan içermesi yalancı pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Ayrıca testin uygulanışı zor ve pahalı bir testtir. GM antijenemi testi ile karşılaştırıldığında BDG ile klinik deneyim sınırlıdır, bu nedenle EORTC/MSG probable İFİ tanı kriterleri arasında yer almasına rağmen daha az kullanılmaktadır (1).

Moleküler yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek oluşu bu testleri İFİ'nin erken tanısında cazip bir alternatif yöntem olmasını sağlamıştır. Moleküler tekniklerde fungal DNA kantite edilebilir ve bu tedavi etkinliğinin takibi açısından yararlı olabilir. Ticari polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) methodları standardize yöntemleri, kalite kontrolü gibi bütün gelişmiş yönleri bakımından, tanısal kılavuzlara dahil edilmeye bir adım daha yaklaşmaktadır. Fungal komponentlerin kantitasyonunun yapıldığı PZR bazlı prosedürler özellikle serum örneklerinin değerlendirilmesinde birçok çalışmada yer almakta ve güvenilirliği ile ilgili gelişmeler devam etmektedir. Yapılan araştırmalarda galaktomannan antijen testinde olduğu gibi haftada iki kez veya daha fazla alınan serum örnekleri ile düzenli test edildiğinde klinik infeksiyon başlamadan ortalama 9 gün önce PZR testinin pozitifleşmeye başladığı gösterilmiştir. Geliştirilmekte olan PZR methodlarının standardizasyonu ile diğer tanısal testlerle kombine edilerek günlük

klirik kullanıma adapte edilip tanısıl sürece eklenebileceği düşünölmektedir (10-12).

Bu çalışmada hematolojik maligniteli hastaların İnvaziv Aspergillozis varlığı açısından değerlendirilmesinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin tanı değerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

İnfeksiyon hastalıklarının genelinde olduğu gibi mantar hastalıklarının da epidemiyolojisini doğada nerelerde bulundukları, bulaş yolları ve en sık görülen mantar tür ve alt türleri belirler. İFİ'ların değişen epidemiyolojisi ile önem kazanan mantar cinslerinin başında *Aspergillus* türleri gelmektedir. Avrupa'daki bazı merkezlerden, özellikle 1990'lı yılların sonlarından itibaren *Aspergillus* türlerinin etken olarak *Candida* türlerinden daha sık görülmeye başlandığına dair bazı veriler de bildirilmiştir (7).

İFİ, son 20 yıl içerisinde ağır immün süpresyona maruz kalan hasta sayısının artması nedeniyle özellikle de hematopoetik kök hücre transplantasyon (HKHT) olgularında ve hematolojik malignansi nedeniyle tedavi gören hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedeni haline gelmiştir. HKHT ve solid organ transplantasyonu (SOT) hastalarında daha etkili, daha az toksik ilaçlar geliştirilmesi ve hatta antifungal profilaksi uygulanmasına rağmen özellikle invazif küf infeksiyonları önlenememektedir. Mevcut durum devam etmekte iken, bu infeksiyonlarda etken olan mantarların epidemiyolojisinde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişimden sorumlu olan en önemli faktörler; tedavi, profilaksi, konak faktörleri ve donör tiplerindeki değişikliklerdir. Doğada bulunan her mantarın uygun konak koşullarında infeksiyona neden olabileceği hatırlanırsa, etken spektrumunun teorik olarak ne kadar geniş olduğu tahmin edilebilir. İFİ epidemiyolojisine ait değişimlerle ilgili en önemli sonuçlar, bildirilen potansiyel dirençli etkenlerdeki ve İFİ oranlarındaki artıştır. Bu açıdan, her merkezde lokal epidemiyolojinin izlenmesi, tedavi planında lokal epidemiyoloji verilerinin göz önüne alınması ve mümkün olduğunca hedefe yönelik antifungal yaklaşımların uygulanması gereklidir. İFİ'ların epidemiyolojisini araştıran ve bildiren birçok çalışma, Avrupa ülkeleri ve Kuzey Amerika başta olmak üzere çeşitli bölgelerdeki merkezlerden yayınlanmıştır. Son yıllarda bu konuyu araştıran çok merkezli surveyans çalışmalarının sonuçlarının da bildirilmiş olması, konu ile ilgili bilgileri arttırmıştır (13).

İFİ, immün sistemi sağlam olan konakta nadiren oluşmaktadır. Genel olarak İFİ gelişiminde rol oynayan başlıca risk faktörleri arasında immün sistemi baskılanmış konakta nötropeni, kansere bağlı B ve T hücre bozuklukları, hematolojik malignansiler, immünsupresif tedaviler, HKHT ve SOT (akciğer, kalp-akciğer, karaciğer) hastalarında doku rejeksiyonunu engellemek ve Graft versus Host hastalığı (GVHD)'nı baskılamak için uygulanan steroid gibi tedaviler, antibiyotik kullanımı, mukozit, radyoterapi, malnütrisyon, total parenteral nütrisyon, hemodializ, kateter uygulamaları, gastrointestinal perforasyon, cerrahi, yanıklar ve yoğun bakım ünitelerindeki hospitalizasyon sayılabilir (14).

İFİ gelişmesini kolaylaştıran risk faktörleri etkene göre de değişiklik gösterebilmektedir. İA için genel risk faktörleri; hematolojik malignansi (Akut lösemiler), HKHT, SOT (özellikle akciğer nakli) hastaları, derin ve uzamış nötropeni, AIDS, Sistemik lupus eritematozis gibi otoimmün hastalıklar, yüksek doz sitozin arabinozid tedavisi gibi immünsupresif ilaçlara bağlı hücreyel immünyetede bozulma, pulmoner hastalıklar, nötrofil fonksiyon bozukluğu, kronik granüloamatöz hastalık ve diğer kalıtsal immün yetmezlikler, yüksek doz ve uzamış kortikosteroid kullanımı, multiple myeloma (steroid kullanan), prematüre yenidoğan, yanık, diyabet, karaciğer yetmezliği, kronik alkol kullanımı ve malnutrisyon gibi diğer immünsupresif durumlardır (15, 16). İA'nın en sık akut myeloid lösemi (AML) ve akciğer transplant hastalarında ortaya çıktığı çok merkezli, prospektif bir çalışmada gösterilmiştir (17).

İK için risk faktörleri; total parenteral beslenme, santral venöz kateter varlığı, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, gastrointestinal sistem perforasyonu, cerrahi, *Candida* kolonizasyonu varlığı ve yoğun bakım hastaları sayılmaktadır. Çoğu yoğun bakım hastasında total parenteral beslenme, santral venöz kateter, cerrahi ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi risk faktörleri mevcuttur (18, 19). Sitotoksik kemoterapiye bağlı mukozal bariyerlerde hasar oluşması, mukozit ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı mikrobiyal florada bozulma da risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (20, 21).

EORTC/MSG tarafından 2008 yılında yapılan güncelleme sonucunda İFİ için konak faktörleri genişletilmiş ve 0,3 mg/kg/gün 3 hafta süreyle prednizolon kullanımı konak faktörü olarak kabul edilmiştir. İFİ için kabul edilen konak

faktörleri: nötropeni (0.5×10^9 nötrofil/L veya mm^3 'de 500'den az nötrofil varlığı ve bu durumun 10 gün ya da daha uzun süreli olması), allojenik kök hücre nakli yapılması, uzamış kortikosteroid kullanımı (0.3 mg/kg/gün prednizolon eşdeğeri > 3 hafta süreyle), T hücre baskılayıcı immünsüpresif kullanımı (siklosporin, TNF- α blokörleri, alemtuzumab gibi monoklonal antikörler, nükleozid analogları), kalıtsal immün yetmezlik (kronik granülatöz hastalık, ağır kombine immün yetmezlik) olarak güncellenmiştir (8).

Nötropeni süresi uzadıkça İA riski artmaktadır. Nötropeni süresi 10–12 günden az olduğunda, İA nadir görülmektedir. SOT ve HKHT hastalarının yanı sıra hematolojik malignitelerden AML hastaları, İA açısından en riskli grup olmakla birlikte, multipl miyelom (MM), myelodisplastik sendrom (MDS), Non-Hodgkin lenfoma (NHL) ve diğer lenfoproliferatif hastalıklarda da İA görülebilir (22).

Günümüzde, HKHT ve SOT hastalarındaki İFİ konusunda en geniş kapsamlı çok merkezli epidemiyolojik sürveyans çalışması olan Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) portalının verileri değerlendirildiğinde, hematolojik maligniteli hastalar ve HKHT hastalarında İA'nın daha sık görüldüğü, SOT ve yoğun bakım hastalarında ise İK'in daha yüksek oranda görüldüğü sonucuna varılmıştır (23).

HKHT yapılan hastalarda İA açısından en riskli grup “unrelated” ve “mismatch related” donörlerden nakil yapılanlardır. En sık da *Aspergillus fumigatus* görülür. Enfeksiyon sıklıkla transplant sonrası geç dönemde (>100 gün) ortaya çıkar. Genellikle, %58 oranında indüksiyon kemoterapisi esnasında karşılaşılır. Birden fazla kez transplantasyon uygulanan hastalarda potansiyel olarak amfoterisin B dirençli *fumigatus* dışı *Aspergillus* türleri ile akciğer enfeksiyonu daha sık görülmektedir. Solid organ nakillerinde ise İA %18.8 oranında görülür ve en sık olarak da akciğer transplantasyonu sonrasında ortaya çıkar (%44). Bu hasta grubunda görülen İFİ'lerin neredeyse yarısı İK şeklinde ortaya çıkmaktadır (%52.9). Genellikle post transplant erken dönemde (<100 gün) görülmektedir. Yoğun bakım hastalarında da invazif kandidiyaz giderek artan oranda görülmekte ve oldukça yüksek mortalite ile sonuçlanmaktadır. Yoğun

bakım hastalarında *Candida* dördüncü en sık enfeksiyon etkeni ve en mortal olanıdır (3, 23, 24).

HKHT için farklı kaynakların kullanılması (allojenik, otolog nakil) lökosit antijen uyumu, genetik faktörler (Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4), polimorfizmi), sitomegalovirus enfeksiyonu varlığı ve gansiklovir kullanımı, graft-versus-host hastalığı, çoklu sitopeni varlığı HKHT alıcılarında İA enfeksiyonları için tanımlanmış risk faktörleridir (24). HKHT alıcılarında daha çok dissemine enfeksiyon görülürken, hematolojik malignitelerde invaziv pulmoner aspergilloz görülür. Allojeneik HKHT alıcılarında engraftmandan sonra İA gelişirken, otolog HKHT alıcılarında engraftman öncesi nötropeni döneminde İA gelişir. Sitomegalovirüs enfeksiyonu da İA gelişiminde rol oynar. Uzun süreli gansiklovir profilaksisinin de İA riskini artırdığı gösterilmiştir (25).

SOT hastalarına bakacak olursak, kistik fibrozisli akciğer transplant alıcılarında havayolu *Aspergillus* kolonizasyonu transplantasyon sonrası hastalık için risk faktörü iken, karaciğer transplant alıcılarında ise artan immunsupresyon, hemodiyaliz ve sitomegalovirüs enfeksiyonu risk faktörleridir (26, 27). Böbrek transplantasyonlarında transplantasyon öncesi uzamış diyaliz, ileri derecede renal yetmezlik ve kadavradan yapılan nakil İA olasılığını arttırmaktadır (3, 28).

İA'ın özellikle, altta yatan bir kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) nedeniyle glukokortikoid tedavisi almakta olan immunsuprese yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda da oluşabileceği bilinmektedir (29, 30).

Genetik açıdan bakacak olursak, HKHT donörlerinde, alıcılarında veya hematolojik maligniteli hastalarda var olan çeşitli gen polimorfizmleri de risk faktörleri arasındadır. Bunlara örnek olarak; doğal immün yanıt ile ilgili olan Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4) geni, çözünebilir patern algılama reseptörü olan long pentraxin 3 (PTX3) ve dectin-1 Y238X polimorfizmi yer almaktadır (31-34). Mannoza bağlayıcı lektin eksikliği de İA ile ilişkilendirilmektedir (35).

Genel olarak İA'nın epidemiyolojisi komplekstir. İA yaş, cinsiyet ve ırk farklılığı göstermez. Hastadan hastaya bulaş görülmemiştir. Enfeksiyonun en önemli belirleyicisi, mantar ile temasın yoğunluğu değil, hastanın bağışıklık durumudur. *Aspergillus* türleri özellikle iç ortam olmak üzere hem dış hem de iç ortam hava florasında mevcuttur. Doğada; hava, su, toz, toprak, çürüyen organik

maddeler ve baharatlarda yaygın olarak bulunurlar. Hava hareketleri ile kolayca yayılabilmekte, hidrofobik özellikteki konidyaları nedeniyle hava ve su sistemlerinde bulunabilmektedir. Solunan hava en önemli rezervuardır. Bunun yanı sıra su kaynaklı epidemiler olduğu da bildirilmiştir. Hastane hava ve su sistemlerinin *Aspergillus* konidyaları ile kontaminasyonu, özellikle immün sistemin baskılandığı hasta gruplarında, nozokomiyal salgınlara neden olabilmektedir. *A. fumigatus* hastane suyu kültürlerinden ve hastane duş başlıklarından üretilmiştir. Damlacık yolu ile soluma sonucu bulaş söz konusudur. Su kaynaklı bulaşın öneminin daha iyi anlaşılması için genotiplendirme yardımcı olacaktır. Yine hastane odalarındaki saksı bitkileri konidyum kaynağıdır (36-38).

İnvaziv hastalık en çok inşaat ortamı gibi yüksek miktarda havayolu maruziyeti veya konağın konidyaları efektif bir şekilde atamadığı koşullar söz konusu olduğunda meydana gelmektedir (39). Hastanelerde yapılan inşaat çalışmaları sonucu havadaki küf miktarının artması, riskli ünitelerde görülen salgınlar, hastalardaki kolonizasyon, hava örneklemeleri sonucu iç ve dış ortam hava örneklerinde en sık *Penicillium* ve *Cladosporium* cinsi küfler bulunmasına rağmen hastalarda enfeksiyon etkeni olarak en sık *Aspergillus* türleri izole edilmesi hastane havasının klinik anlamda önemini ortaya koymaktadır (40).

Hastanede *Aspergillus* sporlarının barındırılmasında ve yayılımında, pamuk dokuma kumaşların etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle personel bu sporların taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Hastane personeli ve ziyaretçilerin riskli hastaların yanında pamuklu giysilerden kaçınması önerilmektedir (41, 42). Bunun dışında, ıslak ahşap da enfeksiyon gelişiminde risk oluşturmaktadır. Hastanede gelişen 53 salgının değerlendirildiği bir çalışmada; aspergillozun en sık inşaat çalışmaları ve havalandırmadaki eksiklikler sonucu olduğu gösterilmiştir. Salgınlarda etkenlerin sıklıkla *A. fumigatus* ve *A. flavus* olduğu görülmüştür. Bu sonuçta *A. fumigatus* ve *A. flavus*'un düşük konsantrasyonlarda dahi enfeksiyona neden olabilmesi etkili gibi gözükmemektedir. Mevsimsel değişikliklerin, havadaki spor sayısını etkileyerek, invaziv aspergilloz insidansında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Sıcak yaz aylarında havadaki spor sayısının daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. *Aspergillus* enfeksiyonu, önceki enfeksiyon veya kolonizasyonun reaktivasyonu şeklinde de ortaya

çıkabilmektedir. Dolayısıyla çevresel maruziyet azaltılsa bile, tüm hastaları korumak mümkün olmamaktadır (43-45).

2.2. Sınıflandırma

Aspergillus türleri taksonomik düzenlemede; mantarlar aleminde, Ascomycota filumunda, Euascomycetes sınıfında, Eurotiales takımında, Trichocomaceae ailesinde Eurotium, Emericella, Neosartoria gibi telemorfik (eşeyli üreme) formları ve anamorfik (eşseysiz üreme) formları bulunmaktadır.

2.3. *Aspergillus* Türleri ve Fizyopatogenez

Geçmişte, mikologlar, *Aspergillus* organizmasının tanımında tür düzeyinde tanımlama için fenotipik karakteristiklerini değerlendirirken, yakın zamanda moleküler methodların kullanımı ile tanımlanmış türlerin sayısı genişlemiş organizmanın patojenitesi ve diğer karakteristikleri ile ilgili mevcut bilgi artmıştır. *Aspergillus* cinsinin üyeleri her biri birçok bölüm ve tür içeren farklı alt gruplara ayrılmıştır. Bazı türler fenotipik tiplendirme ile ayırt edilemeyebilirler. İn-vivo olarak değişken duyarlılıklar ve davranışlar sergileyen daha sık olarak saptanan türler dünya genelinde hastalıklara sebep olmaktadır. Sınıflandırmadaki karmaşıklık ve rutin moleküler tiplendirmedeki eksiklikler, son zamanlarda saptanan izolatların ‘tür karmaşık’ grubunun bir üyesi olarak tanımlanmasına yönlendirmektedir. Tür dağılımları incelendiği zaman, en sık invaziv enfeksiyona yol açanların *A. fumigatus* tür kompleksi olduğu görülmektedir. Amerika’da 24 transplant merkezinde 218 enfeksiyon etkeninin incelendiği bir çalışmada %67 etken *A. fumigatus*, bunu takiben *A. flavus* (%13), *A. niger* (%9), ve *A. terreus* (%7) olduğu görülmüştür. Bu veriler mikrobiyal epidemiyoloji, tiplendirme yöntemlerindeki merkez-bazlı farklılıklara bağlı olarak değişebilmektedir (46, 47).

Günümüze kadar 250’den fazla tür tanımlanmıştır. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. oryzae* ve *A. versicolor* insanda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Aspergillus* türünün patojenitesine karar verirken, hastanın kliniği ve immün sistemi değerlendirilmelidir. Daha önce

patojen kabul edilmeyen türler infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedir. *A. ustus* son yıllarda patojen kabul edilen türlerden biridir. Kistik fibrozisli hastalarda seyrek rastlanan bir tür olan *Aspergillus nidulans* ile de hastalıklar oluşmaktadır (22).

Aspergillus küçük, hızla havaya karışabilir, hidrofobik konidyalar (spor) üreterek hava yoluyla yayılabilir. Her gün yüzlerce konidyanın insanlar tarafından inhale edilmesi nedeniyle en sık etkilenen organ akciğerlerdir. Enfeksiyon sırasında öncelikle epitelyal invazyon gelişmektedir. *Aspergillus* konidyalari tip II pnömositler ve trakea epitel hücrelerince endositozla alınmaktadır. Gerçekleşen endositoz konidyaların germinasyonunu geciktirmektedir. Ancak pek çok konidya germinasyonu gerçekleştirmekte ve endozomdan kaçarak pnömosit plazma membranına penetre olmaktadır. Germinasyon hızları ve süreleri *Aspergillus* türüne göre değişkenlik göstermekte patojenitesi yüksek *A. fumigatus* türlerinde bu durum hızla gerçekleşmektedir. Pulmoner epitel invazyonunu takiben endotelial hücre invazyonu gerçekleşmektedir. Gelişen anjioinvazyon ve vasküler tromboz, lökosit ve antifungal ajanların zor penetrasyon gösterdikleri doku nekrozu ile sonuçlanmaktadır. İnhalasyon ile solunum sistemine giren konidyalar ilk olarak bronşiyal epitelin siliyer aktivitesi ile uzaklaştırılmaktadır. Ancak, sigara kullanımı veya KOAH zemininde sık tekrarlayan enfeksiyonlar nedeni ile gelişen epitelyal hasar siliyer aktiviteyi bozmaktadır. Aynı zamanda bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen toksik moleküller siliyer aktiviteyi engellerken, salgılanan yıkıcı enzimler (proteaz) de epitelyal hasara neden olmaktadır. Siliyer aktiviteden kaçabilen küçük boyutlu konidyaların varlığı da *A. fumigatus* gibi türlerde patojeniteyi artıran diğer bir nedendir (48, 49). Tablo 2.1’de *Aspergillus virulans* faktörleri özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *Aspergillus* virölans faktörleri.

Adhezinler (Hidrofofinler, laminin reseptör)	Mantar ile konak hücre ve proteinleri arasındaki etkileşim
Pigment (melanin)	Reaktif oksijen radikallerine direnç Fagositozdan korunma
Toksinler Gliotoksin Sitoksin	İmmüsupresyon Oksidatif öldürme ve makrofaj fagositozunun önlenmesi, T-lenfosit aktivasyon ve proliferasyonu engellenmesi Ökaryotik ribozom fosfodiester bağlarını ayrılması, invaziv ve alerjik aspergilloz patogenezi
Enzimler Proteaz, kollajenaz, elastaz Katalaz,süperoksit dismutaz Fosfolipaz	Doku penetrasyonu, hücre invazyonu ve doku hasarı Reaktif oksijen radikallerine direnç Konak hücre yıkımı, epitelyal hasar, bariyerin bozulması, membran yıkımı

A.fumigatus'ta saptanan melanin pigmentinin konidya fagositozunu inhibe etmesi, salgılanan bazı sekonder metabolitlerin (gliotoksin) fagositoz ve oksidatif öldürme mekanizmalarını engellemesi buna örnektir. *Aspergillus* türleri arasında immün kaçış mekanizmaları açısından farklılıklar bulunmaktadır. Fagolizozom asidifikasyonunu önleyen *A.fumigatus*'un aksine, *A.terrusun* asidik pH'a gösterdiği direnç alveolar makrofajlar içerisinde daha uzun süre yaşamasına neden olmaktadır. *A.fumigatus*'un üç farklı katalaz enzimi tanımlanmıştır. Ayrıca *A.fumigatus* izolatlarında fosfolipaz A,B,C,D enzimleri salgılandığı gösterilmiştir. Klinik izolatlarda çevre izolatlara göre daha yüksek seviyede fosfolipaz bulunmaktadır. Amfoterisin-B gliotoksin sentezini indüklemektedir. *A.fumigatus*'un yüksek ısılarda üreyebilmesi (termotoleran) yine bir virölans faktörüdür. Bazı *aspergillus* türleri, transferrinden demirin ayrılmasını sağlayan sideroforlar salgılar. Bu *A.fumigatus*'un konakta üreyebilmesi için gerekli olup, serumun fungusitik etkisinden korur (38, 48).

İnhale edilmiş konidyalar, özellikle havayolu epitelyal hücreleri ve alveolar makrofajlar gibi mevcut fagositler tarafından sağlanan doğal savunma ile karşılanırlar. Epitelyal hücrelerin konidyalari temizlemedeki katkısı hakkında çok az bilgi mevcuttur. Nispeten makrofajlar hakkında daha çok şey bilinmektedir ki onlar hem konidyalari ortadan kaldırılmasına ve de sekonder inflamasyonun yapımına katkı sağlamaktadır. Bu hücreler, konidyalari hifal formlara germinasyonu sonrası açığa çıkan anahtar hücre duvarı komponentlerinin (beta-D-glukan gibi) tanınması sonrasında inflamatuvar mediyatörler salgırlarlar. Bu mediyatörler, nötrofil depolanmasına ve potansiyel invasiv mikrobiyal formlarin (hiflerin) öldürülmesinde ve immun cevabın kapsamının belirlenmesinde önem arz eden hücreselel immunitenin aktivasyonuna sebep olurlar. Bu yüzden, hastalık için riskler ve oluşun hastalık tipleri çoklu hücreselel fonksiyonların kombine bir sonucudur.

Hastalık potansiyelini etkileyen mikrobiyal faktörler toksinleri, proteazları ve konağın lokal akciğer ve sistemik savunmasını etkileyen sekonder metabolitleri içermektedir. Bunlar arasındaki hücreselel ürünler: Fagositteki filamentöz mantarlara karşı savunmadaki anahtar bileşik olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonun inhibe eder, makrofaj fagositozunu ve öldürmesini inhibe eder ve fonksiyonel T-hücre cevabını baskılar.

Histopatolojik olarak, invaziv aspergillozis, enfeksiyonun doku düzeyinde yayılması ile karakterizedir. Ayırıcı özellik enfeksiyonun doku nekrozu ve infarktı ile vasküler invazyonudur. Muhtemelern, mantar hücre yüzey komponentleri, bazal membran, ekstrasellüler matrix ve hücreselel bileşenleri içeren damar duvar komponentlerine bağlanır ve invaze damarların distalinde iskemi, doku infarktına neden olurlar (39, 50).

2.4. Klinik

Aspergillozis terimi, *Aspergillus* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonları tanımlamak için kullanılırlar. Bu durum çoğunlukla *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* gibi *Aspergillus* türlerinin sebep olduğu alerji, havayolu veya akciğer invazyonu, kutanöz enfeksiyon veya ekstrapulmoner yayılıma bağlı olabilir. *Aspergillus* türleri, hem vücuda giriş bölgelerine hem de

konağın immün durumuna göre farklı klinik bulgulara neden olabilmektedir. *Aspergillus* sporlarının insan vücuduna en sık inhalasyon yoluyla girişi olduğu için en sık klinik bulgular solunum sisteminde görülmektedir. Doku invazyonu yaygın olmamakla birlikte çoğunlukla hematolojik maligniteler, hematopoetik hücre transplantasyonu veya solid organ transplantasyonu tedavisi ile ilgili immünsüpresyonda görülmektedir (51). Tablo 2.2’de *Aspergillus* enfeksiyonlarının sınıflandırması özetlenmiştir (37).

Tablo 2.2. *Aspergillus* enfeksiyonlarının sınıflandırması.

Sağlıklı konak;	• Mikotoksikoz (Toksik aspergilloz: Genellikle inşaat işçilerinde ve harman savurucularında gözlenen konidyumların yoğun inhalasyonu sonucu alveolar reaksiyonla ortaya çıkan kısa süreli dispne halidir.) • İn hale edilen sporların antijenik uyarımı ile oluşan allerjik tablolar (allerjik bronkopulmoner aspergilloz = ABPA, allerjik astım, allerjik rinit, allerjik sinüzit, extrensek allerjik alveolit, aşırı duyarlılık pnömoniti) • Yüzeysel (invazif olmayan) enfeksiyonlar (deri enfeksiyonu, otomikoz, sinüzit, saprofitik bronkopulmoner aspergilloz, trakeobronşit) • İnvaziv enfeksiyon (tek organ, çoklu organ yayımlımlı)
Bağıışıklık sistemi bozulmuş konak;	• İnvazif (yayımlı gösteren) aspergilloz (%90 Akciğerde. Santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, böbrek, karaciğer ve diğer organlara yayımlımlı) • Pulmoner aspergilloz (İnvazif trakeobronşit, kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz, akut invazif pulmoner aspergilloz = AİPA) • Sino-orbital enfeksiyon (akut / kronik invaziv sinüzit)
Doku hasarı veya yabancı cisim varlığı;	• Aspergilloma (mantar topu) (Akciğerde, sinüs, dış kulak yolu) • Keratit, Endoftalmit • Yanık yarası enfeksiyonu • Osteomiyelit • Prostetik kapak endokarditi • Damar greft enfeksiyonu • Ampiyem veya plevral aspergilloz • Peritonit

Solunum yollarında *aspergillus* kolonizasyonu

Solunum yollarında mukosiliyer aktivite bozulması, bronş duvarındaki yapısal değişiklikler gibi nedenlerle kolonizasyon gelişebilmektedir. Bu değişiklikler, mukosiliyer aktivitenin bozulduğu KOAH hastalarında ve mekanik ventilasyon desteği alan tüm yoğun bakım hasta grubunda saptanabilmektedir (29).

Yaşlılık, sigara kullanımı, alkol kullanımı, uzamış hastane servis ve yoğun bakım yatışı, antibiyotik kullanımı, diğer kronik akciğer hastalıkları *aspergillus* kolonizasyonu ile ilişkilendirilmiş risk faktörleridir. Yoğun bakımda solunum sekresyonlarında *aspergillus* izolasyon süresi ortalama 1 hafta olarak bilinmektedir. Bazı çalışmalar *aspergillus* kolonizasyonunun hastane yatışı öncesinde gerçekleştiğini gösterse de hastane hava, su ve ventilasyon sistemlerinin aerosol halindeki sporlarla kontaminasyonu enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. *Aspergillus* kolonizasyonunun özellikle KOAH varlığında invaziv enfeksiyonlara dönüşüm gösterebileceği düşünülmektedir (29, 52).

Aspergilloma (mantar topu)

Önceden vücuttaki hava boşluklarında (dış kulak yolu, paranasal sinüsler) saprofitik kolonizasyona bağlı olabileceği gibi en sık akciğerde tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi, bül, pnömokonioz, ankilozan spondilit, akciğer neoplazmi sonrası oluşan kaviteler gibi doku hasarı içinde oluşur. Genellikle çevre dokuya yayılmaz ama bronkoplöral fistüle neden olarak yangısal reaksiyona neden olabilir. Bazen asemptomatik olmakla birlikte öksürük, hemoptizi, kilo kaybı, ateş görülebilir. İkincil bakteriyel enfeksiyon gelişebilir (38).

Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)

En çok atopik kişilerde görülmekle birlikte astım, kistik fibrozis de risk faktörlerindendir. En sık *A.fumigatus* sorumludur. Klinik reagen (IgE) ve presipitasyon (IgG) antikorlarına bağlı olarak ortaya çıkar. Konidyumlarla uzun süreli karşılaşma sonucu özgül IgE antikorları astım, eozinofili, deri reaksiyonlarına yol açarken (Allerjik / astmatik aspergilloz), konidyumların akciğerde bir ya da birden çok odakta çoğalması ile özgül IgG antikorları

pulmoner infiltrasyona neden olur (Alveolar infiltratif aspergilloz). Genel olarak astım semptomlarının (ateş, sekresyon artışı, hırıltılı solunum, nefes darlığı, plöritik vasıflı ağrı, halsizlik) uzaması, akciğer grafisinde gezici infiltrasyon alanları, bilgisayarlı tomografide de santral bronşektazi görülür. Sporlarla karşılaşmaya bağlı olarak hastalık ataklar gösterebilir. Serum immünglobulin E düzeyinin artması (1000 IU/L üzeri), *A.fumigatus* karşı gelişen immünglobulin E ve presipitan immünglobulin G antikorlar, kutanöz reaksiyonlar, kanda ve solunum sekresyonlarında eozinofili tanı kriteri olarak kullanılmaktadır (16, 37, 38, 52, 53).

Akut invaziv pulmoner aspergilloz

Aspergillus klinik formları içerisinde en sık görülen formdur. Ölüm oranı yüksektir. En sık *A.fumigatus* ve *A.flavus* etkindir. *Aspergillus* hiflerinin akciğer parankimi veya trakeobronşial sistem içerisindeki proliferasyonu sonucu doku invazyonu ve hasarı ile karakterizedir. Bağışıklık sisteminin baskılanması risk faktörüdür. Yüksek ateş, nefes darlığı, radyolojik incelemede minör infiltrasyon görülür. Büyük pulmoner arterlere yayılım ve tromboz sonucu hemorajik pulmoner infarktüs ve nekroz alanları gelişmektedir. Hastalık akut başlar fakat ilerlerse yıllar içerisinde kronik seyirli nekrotizan ve ölümcül bir tablo oluşur (54).

Klinik bulgular hastalığa özgül olmayıp nozokomiyal bronkopnömoni tablolarını taklit etmektedir. Antibiyotik tedavisine yanıtız ateş, öksürük, balgam, dispne, vasküler invazyona ikincil gelişen tromboza bağlı plöritik ağrı, plevral sürtünme sesi ve hemoptizi görülebilmektedir. Semptomların görülme sıklığı konağın immün durumuna ve altta yatan hastalığa bağlı değişkenlik göstermektedir. Nötropenik İPA olgularında ateş sık saptanan bulgu iken, nötropenik olmayan veya KOAH nedeniyle steroid tedavisi alan İPA olgularında daha az sıklıkta saptanmaktadır (30, 52, 54).

Pulmoner aspergillozis gelişen nötropenik hastalarda klasik triad, ateş, plöritik göğüs ağrısı ve hemoptizidir. Fakat, bunların olmayışı hastalık için risk faktörlerini barındıranlarda tanıyı dışlamak için yeterli değildir. Nötropenik hastalarda, lokalize pulmoner semptomlar yokken ateş ile prezente olabilirler. Bu

tür hastalarda akciğer görüntülemesi, pulmoner nodülleri ve/veya infiltratları ortaya çıkarmaktadır (55).

İnvaziv pulmoner aspergilloz tanısı konulan KOAH'lı hastalarda dispne en sık bulgu olup, yoğun bakım yatışının en önemli nedeni KOAH alevlenmesi ve respiratuar yetmezliktir. Hemoptizi ve plöritik ağrı nütropenik hastalara göre daha nadir saptanmaktadır (30).

Nütropenik ve nütropenik olmayan hastaları karşılaştıran bir çalışmada ateş, öksürük, göğüs ağrısı nütropenik grupta daha sık saptanırken hemoptizi gelişim açısından fark saptanmamıştır. Yoğun bakımda İPA olgularının analiz edildiği bir çalışmada, ateş, wheezing, kuru raller İPA dışı olgulara göre daha sık saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda İPA tanısının hastane yatışının ortalama 18. gününde konulduğu, semptomların ise tanıdan ortalama 8,5 gün önce başladığı gösterilmiştir (56).

Akut invaziv bronşial aspergilloz

Tekrarlayan *aspergillus* üremeleri olan hastalarda invaziv pulmoner aspergilloz'dan sonra en sık saptanan *aspergillus* ilişkili klinik durumdur. Bronşial mukozada inflamasyon varlığına karşın ülserasyonun görülmediği klinik durumlar *aspergillus* trakeobronşiti olarak tanımlanmaktadır. Mukozada nekroz, pseudomembran ve ülserlerle karakterize pseudomembranöz ve ülseratif tipleri de görülebilmektedir. İnvaziv bronşial aspergilloz özellikle akciğer transplantasyonu yapılan hastalarda anastomoz hattında, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) pozitif olan, diğer solid organ transplant alıcılarında, hematolojik malignite, hematopoetik hücre alıcılarında, KOAH hastalarında ve mediastinal yayımlı kanser hastalarında daha sık olmakla birlikte İPA için risk taşıyan tüm hasta gruplarında görülebilmektedir (52, 55).

Akciğer transplantasyonu sonrası bronşial anastomoz hattında bir komplikasyon olarak gelişen bu durum, sütür materyalinin enfeksiyonu sonucudur ve insidans ipek sütür yerine naylon monoflamanlar kullanılarak azaltılabilir.

Öksürük, wheezing, dispne ve daha az sıklıkta olmak üzere hemoptizi saptanabilmektedir. Ara ara lümen içinde biriken mukus tıkaçlarını balgam olarak çıkarmaktadırlar. Tanı bronkoskopik ve mikrobiyolojik bulguların birlikteliği ile

konulmaktadır. Akciğer görüntülemesi normal olabilir veya havayollarındaki kalınlaşma bölgeleri, yama infiltratlar, konsolidasyon veya sentrilobüler nodüller gözlenebilir. *Aspergillus* trakeobronşitinin farklı paternleri tanımlanmıştır.

- Obstrüktif bronşial aspergillozis, havayollarında küçük mukozal inflamasyon veya invazyon ile birlikte *Aspergillus* hiflerini içeren kalın mukus tıkaçlarının bulunduğu bir durumdur
- Ülseratif trakeobronşit, trakeobronşial mukoza ve/veya kıkırdağın fungal hifler ile fokal invazyonu
- Psödomembranöz trakeobronşit, trakeobronşial ağacın mukoza üzerindeki nekrotik debris ve *Aspergillus* hiflerini içeren psödomembranlı yaygın inflamasyon ve invazyonu.

Trakeobronşial sistemin membranlarla kaplandığı ve inflamasyonun belirgin olduğu pseudomembranöz form en ağır klinik form olup mortalitesi yüksektir (57, 58).

Paranasal sinüs enfeksiyonları

Sinüslerin en sık mantar enfeksiyonudur. En sık *A.flavus* izole edilir. Bağışıklık sistemi baskılı hastalarda ağır seyreder. Ateş, nazal akıntı, baş ve yüz ağrısı görülür. Enfeksiyon yüze ve beyine yayılabilir.

İnvazif (yayılım gösteren) aspergilloz

En sık tutulum akciğer olmakla birlikte Hastalık akciğerden beyin, gastrointestinal sistem, böbrek, karaciğer ve diğer organlara yayılabilir, abse ve nekrotik lezyonlar oluşur (16, 36, 38).

Subakut invaziv aspergilloz (Kronik nekrotizan aspergilloz)

Akciğer parankiminin *aspergillus* türleri tarafından lokal invazyonu ile gelişen vasküler invazyon ve disseminasyonun görülmediği yavaş seyirli klinik durumlardır. Geçirilmiş tüberküloz, KOAH, kistik fibroz, geçirilmiş toraks cerrahisi ve akciğer enfarktı, sarkoidoz tanımlanmış risk faktörleridir. Ilımlı bir immünsupresyona neden olan DM, kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit), alkol kullanımı, malnütrisyon ve karaciğer hastalıkları sonrasında da

gelişebilmektedir. Ateş, kilo kaybı, öksürük, hemoptizi görülebilmekle birlikte asemptomatik seyredebilmektedir. Radyolojik incelemelerde haftalar ve aylar içerisinde progresyon gösteren üst loblarda konsolidasyon, nodül, kaviter lezyon ve sekonder aspergilloma saptanabilmektedir. Radyolojik bulgular, serum immünglobulin G pozitifliği, cilt reaksiyonu, solunum sekresyonlarında *aspergillus* izolasyonu tanı için kullanılabilse de, kesin tanı histopatolojik olarak doku invazyonunun gösterilmesi ile konulmaktadır (52).

Kronik kaviter pulmoner aspergilloz

İmmüsupresyonu bulunmayan, altta yatan akciğer hastalığı bulunan kişilerde özellikle *A.fumigatus*'a bağlı olarak gelişen; kronik kaviter pulmoner aspergilloz, kronik fibrozis oluşturan pulmoner aspergilloz ve aspergilloma olarak tanımlanan klinik durumlardır. Tüberküloz, tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonları, ABPA (allerjik bronkopulmoner aspergilloz), KOAH, amfizem, pnömotoraks öyküsü, daha önce tedavi edilmiş akciğer kanseri varlığı, geçirilmiş akciğer operasyonu, pnömoni (akciğer absesi), sarkoidoz ve romatoid artrit varlığı KPA (kronik pulmoner aspergilloz) gelişimi için tanımlanmış risk faktörleridir. En sık geçirilmiş akciğer tüberküloz öyküsü olan hastalarda gelişmektedir. İmmün baskılanması olmayan hastada en az bir kaviter lezyon, aspergillus karşı gelişen presipitan immünglobulin G ve immünglobulin E tipi antikorlar, kültür veya biyopsi örneklerinde *Aspergillus spp.* izolasyonu ve klinik bulguların (kilo kaybı, öksürük, hemoptizi, nefes darlığı) en az 3 ay süresince devamı ile tanı konulmaktadır. Aspergilloma saptanan olgular genellikle asemptomatiktir. Histopatolojik incelemelerde doku invazyonu gösteren veya göstermeyen hifal yapılar ile birlikte kronik inflamasyon, nekroz, granülom yapıları ve fibrozis saptanabilmektedir. Zaman içerisinde kaviter lezyonlarda büyüme, akciğer parankiminde ilerleyen fibrozis, masif hemoptizi, sekonder enfeksiyon gelişimi görülebilmektedir. Masif hemoptizi kaviter sınırların bronş damarlarına lokal invazyonu, aspergilluslardan salınan endotoksinler veya mekanik etki ile gelişebilmektedir. Aspergilloma olgularının büyük çoğunda lezyon stabil kalırken bazen spontan küçülme ve çözülme saptanabilmektedir. Lezyon boyutlarında büyüme nadirdir (59). Yavaş ama progresif ilerleme konağın immünitesinin

organizmayı kontrol altında tutabilmesine, fakat elimine edememesine bağlıdır. Halsizlik, kilo kaybı, öksürük, göğüs ağrısı ve akciğer grafisinde bilgisayarlı tomografide daha iyi tanımlanabilecek yavaş ilerleyen lezyon görülür. Radyolojik bulgular, eş zamanlı bulunan mevcut akciğer hastalığı ile karışabilir.

Disemine enfeksiyon (Santral sinir sistemi enfeksiyonu)

Anjiyoinvaziv hastalık varlığında, *Aspergillus* türleri hava yollarının dışında deri, beyin, gözler, karaciğer ve böbrekler gibi farklı organlara yayılabilmekte ve kötü prognoz göstermektedirler. Disemine enfeksiyon kadar paranasal sinüslerden lokal yayılım ile santral sinir sistemi enfeksiyonu oluşabilmektedir. Bu hasta grubu nöbetler ve fokal nörolojik belirtilerle karşımıza çıkabilir (39).

Bazı olgularda mikotik anevrizmalar gelişebilir ve rüptüre olarak subaraknoid hemoraji ve/veya ampiyem formasyonu oluşabilir (60).

Rinosinüzit

Paranasal sinüslerde aspergilloz mucormikoza benzer bir tablo oluşturmaktadır. Fakat rinoserebral aspergilloz daha çok nötropenik hastalarda görülmekte iken, mukormikoz daha sıklıkla diabetes mellitus varlığında ortaya çıkmaktadır. Nötropeni nedeniyle inflamatuvar cevap güç ve bulgular silik olabilir. Bununla beraber, nazal konjesyon, ateş, yüz ve göz çevresinde ağrı belirgin olan bulgulardır. Eğer orbitaya yayılım söz konusu ise, bulanık görme, proptozis ve kemozis meydana gelebilir. Enfeksiyon beyine yayılarak kavernoz sinus trombozu ve farklı santral sinir sistemi belirtileri gösterebilir. Görüntüleme bulguları silik olabilmekte, genel olarak fokal yumuşak doku lezyonları, fokal kemik erozyonları, manyetik rezonans görüntülemeye sinus sınırlarında fokal genişlemeler şeklinde veya tomografide fokal hipodens alanlar şeklinde olmaktadır. Tanı koymada biopsi hatta bazı zamanlar çoklu biopsi alınması gerekmektedir (61).

Endoftalmit

Dissemine hematojen yayılımın dışında korneal enfeksiyon veya travma sonucu direk inokülasyon şeklinde olabilir. Hastalarda gözde ağrı ve görme değişiklikleri olabilir (62).

Endokardit

Fungal endokardirin Candida türlerinden sonraki ikinci sebebidir. Prostetik kapaklarda özellikle enfeksiyon meydana gelmektedir. Özellikle cerrahi alanın kontaminasyonu nedeni ile ameliyat sırasında enfekte olurlar ve postoperatif herhangi bir zamanda presentasyon görülmektedir. Diğer risk grupları santral intravenöz kateteri olanlar ve intravenöz ilaç bağımlılarıdır. Tipik olarak ateş ve emboli bulguları görülmektedir. Kan kültürleri çok nadir olarak pozitifdir. Embolusun mikroskopik incelemesinde hifal elemanlar şüphe uyandırır da, tanı için organizmanın kültürü esastır. Mortalite oranları %100'e yakındır (63).

Kutanöz aspergillozis

Travma ile direk inokülasyon sonucu primer olabilmekte ya da kan yolu yayılımı ile sekonder olabilir. Sağlıklı konakta bile yüksek spor miktarlarına maruziyet veya travmatik inokülasyon ile cerrahi yaralarda kutanöz hastalık oluşturabilir. Yanık hastaları, yenidoğanlar ve SOT hastaları uzamış lokal deri hasarına bağlı daha çok primer kutanöz hastalık geliştirebilmekte iken, hematolojik maligniteli ve HKHT alıcıları daha sıklıkla komşu bölgelerden kan dolaşımı invazyonu ile hastalık oluşturmaktadır. Tanı sadece deri biopsisi ile konabilmekte ve biopsi mümkün olduğunca lezyonun merkezinden, dermis ve subcutan bölgedeki damarlara uzanan hifaları görüntülemek için subkutan yağ dokuyu içerecek şekilde alınmalıdır (64).

Gastrointestinal aspergillozis

Fokal invazyon ile nötropenik enterokolit, apandisit, kolonik ülser, abdominal ağrı ve/veya kanama ile karşımıza çıkabilir. Direk inokülasyon nötropeni, glukokortikoid kullanımı ve mukozit gibi risk faktörlerinin varlığında karşımıza çıkar (65, 66).

2.5. Klinik Tanı

2.5.1. Fungal infeksiyonlarda EORTC tanımları

İlk kılavuz, hematolojik kanser ve kök hücre nakli ile ilgili iken, son kılavuzda buna solid tümör ve immunsuprese hastalar da eklenmiştir. Son kılavuzda, şüpheli fungal infeksiyon tanımı daraltılırken, olası fungal infeksiyon tanımı genişletilmiştir. Ateş, bir konak faktörü olmaktan çıkmış, radyolojik bulgular genişletilmiştir. Bu uzlaşma metnine göre, İFİ olasılığını arttıran durumlar 3 alt başlıkta incelenmektedir: konak (host) faktörleri, klinik faktörler ve mikrobiyolojik faktörler.

Konak faktörleri

- HKHT alıcıları
- 10 gün ya da daha uzun nötropenisi olanlar ($<500/\text{mm}^3$)
- 3 haftadan fazla 0.3 mg/kg üzeri prednizon kullanımı
- Son 90 günde T hücre baskılayıcılarının kullanımı (siklosporin, TNF- α blokerleri, monoklonal antikorlar-alemtuzumab gibi) veya nükleozid analogları kullanımı
- Herediter ciddi immün yetmezlik (Kronik Granülomatoz Hastalık veya Ağır Kombine İmmün Yetmezlik) gibi faktörler olarak tanımlanmaktadır.

Klinik (Radyoloji) faktörler

Major ve minör kriterler ayırımı kalkmıştır.

- Halo, hava-hilâl ve kavitasyon
- Halonun eşlik etmediği nodül, kama lezyonlar ve koyu konsolidasyon
- Trakeobronşit
- Sinonazal infeksiyon (görüntüleme bulguları ve akut lokalize ağrı)
- SSS infeksiyonu (fokal lezyon veya meningeal genişleme)
- Dissemine kandidiyaz

Mikrobiyolojik faktörler

Burada ayırım, kullanılan yöntemle göre değil, tanıma göre yapılmaktadır. Ayrıca endemik mikozlar içinde ayrı tanımlar vardır. Kanıtlanmış İFİ diyebilmek için etkenin görülmesi şarttır.

•Doku faktörleri tanımları:

- a.** Histopatolojik, sitopatolojik veya doğrudan mikroskopik inceleme ile iğne aspirasyonunda veya biyopsi örneğinde hifa oluşumuna eşlik eden doku hasarı (mikroskopik veya görüntüleme ile infiltrat ya da lezyon),
- b.** Normalde steril olan, ancak klinik veya radyolojik olarak infeksiyon ile uyumlu anormal bir bölgeden alınan kültürden küf üretilmesi (BAL, sinüs kavitesi ve idrar hariç) varsa buna kanıtlanmış İFİ demek mümkündür.

Kan kültüründe üreme *Fusarium* için kanıtlanmış İFİ kriteri iken *Aspergillus* için değildir.

•Mikolojik faktörler:

- a.** Direkt test: Doğrudan (sitoloji, mikroskopi, kültür) balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronş fırçalama örneği veya sinüs aspiratında küf mantarına işaret eden fungal yapı ya da kültür ile küf mantarı (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes* veya *Scedosporium* spp.) gösterilmesi.
- b.** İndirekt test: Dolaylı testlerle (antijen ya da hücre duvarı yapısı saptanması) plazma, serum, BAL veya BOS'ta GM ile aspergilloz tanısı, serumda BG ile kriptokok ve zigomikoz dışı İFİ tanısı konabilir. Ancak bu testlerin hiçbiri, kanıtlanmış İFİ tanısı koymak için yeterli olmayıp, olası İFİ hastalarının tanımı için geçerlidir.

Moleküler yöntemler bu tanımlar arasında yer almamaktadır. Standardizasyon sorunları bu testlerin tanı kriterleri arasına girmesini önlemektedir.

Klinik araştırmalarda İFİ'ler üç grupta tanımlanmaktadır: Kanıtlanmış, olası ve şüpheli. Bu tanımların gerçekleşebilmesi için üç grup faktör kullanılmaktadır: konak, klinik ve mikrobiyolojik faktörler ya da bulgular.

Kanıtlanmış İFİ

Mikrobiyolojik faktörler arasında yer alan doku faktörlerinin varlığı, kanıtlanmış İFİ tanımı için yeterlidir. Eşlik eden konak ve klinik faktörlerin varlığı beklenir.

Olası İFİ

Konak faktörü, klinik faktör ve ayrıca doku faktörü içermeyen mikolojik faktör birlikte olmalıdır.

Şüpheli İFİ

Konak faktörüne eşlik eden ya klinik bulgular ya da mikoloji vardır (8, 9, 39).

2.5.2. Radyolojik tanı

Direk grafi erken evredeki pulmoner hastalık saptamada duyarlı değilken, bilgisayarlı tomografi tipik fokal lezyonları gösterebilmektedir. Radyografik bulguların tipi konak ve hastalığın tipine (bronkopnömoni, anjioinvaziv aspergillozis, trakeobronşit, kronik nekrotizan aspergillozis) göre değişmektedir. Pulmoner aspergillozis tipik olarak kaviteli/kavitesiz tek veya multiple nodüller, yamalı veya segmental konsolidasyon, budanmış ağaç manzaralı/ manzarasız peribronşial infiltratlar ile karşımıza çıkar. Sıklık sırasına göre 1 cm'den küçük nodüller daha sıktır ve bunu konsolidasyon, büyük nodüller, peribronşial infiltratlar takip etmektedir (67).

Radyolojik bulgular konağa göre de değişkenlik göstermektedir. Nötropenik hastalarda tipik halo belirtisi, buzlu cam infiltratları ile çevrili nodüller görölmektedir. Bu nodüller uygun terapi altında iken bile büyüme eğilimindedirler ve kavite haline gelerek hava-hilal görüntüsüne sebep olurlar (68).

2.5.3. Ayırıcı tanı

Aspergillus türlerine benzer klinik ve radyolojik özellikler (ör; halo belirtisi) gösteren invaziv pulmoner infeksiyonlara yol açan *mucor*, *fusarium*, *Scedosporium* gibi diğer mantar türleri de bulunmaktadır. Halo belirtisi aynı zamanda *Pseudomonas aeruginosa* türünde de karşımıza çıkmaktadır.

Mukormikozis, yine invaziv aspergillozide olduğu gibi benzer özelliklerle santral sinir sistemine yayılan rinosünüzit tablosu oluşturabilir. Fakat, rinoserebral aspergillozis nötropenik hasta grubunda daha sık görülürken, mukormikozis daha çok diyabetli hastalarda karşımıza çıkmaktadır. Beyin apseleri de *Aspergillus* türlerine ek olarak yine *mucor*, *fusarium*, *Scedosporium* türlerine bağlı oluşabilmektedir (39).

2.6. Laboratuvar Tanısı

2.6.1. Konvansiyonel yöntemler (Direk mikroskopi, kültür, histopatoloji)

*Aspergillus*ların tür düzeyinde tanımlanmaları makroskopik (koloni morfolojileri, özellikleri) ve mikroskopik (tipik sporlanma özellikleri, hif yapısı, dallanma şekli, konidyaların şekli, üretilme biçimi ve düzeni) görünümleri, yaşam siklusları, üreme şekilleri, hücre duvar polisakkaritleri, antijenik yapıları ve moleküler özellikleri dikkate alınarak yapılabilmektedir. *Aspergillus* kolonileri kadifemsi veya pamuğumsu dokuda, beyaz, sarı, yeşil, kahverengi ve siyah renklidirler. Koloni tabanı beyaz, sarı veya sarımsıdır. Mikroskop görünüm özellikleri ise konidyumların şekli ve rengi, fialit (Sterigmata) sıralanması (tek veya çift sıralı), vezikül şekli ve konidiyoforun rengi, yapısal özelliğidir (16).

Klinik örneklerden izole edilen herhangi bir *Aspergillus* türünün patolojik öneminin değerlendirilmesi, pozitif radyolojik veya yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi bulgularıyla bile zor olabilir. Çünkü bu türler rutin olarak solunum yolu, deri ve diğer örneklerden izole edilirler. Direk mikroskopik incelemede taze klinik örnekte hiflerin gösterilmesi, tek bir örnekte yoğun üremenin veya tekrarlayan örneklerde aynı türün saptanması ve dokuda hiflerin gösterilmesi gerekmektedir (37).

Aspergillus hif elemanları ve hif morfolojilerinin detayları, içinde kalkoflor beyazı veya Blankofor gibi floresan bileşikler bulunan ya da bulunmayan rutin potasyum hidroksit preparatlarının yanı sıra, Gomori metenamin gümüş boyası gibi mantar boyaları ile doku kesitlerinde kolayca görülebilir. Hematoksilen-eozin ile boyanan dokuda canlı hifler bazofilik iken, nekrotik dokuda eozinofilik olma eğilimindedirler. Hiflerin görünümü enfeksiyon tipine göre değişiklik gösterir. İnvaziv aspergillozda tipik olarak hyalen, dar açıyla birbirine eşit dallanan, düzgün yüzeyli, duvarları birbirine paralel ve septum yerlerine çok hafif daralmalar olabilen hifler görülür. Doku içinde baştan başa üreme gösterirler, paralel veya ışınsal dizilimleri vardır. Akciğerdeki kaviteli lezyonlarda ise hifler yumak gibi dolaşık haldedirler ve kronik enfeksiyonda septumların olmaması gibi atipik hif özellikleri gösterirler. Özellikle *Fusarium* ve *Scedosporium* türleri hem kan damarları içinde üremeye eğilimli olması hem de dar açıyla birbirine eşit dallanma oluşturması nedeniyle tür identifikasyonu açısından moleküler yöntemlere gerekliliği ortaya koymaktadır. *A.terreus* dokuda hif yan duvarlarında tipik aleuroconidia sergiler, *A.niger* ise solunum yolu örneklerinde kalsiyum oksalat kristalleri bulundurarak ayırma yardımcı olur. Gomori metenamin gümüş boyası konidyum renklerini maskeleyerek de *Aspergillus* konidyumları çoğunlukla pürtüklüdür. Zigomiçetler de hiflerinin daha geniş olması, çok nadir septum içermesi, çoğunlukla çökmüş haldeki duvarlarının paralel olmayıp katlanmış halde olması ile ayrılırlar.

Aspergillus türlerinin havada da bulunması kültür sonuçlarını etkilemektedir. Fakat besiyerlerinde koloni sayısının çok oluşu ve ya aynı türün birden çok kez izole edilmesi tanı için yardımcı olabilir. Balgam, bronkoalveolar lavaj sıvısı, sinüs yıkama materyali, nekrotik lezyon biopsilerinin yanı sıra kan, idrar, BOS örneklerinde de nadiren üreyebilir. Sabouraud dextroz agarda aseksüel formda ürer. Ökaryotik protein sentez inhibitörü olan sikloheksimid, üremesini inhibe edebilir (37, 38).

Aspergillusların tür düzeyindeki tanımlanmaları koloni morfolojilerine ve tipik sporlanma özelliklerinin mikroskopik incelenmesine dayanmaktadır. İnvaziv enfeksiyonlara neden olan türlerin morfolojik karakteristik özellikleri:

A. fumigatus; (En sık insan patojeni)

Makroskopi: Mavi-yeşil ile grimsi turkuaz renkli, pamuğumsu dokuda koloniler.

Mikroskopi: Vezikülün sadece üst kısım yarısı tek sıra (uniseriat) fiyalidle kaplı, fiyalitler konidiyofor eksenine paralel dizilimli, konidiyoforlar kısa, düzgün yüzeyli, konidyumlar yuvarlak, düzgün şekilli ve dizilimleri sütun şeklinde.

A. flavus ; (İkinci en sık insan patojeni)

Makroskopi: Zeytin-küf yeşili renkli, kadifemsi dokuda koloniler.

Mikroskopi: Vezikülün tamamını kaplayan tek veya iki sıra dizilimli fiyalidler, fiyalitler ışınsal dizilimli, konidiyoforlar yüzeyleri dikensi veya pürtüklü çıkıntılı, konidyumlar yuvarlak, pürtüklü ve dizilimleri ışınsal.

A. terreus;

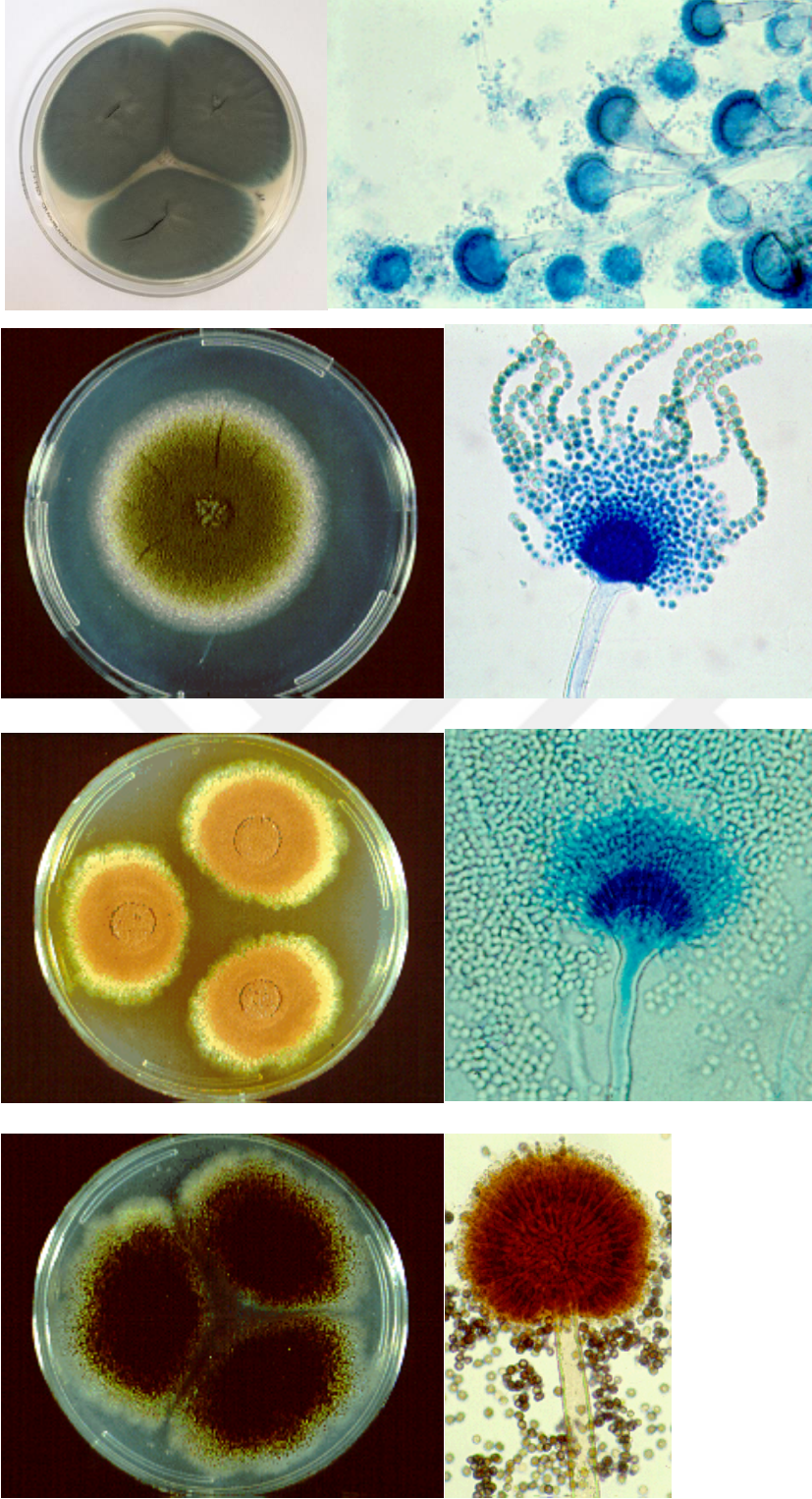
Makroskopi: Tarçın-bej renkli koloniler.

Mikroskopi: Sütunsu, üst yarısı iki sıra (biseriat) fiyalidle kaplı vezikül, konidiyoforlar kısa, konidyumlar yuvarlak, düzgün yüzeyli ve dizilimleri sütun şeklinde. Hif boyunca küresel aksesuar konidyumlar saptanır.

A. niger; (En sık otomikoz etkeni)

Makroskopi: Siyah (başta beyaz), arka yüz sarı renkli, yünümsü dokuda koloniler.

Mikroskopi: Vezikülün tamamını örten, iki sıralı fiyalidler, fiyalitler ışınsal dizilimli, konidiyofor uzun ve geniş, düzgün yüzeyli, konidyumlar yuvarlak, kalın duvarlı, ışınsal dizilimli.



Şekil 2.1. Sık görülen *Aspergillus* türlerinin kültür üremeleri ve laktofenol ile boyanma özellikleri (69).

Aspergillus türlerinde hücre duvarı polisakkarit, protein ve lipidlerden oluşmaktadır. Hücre duvarında yer alan polisakkaritler ise: β (1-3)-glukan, kitin, galaktomannan ve galaktofurandır (15). Bu yapılar hücre duvarının dayanıklılığında sorumludur (16, 37).

Aspergillus, *Fusarium*, *Scedosporium apiospermum* hifleri dokuda birbirine benzer. Yaklaşık 45 derece ile dallanıp, dalları aynı yöne doğru uzanan bölmeli hifler, damar duvarına invaze olur. Gomori metenamin gümüş boyası ile iyi boyanırlar. Periodik acid-Schiff (PAS) boyası dokuda mantar ve elemanlarının ve hücresel detayların incelenmesini sağlar. *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus*, *A. niger* gibi bazı türlerin ayrımı, monoklonal antikorlar kullanılarak, immunohistokimyasal yöntemle yapılabilir (38).

Sadece patolojik olarak aspergilloz tanısı konulması bilimsel olarak mümkün değildir. Septalı hif oluşturan hiyalen küf mantarlarının tamamı dokuda aynı görüntüyü oluşturmaktadır. Kaynakların çoğunda 45 derecelik açı ile dallanan, septalı hifler aspergilloza özgül kabul edilmektedir. Olgu bildirimlerinde üreyen bir küf mantarı olmamasına rağmen tanı aspergilloz olarak sunulmaktadır.

Kültür ve beraberinde hiflere bağlı doku invazyonunun histopatolojik olarak gösterilmesi İA için kesin tanıyı vermektedir. Fakat, biopsi trombositopeniye bağlı kanama riski nedeni ile sıklıkla mümkün olmamaktadır. Genel olarak ilk aşama tanıda serum belirteçleri, balgam/BAL örneklerinin boyaması ve kültürü gibi noninvaziv yöntemleri kullanılmaktadır.

2.6.2. Serolojik yöntemler

Serum veya diğer vücut sıvılarında *Aspergillus*'un çözünen antijenlerinin saptanması için bazı testler geliştirilmiştir. Radioimmunoassay, ELISA, biotin-avidin-linked immunosorbent assay, lateks aglütinasyon ve immunoblotting en sık kullanılan yöntemlerdir. Bazıları erken tanıya yönlendirebilecek duyarlılığa sahip olsa da çok azı ticari olarak mevcuttur. Yapılan çalışmalarda özellikle ELISA çok duyarlı ve özgül bir test olarak görülmüştür. Galaktomannan, *aspergillus* hücre duvarında bulunan bir polisakkariddir. Galaktomannan antijeni *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.nidulans*, *A.ustus* ile enfekte hastalarda saptanmıştır. Galaktomannan antijenini saptamak için geliştirilen lateks aglütinasyon testi

(Pastorex kiti - Sanofi Diagnostic Pasteur, Fransa), birçok çalışmada değerlendirilmiş ve duyarlılığı çok yüksek bulunmamıştır. Ticari olarak bulunabilen bir ELISA yöntemi ile (Platelia *Aspergillus*-BioRad, Fransa), LA testine göre galaktomannan antijenleri beş gün önce saptanabilmektedir. Bu kit lateks yöntemindeki aynı monoklonal antikoru kullanmaktadır ve daha önce saptama yapmaktadır. Aynı zamanda bronkoalveolar lavaj sıvısından da ölçüm yapılabilmektedir. Ancak, antijen serumda daha önce saptanabilmektedir. Serum ve BAL örneklerinde çalışılması FDA (US Food and Drug Administration) onayı almıştır. Her ne kadar galaktomannan antijeni İA hastalarının beyin omurilik sıvısı, idrar ve bronkoalveolar lavaj sıvısı gibi diğer vücut sıvılarında saptanabilse de, şimdiye kadar test serum için onay almıştır (70). İA riskini saptamak için haftada iki kez ölçüm yapılması önerilmektedir. Hematolojik maligniteli hastalarda antijen titrelerinin izlenmesi, antijen titre seyrinin tedaviye alınan yanıtla uygunluk gösterdiğini ortaya koymuştur. Optik dansite (OD) indeksi hesaplanarak sonuçlar değerlendirilmektedir. İlk olarak, Avrupa’da genel olarak 1-1.5 gibi yüksek OD indeks değerleri pozitiflik olarak değerlendirilirken, yapılan son çalışmalarda 0.5-0.7 gibi düşük değerlerin sonuç yorumlarken daha iyi performans gösterdiği ortaya çıkmıştır (71, 72).

Kit için FDA tarafından önerilen threshold OD indeks 0.5 olarak belirlenmiştir. 0.5 ve üzeri değerler pozitif olarak kabul edilmektedir. Bu testin en önemli sorunlarından biri yalancı pozitifliktir. Yalancı pozitiflik; *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Paecilomyces* türleri ile çapraz reaksiyon (73-75), bazı besinlerde (proteinden zengin, süt, pirinç gibi) bulunan galaktomannanın kana geçmesi, intravenöz piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulonik asit gibi bazı ilaçların kullanılması sonucu görülebilmektedir. Bu ilaçların üretiminde *Penicillium* mantarlarının kullanımı bu duruma neden olabilmektedir. Yalancı pozitiflik bu ilaçların kullanımının bırakılmasından sonra ki beş güne kadar devam edebilmektedir (76). Son yapılan çalışmalar, yeni üretilen piperasilin-tazobaktam preparatlarının bu sonuca daha nadir olarak yol açtığını belirtmektedir (77). HKHT sonrası ilk 100 günde ve kemoterapi, GVHH nedeni ile gastrointestinal mukoziti olan hastalarda yalancı pozitiflik daha sık meydana gelmektedir. Bu durumun, azalmış mukozal bütünlük nedeni ile çapraz

reaksiyona yol açacak besin ve bakterilerin ntestinal mukozaya geçişine bağlı olduğu düşünülmektedir (78). Olası diğer bir sebebin de dondurulmuş besin maddeleri paketlerinin, sodyum glukonat gibi kullanılan besin katkı maddelerinin *Aspergillus* ve *Penicillium* ile kontaminasyonu ve bunların sindirimi sonucu olabileceği bildirilmiştir (79).

Bağırsak florasında bulunan bakteriler de, serumda pozitifliğe neden olan eksojen kaynaklar arasında bulunabilir. Galaktomannan molekülünde yer alan ve ELISA testinde kullanılan EB-A2 immünglobulin (IgM) monoklonal antikorunun hedefi olan beta-1,5- bağlı galaktofuranozil zincirinin, *Bifidobacterium* başta olmak üzere belirli bakterilerde membran ilişkili bir molekül olarak da bulunduğu saptanmıştır. İnsan bağırsağında bulunduğu ve yenidoğanlarda fazlaca olduklarından, bu hastalarda bağırsak bütünlüğünün bozulmasıyla serumda pozitiflik oluşturabileceği düşünülmektedir. Antifungal ilaçların kullanımı bu antijen testlerinin duyarlılığını düşürmektedir (80).

Zygomycetes ve *Cryptococcus* türleri dışındaki *candida* ve *Pneumocystis jirovecii* gibi birçok patojen mantarın hücre duvarında bulunan 1,3-beta-D-glukan antijeninin (G-testi), serumda gösterilmesi, invaziv aspergilloz tanısı için kullanılan bir diğer tanı yöntemidir. Ancak bu test İA için özgül değildir (81). 1,3-beta-D-glukanın kendisi immünolojik olmamasına karşın, saptama sistemi proteolitik bir koagülasyon basamağına dayanır. 1,3-beta-D-glukan testiyle yalancı pozitiflik durumları ise böbrek yetmezliği olanlar, selüloz membranla hemodiyaliz uygulananlar, belirli immünglobulin ürünleriyle intravenöz tedavi edilenler, albümin kullanımı, *pseudomonas aeruginosa* gibi bakteri türlerine bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu olanlar, glukan içeren gazlı bezlerle ve benzer maddelerle temas eden kişiler veya örneklerdir. Bu durum 1,3-beta-D-glukan takibinin, tanı koyma aşamasında klinik muayene ve yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi gibi diğer tanı yöntemleriyle kombine edilmesi gerekliliğini göstermektedir (38, 82).

2.6.3. Moleküler yöntemler

İA tanısında antikorların gösterilmesindeki sınırlılık, yüksek mortalite nedeniyle hızlı tanının önemi, araştırmaları moleküler yöntemlere yönlendirmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *A.fumigatus*, özgül primerlerle uygun örneklerden 8 saat içinde tanımlanmıştır. Bu tekniğin uluslararası standardizasyonunun yokluğu, kullanılmasını engellemektedir. Düzenli ve ardışık PZR testinin, İA erken tanısında güvenilir olduğu, birbirini izleyen birkaç örnekte negatif sonuç alınan hastalarda, İA gelişmediği gözlenmiştir. Fakat, günümüze kadar yapılmış PZR çalışmalarındaki hedef bölge seçimi, kit, method ve hasta seçimindeki farklılıklara bağlı olarak heterojen sonuçların varlığı genelleme yapılmasını önlemektedir (83).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP), finger printing, random amplification of polymorphic DNA (RAPD) gibi yöntemler *Aspergillus*'un epidemiyolojik tanı ve tiplendirme çalışmalarında kullanılmaktadır (84).

2.6.4. Mantar metabolitlerinin gösterilmesi

Bağışık yanıtı bağlı olmaksızın, hastaların vücut sıvılarında ve dokuda yüksek düzeyde D-mannitol bulunması, İA ile uyumlu bulunmaktadır. Gaz likit kromatografi ve kütle spektroskopisi gibi yöntemler gibi testlere ölçülmesi, uygulanmasını sınırlamaktadır. BAL sıvısında oksalit asit saptanması, aspergilloz için ön bulgu olarak önerilmektedir. *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu metalloproteaz, fosfolipaz gibi enzimlerin, mannitol ve gliotoksin gibi metabolizma ürünlerinin gösterilmesi, İA tanısı için yardımcı olabilir (38).

2.6.5. Yeni geliştirilen kitler

Yeni jenerasyon monoklonal antikorlardan JF5, immunglobulin altgrup-3 yapısında bir sıçan immünglobulinidir. Yüksek oranda *Aspergillus* türüne spesifik, *Candida*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Scedosporium* ve mukormikoz etkenlerini de içeren klinik olarak ilgili geniş bir yelpazedeki birçok mantar ile ve yine diğer serolojik yöntemlerin aksine piperasilin/tazobaktam ya da istirahat halindeki küf sporları ile çapraz reaksiyon vermemektedir. JF5, *aspergillus* türlerinin akut fazda aktif üremesi sırasında salgıladıkları hücre dışı bir glikoprotein antijenini (α 1-3-

α 1-6-bağılı mannoprotein) saptamaktadır. Bu sayede invaziv küf infeksiyonunu aktif olmayan mevcut sporlardan ayırabilmektedir. Bu monoklonal antikor; serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısındaki *Aspergillus* mannoproteinlerinin hızlı tespiti için bir immünokromatografik lateral-akış yöntemi ile kombine edilerek bir kit oluşturulmuştur. Bu yöntem, en ünlü olarak bilinen evde uygulanan gebelik testi ayrıca virüs, bakteri ve toksinlerinin tespitinde de kullanılan lateral-akım teknolojisidir (85, 86).

Diğer bir teknoloji de ısı kaynaklı desorpsiyon – gas kromatografi/ kütle spektrometri yöntemini kullanarak insan nefesinden sekonder metabolitlerin tespitidir. Sonuçlar umut verici olsa da her iki kitin performansını belirlemek için daha çok çalışma gerektiği belirtilmektedir (87).

2.7. Tedavi ve Önlem

Aspergillozis tedavisinde kullanılan polien, azol ve ekinokandinler olmak üzere üç grup antifungal ajan yer almaktadır. Uygun tedavi seçiminde konağın immün durumu, organ fonksiyonu (karaciğer ve böbrek) ve önceki uygulanan terapiler göz önünde bulundurulmalıdır.

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (The Infectious Diseases Society of America - IDSA) 2008’de IA tedavisi için bir kılavuz yayınlamıştır. Amerikan toraks derneği (The American Thoracic Society - ATS) de 2011’de yetişkin akciğer ve yoğun bakım hastalarında fungal enfeksiyonların tedavisi için kılavuz yayınlamıştır. Her iki kılavuz da benzer öneriler de bulunmakta ve birçok hastada tedavide vorikonazolün IA’nın ilk tedavi seçeneği olduğunu belirtmektedir (88). Kültür, galaktomannan antijen veya histopatoloji ile IA tanısı doğrulanmış hastalarda ve vorikonazol ile monoterapiye yanıt vermeyen hastalarda kurtarma terapisi olarak yeni öneriler arasında vorikonazol ve ekinokandin kombinasyonu yer almaktadır (89).

Vorikonazole ciddi reaksiyon gösteren intoleran hastalarda diğer seçenekler arasında amfoterisin B (ticari formlar; AmBisome or Abelcet) veya Mart 2015’de (US Food and Drug Administration-FDA) Amerikan gıda ve ilaç yönetimi tarafından onay alan isavuconazol yer almaktadır. Hangi ajanın seçileceğini organ fonksiyonu, toksisite ve tolerans belirlemektedir. Ciddi hepatotoksitesi olan

azoller veya diğer ajanlarla ilaç etkileşimi meydana gelen hastalarda tedavi lipid formdaki amfoterisin ile değiştirilmektedir. Her ne kadar isavukonazol ile yeterli deneyim bulunmasa da, böbrek disfonksiyonu olan ve içeriğindeki siklodekstrine bağlı olarak damar yoluyla vorikonazol tedavisi alamayacak hastalarda, vorikonazol ve lipid formdaki amfoterisin yerine isavukonazol önerilmektedir. Erken dönem kullanımda vorikonazole bağlı nörolojik ve görsel toksisiteler olsa da bu durum sıklıkla geçici olmaktadır ve tedavi değişimi kalıcı, özellikle de ciddi semptomlar varlığında gerçekleştirilmektedir. Eğer invaziv küf enfeksiyonu şüphesi varsa yakın zamanda başlanan vorikonazol tedavisine ek olarak mukor grubundaki intrensek vorikonazol direnci göz önünde bulundurularak tedaviye amfoterisin de eklenmelidir (90).

Unutulmaması gereken bir nokta da vorikonazolün diğer kemoterapi ilaçları ile etkileşimi, toksisitelerini arttırması (ör; vinkristine bağlı nörotoksosite) veya sitotoksik ilaçların etkisini azaltmasıdır. Bazı *Aspergillus* türlerinin (ör; *A. Terreus*) amfoterisin için yüksek MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri) değerlerine sahip olmasını tedavi başlangıcında göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Monoterapiye yanıt vermeyen hastalarda kurtarma terapisi olarak vorikonazol veya lipozomal amfoterisine ek olarak caspofungin, mikafungin veya anidulafungin gibi ekinokandinler kombine edilebilmektedir. Genel olarak tedavi başarısızlığı ilaç başarısızlığından çok immünolojik yetmezliğe bağlı olmaktadır.

İlaçların doz, etki ve yan etkileri

Triazollerden flukonazolün *Aspergillus* türlerine karşı etkinliği yoktur ve itrakonazol aspergillozide vorikonazolden sonra ikinci basamak tedavi ajanı olarak bilinmektedir. Posakonazol, mukokutanöz kandidiazis tedavisi ve nötropenik hastalarda invaziv fungal enfeksiyonların profilaksisinde kullanılmak üzere FDA onayı alan geniş spektrumlu bir antifungal ajandır. Posakonazol, ilk olarak 2013’de oral süspansiyonu ile yaygınlaşmış fakat daha sonra geç salınlımlı tabletleri geliştirilmiştir. Son olarak 2014 yılında damar yolu ile kullanılan formu geliştirilmiştir. En yaygın yan etkileri gastrointestinal rahatsızlıklardır (91).

Vorikonazolün hem damar yolu hem oral yolla alınabilen formları mevcuttur. Önerilen doz birinci gün 6 mg/kg damar yoluyla her 12 saatte bir, takip eden günlerde 4 mg/kg damar yoluyla her 12 saatte bir olacak şeklindedir. Güncel olarak önerilen oral doz olan her 12 saatte bir 200 mg'dır. Fakat bu dozun serum ilaç konsantrasyonunun çok düşük hatta ölçülemez düzeyde kaldığı not edilmiştir. Tablonun ilerlediği olgularda doz oral olarak her 12 saatte bir 4 mg/kg veya her 12 saatte bir 300 mg olarak arttırılabilir. Tedavinin ilk günlerinde serum vorikonazol konsantrasyonu takibi ve serum konsantrasyonunun >1 mcg/mL ve <5.5 mcg/mL aralığında tutulması önerilmektedir. Vorikonazol ilaç etkileşimleri, görsel değişiklikler, halüsinasyonlar, uzamış QT aralığı, nöropati, hafıza ve konsantrasyon problemleri, alopesi, ağız lezyonları, fotosensitivite, skuamöz hücre karsinomuna kadar uzanan cilt lezyonlarına yol açabilmektedir (92-94).

Kasprofungin, standart terapiyi tolere edemeyen veya direnç gösteren İA hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almışken, mikafungin ve anidulafungin İA tedavisi için henüz FDA onayı almamıştır. Fakat bütün ekinokandinler *Aspergillus* türlerine karşı etkilidir ve eşit etkinliğe sahiptir (95). Ekinokandinler, İA ilk basamak tedavisinde değil de kombinasyon terapisi olarak kullanılmaktadırlar. Ekinokandinlerin sadece damar yolu ile uygulanan formu bulunmaktadır. Böbrek yetersizliği, hemodiyaliz, hemofiltrasyon uygulanan hastalarda doz ayarı gerekmemektedir. Casprofungin için önerilen doz, 1.gün 70 mg/kg yükleme dozu ardından günlük 50 mg/kg veya yetersiz ise 70 mg/kg'dır. Mikafungin için yükleme dozu gerekmeden günlük 100-150 mg/kg'dır. Anidulafungin için 1. gün 200 mg/kg yükleme dozu ardından günlük 100 mg/kg'dır. Ekinokandinler iyi tolere edilebilir ve diğer sistemik antifungal ilaçlara göre daha az yan etkiye sahiptirler. Asemptomatik aminotransferaz ve alkalin fosfataz düzeylerinde artış ekinokandinlere bağlı en sık rapor edilen anomal bulgudur (96).

Amfoterisin B lipid formülasyonları; Lipozomal amfoterisin B (AmBisome), Amfoterisin B lipid kompleks (ABLC, Abelcet), Amfoterisin B kolestril sülfat kompleks (amphotericin B colloidal dispersion, ABCD, Amphotec) dir. Lipid formülasyonların asıl avantajı, büyük dozlarda bile daha az toksisite

yaratmasıdır. Amfoterisin B lipid kompleks ve lipozomal amfoterisin B, amfoterisin B deoksikolata göre daha az infüzyon bağımlı yan etkilere yol açarken ABCD, amfoterisin B deoksikolat ile benzer reaksiyonlar yaratmaktadır. Lipozomal amfoterisin B (AmBisome) için önerilen doz damar yoluyla günlük 3-5 mg/kg iken, amfoterisin B lipid kompleks (Abelcet, ABLC) için damar yoluyla günlük 5 mg/kg'dır. Amfoterisin'in lipid formülasyonları, amfoterisin B deoksikolata göre daha az nefrotoksisiteye neden olmaktadır. İnfüzyon bağımlı reaksiyonlar ve elektrolit anormallikleri diğer var olan yan etkileridir.

İsavukonazol için yükleme dozu ilk 48 saat her 8 saatte bir 200 mg oral yolla 2 kapsül veya damar yolu ile olacak şekildedir. Takiben günde bir 200 mg oral veya damar yoluyla olacak şekildedir. İsavukonazol, isavukonazonyum sülfatın ön ilacı olarak üretilmiştir. En yaygın yan etkiler; bulantı, kusma, diare, baş ağrısı, karaciğer enzimlerinde yükselme, hipokalemi, kabızlık, dispne, öksürük, periferik ödem ve sırt ağrısıdır. Bunların yanında hepatotoksisite, infüzyon reaksiyonları ve ciddi alerjik deri reaksiyonlarına da yol açabilmektedir. Ailesel kısa QT sendromu olan vakalarda kullanımı kontrendikedir (97).

Antifungal terapinin süresi, enfeksiyonun lokalizasyonu, hastanın altta yatan hastalığı, ileri dönem immünsüpresyon ihtiyacı ve tedaviye yanıt durumuna bağlı olmaktadır. Tedavi, enfeksiyonun bütün belirti ve bulguları (ör; radyografik anormallikler) gerileyene kadar devam edebilmektedir. İmmün yetmezliği devam eden hastalarda aylar, hatta yıllar boyunca sürebilmektedir.

Kombinasyon terapileri

Kombinasyon terapileri (vorikonazol ve ekinokandin, lipozomal amfoterisin B ve ekinokandin) hem ilk aşama tedavide hem de vorikonazol veya lipozomal amfoterisin monoterapisine yanıt vermeyen hastalarda uygulanan kurtarma tedavisinde söz konusu olabilmektedir. Mevcut çalışmalarındaki sonuçlar değişkenlik göstermekte ve daha çok karşılaştırmalı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Amfoterisin B ve azol kombinasyonu üzerine hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, triazollerin amfoterisin ile beraber veya ardışık kullanımlarında antagonist etki ortaya çıktığını desteklemektedir. Bu durumu açıklayan

mekanizmalardan biri ergosterol sentez yolundaki azol inhibisyonuna bağlı olarak amfoterisinin mantar membranlarına bağlanmasıdaki azalmadır. Bir diğeri de, azolün hücre membranında birikmesine bağlı olarak amfoterisinin ergosterole bağlanmasıyla yarışmalı inhibe olması olarak açıklanmaktadır (98).

Antifungal direnç

Bazı *Aspergillus* türlerinde, antifungal ilaçlara duyarlılıklarda değişkenlik mevcuttur. *Aspergillus terreus* amfoterisine invitro olarak daha az duyarlıdır, klinik çalışmalarda da vorikonazol gibi alternatif ilaçların tercih edilmesi önerilmektedir. *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus lentulus* amfoterisin ve vorikonazol dahil birçok ilaca karşı yüksek oranda direnç göstermektedir. *A. fumigatus* izolatlarında da çoklu azol direnci bazı Avrupa ülkelerinde rapor edilmiştir (99, 100). 98 nolu kodonda lösin yerine histidin değişikliği, eş zamanlı promotor gen bölgesindeki tekrar sonucu itrakonazole direnç meydana gelmekte ve vorikonazol, posakonazol minimum inhibitör konsantrasyonunda artış olmaktadır. Hollanda’da yapılan bir sörveyans çalışmasında klinik ve çevre örneklemelerinde *A.fumigatus*’da TR₄₆/Y121F/T289A mutasyonu ve yeni cyp51A aracılı mutasyon sonucu yüksek düzey vorikonazol direnci saptanmıştır (101). Bu durumun olası sebebi olarak o bölgelerde tarımda yaygın bir biçimde triazol fungisidlerinin kullanımı olduğu düşünölmektedir (102). Günümüzde, *A.fumigatus* ilaç direnç epidemiyolojisi yeterli değerlendirme bulunmamakta, azol monoterapisine karşı direncin araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

İmmünmodölasyon

İA tedavisinde ek bir antifungal terapi olarak mümkün olduğu zaman immünsüpresyon derecesi azaltılabilmelidir (103). En kötü sonuçlar persiste ve ciddi immün disfonksiyon ve antifungal yönetimini kısıtlayan organ disfonksiyonlarında ortaya çıkmaktadır.

Koloni-stimölant faktörlerin nötrofilin doğal fungisidal kapasitesini artırıcı bir etkiye sahip olduğunu destekleyen bir kanıt olmasa da, yapılan invitro bir çalışma granölisit koloni-stimölant faktör ve interferon-gamanın nötrofilin oksidatif patlamasını ve *Aspergillus* hifa hasarını artırdığını göstermiştir.

Granülosit transfüzyonunun İA ve nötropenili hastaların üzerindeki etkisi ile ilgili olarak da çok az veri bulunmaktadır (104).

Cerrahinin yeri

Cerrahi, İA hastalarında nekrotik doku debritleme ve enfekte dokunun ortadan kaldırılması için kullanılabilen, fakat kısıtlı vakalarda yararlı olmaktadır. Cerrahinin gerekip gerekmediğinin kararını vermede lezyonun lokalizasyonu, yaygınlığı, gerekli olan rezeksiyonun derecesi, komorbidite, hastanın cerrahiye tolere edebilirliği, kemoterapideki gecikmenin potansiyel etkileri, küratif veya palyatif antineoplastik terapi amacı gibi faktörler etkili olmaktadır. Örneğin; nötropenik hastalardaki trombositopeni komplike olabileceği için cerrahiye imkansız kılacaktır. *Aspergillus* rinosinüzitinde debritleme ek tedavi seçenekleri arasında bulunmaktadır. Bazı hastalarda radikal veya tekrarlı cerrahi gerekliliği olmaktadır. Cerrahi gerekliliğini tanı sırasındaki kemik invazyon derecesi de belirleyebilmektedir. Nekroz derecesinin büyüklüğü antifungal aktiviteyi baskılamak ve olası damar invazyonu riskini ortaya koymaktadır. Olası invazyon örnekleri; pulmoner lezyonun komşuluğundan veya damar yolu yayılımı ile endokardit, nekrotik cilt lezyonları, perikardiyal enfeksiyon, ampiyem, göğüs duvarı invazyonu, enfekte prostetik kapak ve osteomyelittir (103).

Pulmoner kavitenin cerrahi eksizyonu özellikle tek bir pulmoner lezyonu, tekrarlayan hemoptizi ve bakteriyel süperenfeksiyonu olan hastalarda uygulanmaktadır. Bununla birlikte, cerrahiye bağlı mantarın plevral kaviteye yayılımı da söz konusu olabilir. Serebral lezyonları olan hastalarda mevcut antifungal tedavi yeterli olmakta, cerrahi gerekmemektedir (105-106).

Önlem ve erken tedavi

İA'da sağkalım oranlarını nötropeni süresi, glukokortikoid dozu, karaciğer ve böbrek fonksiyonu, enfeksiyon bölgesi ve genişliği gibi faktörler belirlemektedir. Gerek febril nötropenili hastalarda empirik tedavi, gerekse galaktomannan gibi tarama testlerini sonuçlarına bağlı preemptif tedavi profilaktik stratejiler arasında bulunmaktadır (107).

Primer profilaksi: AML'e bağlı tedavi gören hastalarda aspergillozisi önlemede posakonazol kullanımı flukonazol ve itrakonazole göre daha etkilidir. Ciddi GVHD olan allojenik HKHT alıcılarında da flukonazol daha etkilidir. Uzamış nötropenisi olan hematolojik maligniteli hastalarda amfoterisinin inhale formlarının kullanımının aspergillozis insidansını azalttığı görülmüştür (108).

Empirik tedavi: Empirik tedavi, nötropeni periyodundaki febril hastalarda invaziv fungal enfeksiyonu nleme amaçlı uygulanan antifungal tedaviyi içermektedir. Azol profilaksisinden oluşan empirik tedavi persistan ateşi olan hastalarda standart bir uygulama haline gelmiştir (109).

Preemptif tedavi: Preemptif terapi, empirik tedaviye alternatif olarak geliştirilen erken tedavi stratejisidir. Aspergillozis için yapılan ardışık taramaların sonucuna dayanarak başlanan antifungal terapiyi içermektedir.

Relapsın nlenmesi için sekonder profilaksi

Antifungal tedavisi tamamlanan hastalar nötropeni tekrar ettiği takdirde aspergillozis reaktivasyonu açısından risk altındadırlar. HKHT veya kemoterapi alan yüksek relaps riski altındaki hastalarda sekonder profilaksi gerekmektedir. Sekonder profilaksi, artmış relaps riski sırasında antifungal terapinin tekrar başlatılmasıdır. Relaps aspergillozis önlenmesinde vorikonazol kullanılmaktadır (110). Relaps İA patogenezi olarak tamamen eradike edilememiş latent, subklinik enfeksiyonun reaktivasyonu olduğu dşnlmektedir. Bu durum, organizmanın anjioinvaziv özelliğine veya zayıf ilaç penetrasyonuna (r; yabancı cisim, vejetasyonlar, akciğer veya kemik sekestrasyonları) bağlı bölgenin temizlenememesine sekonder olabilmektedir. Enfeksiyon bölgesi (r; sinüsler), sistemik kortikosteroid kullanımı, altta yatan hematolojik maligniteye bağlı remisyon eksikliği, nötropeni süresi ve uyumsuz HKHT alıcısı olma gibi faktörler İA relapsına sebep olabilen etkenlerdir (111). Toll-like reseptör-4, dectin-1, mannoz-bağlayıcı lektin kodlayan genlerdeki polimorfizm gibi doğal immün sistemdeki varyasyonlar sonucu da devam eden hastalık riskine bağlı reinfeksiyon karşımıza çıkabilmektedirler.

Önemde genel olarak unutulmaması gereken diğer noktalar da; Riskli hastaların bulunduğu servislerde düzenli hava örnekleme yapılması, inşaat alanlarının izole edilmesi, Hastane binaları inşaatı yapılırken pencere olmaması, riskli ünitelerde HEPA filtreler bulunması, riskli ünitelerin hastanenin giriş veya girişe yakın katlarına değil, daha üst katlarına kurulması, hasta odalarında bulunan HEPA filtrelerinin etkinlik açısından belirli aralıklarla kontrol edilmesi, hastane enfeksiyon kontrol komitelerinin bu konuda dikkatli davranması ve bölümler arasında korelasyon kurulması basitçe yapılabilecek diğer önlemler arasında yer almaktadır (38).

Prognostik faktörler

İA, özellikle HKHT sonrasındaki immünsüprese hastalardaki en önemli ölüm nedenidir. Konak faktörleri, altta yatan hastalık, beyin tutulumu, inatçı ve ciddi nötropeni, glukokortikoid kullanımı, insan lökosit antijeni uyumsuz kök hücre alımı ve kontrolsüz GVHD sağ kalımı etkileyen faktörlerdendir. Tanıdaki gecikme sağ kalım oranlarını kötüleştirmektedir. Transplantasyon öncesi akciğer fonksiyonu, karaciğer ve böbrek fonksiyonları da daha önce belirtildiği gibi sağ kalımı etkilemektedir. Serum galaktomannan taramasının da tanısal değerinin yanında prognostik değeri bulunmaktadır (46, 112, 113).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 18.09.2013 tarihinde, 70904504 sayılı 130 karar no ile onaylanmıştır. Proje çalışması, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Hastalar ve Örnekler

Ocak 2015 - Ocak 2016 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisi ve Yetişkin Kök Hücre Transplantasyon Ünitesinde takip edilen febril nötropenik, fizik muayene ile ateş nedeni olabilecek yeni odak saptanmamış, ampirik anti bakteriyel tedaviye beş gün içinde yanıt alınamayan hastalar, İA açısından riskli grup kabul edilerek çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan nötropenik oldukları dönemde ateş yükselmeye başladığında ve ateş devam ettiği sürece haftada iki kez olmak üzere periferik kan örnekleri toplandı. Nötrofil sayısının $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olması nötropeni ($0,5 \times 10^9/\text{L}$), $100/\text{mm}^3$ 'ün altında olması derin nötropeni olarak tanımlandı. Nötropenik bir hastada ateşin bir kere $38,3^\circ\text{C}$ 'nin üzerine çıkması ya da 1 saat süreyle 38°C ya da üzerinde ateş olması olarak tanımlandı. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler, İA için risk faktörü olan altta yatan hastalıkları, uygulanan kemoterapi rejimleri, antibakteriyel, antifungal profilaksi ve empirik tedavileri, kök hücre nakli varlığı gibi veriler sorgulandı. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları izlendi. Klinik örneklerindeki üremeler ve görüntüleme yöntemleriyle elde edilen sonuçlar kaydedildi. Hasta izlemi çalışma boyunca hastaların taburculuk, sevk veya eksitus durumlarına kadar sürdürüldü (Ek 1).

Hastalardan alınan kan örnekleri serumlarına ayrıştırılarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında İA tanısında yararlanılan serolojik testlerden olan galaktomannan antijen testi uygulandıktan sonra ticari bir kit ile PZR testi uygulanmak üzere -80°C 'de saklandı. Takiplerde,

EORTC/MSG'nin konak, klinik ve mikrobiyolojik faktörler ya da bulgular göz önüne alınarak yayınladığı 2008 revize kriterlere göre kanıtlanmış (proven), olası (probable) veya şüpheli (possible) İA olmak üzere epizodlar gruplara ayrılarak değerlendirildi. Bu sınıflamaya girmeyen ve İA açısından risk faktörü taşıyanlar ise İA açısından riskli olarak tanımlandı.

3.3. Galaktomannan Antijen Arama

Platelia *Aspergillus* kiti (Platelia *Aspergillus*; Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) serumda GM'ı saptayabilen tek basamaklı sandviç immüno enzimatik katı faz yöntemidir. İlk olarak 1999'da piyasaya sürülmüş, 2003'de serum örneklerinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Testte, sıçan anti-galaktomannan monoklonal antikorları ELISA çukurlarında kaplanmış olarak bulunmaktadır.

Testin uygulanışı

1. ELISA plağı (Monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklar) alüminyum folyo kaplı paketinden çıkarılıp oda ısısında 15-20 dakika bekletildi.
2. Konsantre yıkama solüsyonu (Tris NaCl pH 7.4 buffer, %2 Tween 20) distile su ile 20 kat sulandırılmaktadır.
3. Kontrol serumları (negatif kontrol, eşik değer ve pozitif kontrol serumları) 1 ml steril distile su ile sulandırılıp iyice karıştırılmakta ve serum ile eş zamanlı hazırlanmaktadır.
4. Konjugat (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikorları), serum işleme solüsyonu (EDTA asit solüsyonu), kromojen substrat solüsyonu (<%0.1 Tetrametilbenzidin-TMB, <%0.1 hidrojen peroksit) ve reaksiyonu durdurma solüsyonu 1 N sülfürik asit içerir, kullanıma hazır bulunmaktadır.
5. Steril 1.5 ml eppendorf tüpüne 300 µl serum ve 100 µl serum işleme solüsyonu (EDTA) konuldu. İyice karıştırılıp, termal blokta 120°C'de 6 dakika bekletildi.

(Bu aşamada serum içindeki immün kompleksleri ayırmak, test ile etkileşebilecek serum proteinlerini çöktürmek için serum işleme solüsyonu (EDTA asit solüsyonu) ile birlikte serumlar ısıtılır.)

6. 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı bölüm çalışıldı.
7. Aynı işlemler kontrol serumları için de yapıldı.
8. ELISA plağında hasta örneklerinden sonra sırasıyla ilk kuyucuk negatif, ikinci ve üçüncü kuyucuklar eşik değer ve dördüncü ve son kuyucuk da pozitif kontrol olarak kullanıldı.
9. Serumların üstteki sıvı bölümünden 50 µl ve konjugatdan (peroksidaz ile bağlı anti-galaktomannan monoklonal antikorları) 50 µl kuyucuklara kondu.
10. Aynı şekilde kontrol çukurlarına da 50 µl kontrol serumları ve konjugat konuldu.
11. ELISA plağının üzeri yapışkan film ile kaplandı.
12. 37°C’lik etüvde 90 dakika inkübe edildi.
13. ELISA plağından yapıştırıcı film çıkarılıp yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.
14. ELISA plağında yıkama solüsyonun kalmamasına dikkat edildi.
15. Hızlı bir şekilde ve direkt ışıktan korunarak kromojen substrat (tetramethylbenzidin) solüsyonundan 200 µl eklendi (Bu aşamada substrat kompleks ile reaksiyon vererek mavi renk oluşur).
16. Karanlık bir alanda oda ısısında 30 dakika bekletildi.
17. Her çukura eş zamanlı olarak 100 µl reaksiyon durdurma solüsyonundan (1 N sülfürik asit) eklendi (Bu aşamada mavi renk sarı renge döner).
18. Son olarak da 30 dakika içinde 450/620 nanometre dalga boyunda optik okuyucuda sonuçlar okundu.

Testin değerlendirilmesi

- Cut-off değeri, eşik değer kontrol serumlarının ortalama optik dansitesi olarak belirlendi.
- Testi geçerli saymak için validasyon kriterlerinin gerçekleşip gerçekleşmediğine bakıldı. Cut-off kontrol yani eşik değer kontrol

serumlarının her birinin optik dansitelerinin ≥ 0.300 ve ≤ 0.800 arasında olmalı. Pozitif kontrol serumunun optik dansitesi / Cut-off ortalama optik dansitesi > 1.50 olmalı, negatif kontrol serumunun optik dansitesi / Cut-off ortalama optik dansitesi < 0.40 olmalı.

- Her serum için indeks hesaplandı.

İndeks = Örnek optik dansitesi / Cut-off ortalama optik dansitesi.

İndeks < 0.5 ise negatif olarak değerlendirildi.

İndeks ≥ 0.5 ise pozitif indeks olarak değerlendirildi.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.4.1. Ticari kit ile DNA izolasyonu

Qiagen firmasına ait Qiaamp DNA Mini kit DNA izolasyonu için kullanılmıştır. DNA izolasyonu minimal modifikasyonla kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Her ekstraksiyon aşamasına bir negatif kontrol eklenerek yapıldı.

Ekstraksiyon yöntemi

1. Isı bloğu 56°C 'ye ayarlandı. Örnek sayısı kadar eppendorf, gruplar halinde numaralandırıldı. Çalışma adedi kadar spin kolon çıkarıldı. Yıkama solüsyonu 1 (AW-1)'a 160 ml etanol, yıkama solüsyonu 2 (AW-2)'ye 125 ml etanol eklenerek, hazır hale getirildi ve kapakları işaretlendi. Örnekler vortekslenerek ön hazırlık tamamlandı.
2. 1.5 ml'lik kapaklı eppendorflara 20'şer μl proteinaz K, 200'er μl serum örneği eklendi ve pipetaj yaparak miks edildi (400 μl serum örneği için 40 μl proteinaz K).
3. Her birinin üzerine 200'er μl AL Buffer (Lizis Buffer) eklendi ve vortekslendi (400 μl serum örneği için 400 μl AL Buffer).
4. 56°C 'de ısı bloğunda 10 dakika bekletildi. Bu arada spin kolon tüpleri hazırlandı.
5. Isı bloğundan alınan örneklerin üzerlerine etanoldan 200 μl ilave edildi ve vortekslendi (400 μl serum örneği için 400 μl etanol).
6. Bütün sıvı spin kolon tüplerine alındıktan sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu sırada 2 ml'lik boş toplama tüpleri dizildi.

7. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
8. 500'er µl AW-1 buffer spin kolonların filtre kısımlarına eklenip, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu sırada yeni 2 ml'lik boş toplama tüpleri dizildi.
9. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
10. 500'er µl AW-2 buffer spin kolonların filtre kısımlarına eklenip, 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu sırada yeni 2 ml'lik boş toplama tüpleri dizildi.
11. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
12. Tüm toplama tüpleri, 13.000 rpm'de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi. Bu sırada yeni 1.5 ml'lik kapaklı boş eppendorflar dizildi.
13. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler eppendorflara yerleştirildi.
14. 60'ar µl Elüsyon Buffer (Buffer AE) spin kolonların filtre kısımlarına eklenip 2 dakika kadar oda ısısında bekletildi.
15. Tüm eppendorflar, kapakları iç tarafa gelecek şekilde santrifüje dizilerek, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Santrifüj sonrası bu kez üst kısımdaki filtreler atılıp, alt kısımdaki DNA ekstraktını içeren eppendorfların ağzıları kapatıldı.
17. Elde edilen tüm DNA ekstraktları PZR uygulanana kadar porsiyonlara ayrılarak PZR testi çalışılana kadar -80°C'de saklandı.

3.4.2. Artus Qiagen *Aspergillus* diff RG PZR testi

Artus *Aspergillus* RG PZR, *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.terreus* türlerine spesifik, bu türlerin 110 baz çifti genişliğindeki bölgelerin amplifikasyonu ile RotorGeneQ (Qiagen) platformu için tasarlanmış Ocak 2013'de piyasaya sürülen kalitatif, multipleks saptama yapan ticari bir kittir.

Kit içeriği:

Mavi tüp (2x190 µl)	<i>Aspergillus</i> diff. RG Master
Sarı tüp (200 µl)	<i>Aspergillus</i> diff. RG Mg-Sol
Kırmızı tüp (200 µl)	<i>Aspergillus</i> diff. RG Pozitif Kontrol
Yeşil tüp (1000 µl)	<i>Aspergillus</i> diff. RG internal kontrol
Beyaz tüp (1000 µl)	Su (PZR grade)

Testin uygulanışı

1. Ekstrakte edilen DNA'lar ve pozitif kontrol tüpü kirli oda içerisinde oda ısısına çıkarıldı (tüm işlemler biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirildi).
2. Temiz oda içerisinde negatif kontrol için bir adet, test edilecek örnek başına birer ve pozitif kontrol için bir adet steril 0,2 ml'lik kapaklı PZR tüpü soğutucu blok üzerine yerleştirildi (Bu kit ile yapılan her PZR çalışmamız için iki ayrı negatif kontrol ve iki ayrı pozitif kontrol kullanıldı).
3. Her bir örnek için mavi tüpten 14.5 µl master, sarı tüpten 0.5 µl Mg, yeşil tüpten 1 µl internal kontrol eklenecek şekilde önce 1,5 ml'lik eppendorf tüpünde master miks hazırlandı, vortekslenip sonra spin santrifüj uygulandı.
4. Bu karışımdan 15'er µl, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,2 ml'lik kapaklı PZR tüplerine dağıtıldı.
5. Soğutucu blok üzerindeki ilk sıradaki PZR tüpüne önce negatif kontrol içeren beyaz tüp'den ilave edilip kapağı kapatıldı. Ardından sıradaki tüplere 10'ar µl ekstrakt ilave edildi ve kapakları kapatıldı. Son sıradaki PZR tüpüne de pozitif kontrol içeren kırmızı tüp'den 10 µl ilave edilip kapağı kapatıldı.
6. Kalan reaksiyon karışımı gerekirse daha sonra kullanım için -20°C'de donduruldu.
7. Tüpleri cihaza yüklemekten önce bir çalışma protokolü oluşturuldu.
8. Çalışmayı başlatmadan önce örnekler için tanımlama parametreleri girildi.

9. Örneklerdeki nükleik asit aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.
 - a. 95°C 10 dakika (denatürasyon) 1 siklus
 - b. 95°C 15 saniye
 - c. 65°C 30 saniye
 - d. 72°C 20 saniye
 } 45 siklus
10. Cihaza örnekler yerleştirildi, kapağı kapatıldı ve çalışma başlatıldı.
11. Amplifikasyon işlemi, sinyallerin saptanması ve yorumlanması RotorGeneQ cihazı ile yapıldı.
12. Oluşan flüoresan eğrileri RotorGeneQ software 2.0 ile değerlendirildi (eşik değeri 0.05 kabul edildi).
13. Sonuçların değerlendirilmesi, Tablo 3.1’de yer alan kriterlere göre yapıldı.

Tablo 3.1. Artus Qiagen *Aspergillus* real-time PZR sonuçlarının yorumlanması.

Yeşil kanal	Turuncu kanal	Kırmızı kanal	Sarı kanal (internal kontrol)	Sonuç
+	-	-	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>
-	+	-	+	<i>Aspergillus terreus</i>
-	-	+	+	<i>Aspergillus flavus</i>
-	-	-	+	Spesifik DNA saptanmadı
-	-	-	-	Geçersiz sonuç

3.4.3. MycAssay (Myconostica) *Aspergillus* real-time PZR testi

Myconostica MycAssay *Aspergillus* genomlarının moleküler boncuk teknolojisi ile *Aspergillus*’a özgül fakat tür spesifik olmayan (*A.fumigatus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.flavus* gibi çeşitli türler), ribozomal 18S gen bölgesini hedefleyen kalitatif saptama yapan ticari bir kittedir.

Kit içeriği

<u>Tüp 1 (66µl):</u>	dNTP MgCl ₂ DNA polimeraz kompleksi
<u>Tüp 2 (66µl):</u>	<0.01% Primerler <0.01% Molecular Beacon <0.0001% İnternal amplifikasyon kontrol (rekombinant plazmid DNA içerir)
<u>Tüp 3 (25µl):</u>	Negatif kontrol, Su
<u>Tüp 4 (25µl):</u>	Pozitif kontrol, <0,0001 pozitif kontrol DNA (<i>Aspergillus</i> hedef sekansı içeren rekombinant Plazmid) Tris HCl buffer

Testin yapılışı

1. Ekstrakte edilen DNA'lar ve pozitif kontrol tüpü kirli oda içerisinde oda ısısına çıkarıldı (tüm işlemler biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirildi).
2. Temiz oda içerisinde negatif kontrol için bir adet, test edilecek örnek başına birer ve pozitif kontrol için bir adet steril 0,2 ml'lik kapaklı PZR tüpü soğutucu blok üzerine yerleştirildi.
(Bu kit ile yapılan her PZR çalışmamız için iki ayrı negatif kontrol ve iki ayrı pozitif kontrol kullanıldı).
3. Tüp 1 ve tüp 2'deki içerik 1,5 ml'lik eppendorf tüpünde eşit miktarda birleştirilerek elde edilen karışım önce vortekslendi, sonra da spin santrifüj uygulandı.
4. Bu karışımdan 15'er µl, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,2 ml'lik kapaklı PZR tüplerine dağıtıldı.
5. Soğutucu blok üzerindeki ilk sıradaki PZR tüpüne önce negatif kontrol içeren Tüp 3'den ilave edilip kapağı kapatıldı. Ardından sıradaki tüplere 10'ar µl ekstrakt ilave edildi ve kapakları kapatıldı. Son sıradaki PZR tüpüne de pozitif kontrol içeren Tüp 4'den 10 µl ilave edilip kapağı kapatıldı.
6. Kalan reaksiyon karışımı gerekirse daha sonra kullanım için -20°C'de donduruldu.
7. Tüpleri cihaza yüklemekten önce bir çalışma protokolü oluşturuldu.

8. Çalışmayı başlatmadan önce örnekler için tanımlama parametreleri girildi.
9. Örneklerdeki nükleik asit aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı.
 - a. 95°C 10 dakika (denatürasyon) 1 siklus
 - b. 95°C 10 saniye
 - c. 55°C 55 saniye
 - d. 72°C 20 saniye
 } 40 siklus
10. Cihaza örnekler yerleştirildi, kapağı kapatıldı ve çalışma başlatıldı.
11. Amplifikasyon işlemi, sinyallerin saptanması ve yorumlanması RotorGeneQ Q cihazı ile yapıldı.
14. Oluşan flüoresan eğrileri RotorGeneQ software 2.0 ile değerlendirildi (eşik değeri 0.05 kabul edildi).
12. Sonuçların değerlendirilmesi, Tablo 3.2’de yer alan kriterlere göre yapıldı.

Pozitif çıkan sonuçlarda *Penicillium* enfeksiyonunun da hedef gen benzerliğinden dolayı düşünülmesi gerektiği kit içeriğinde belirtilmiştir.

Tablo 3.2. MycAssay *Aspergillus* real-time PZR sonuçlarının yorumlanması.

Örnek	Real time PZR Ct (saptama eşiği)	İnternal kontrol Ct	Yorum	Yapılacaklar
Negatif kontrol	39 veya saptanmadı	28.4-35	NK (negatif kontrol) uygun	Hasta sonuçları geçerli
Negatif kontrol	39 veya saptanmadı	<28.4 veya >35	NK uygun değil	Çalışma tekrarlanır
Negatif kontrol	<39	28.4-35	Kontaminasyon	Çalışma tekrarlanır
Pozitif kontrol	15-20 arası	Uygulanabilir değil	PK (pozitif kontrol) uygun	Hasta sonuçları geçerli
Pozitif kontrol	<39	Uygulanabilir değil	PK uygun değil	Çalışma tekrarlanır
Hasta örneği	39 veya saptanmadı	28.4-35	<i>Aspergillus</i> negatif	<i>Aspergillus</i> spp. saptanmadı
Hasta örneği	<15 veya >20	Uygulanabilir değil	<i>Aspergillus</i> pozitif	<i>Aspergillus</i> spp. saptandı
Hasta örneği	39 veya saptanmadı	<28.4 veya >35	İnternal kontrol başarısız	Test başarısız, inhibitör varlığı

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Referans tanı olarak EORTC/MSG'nin 2008 yılında revize ettiği İA tanı kriterleri (Kanıtlanmış, olası, şüpheli İA) kullanıldı. *Aspergillus* PZR sonuçları İA tanısının değerlendirmesinde kullanılmadı. PZR sonuçları İA tanısına göre (Kanıtlanmış/olası ve şüpheli/İA riskli) gerçek pozitif, gerçek negatif, yalancı pozitif ve yalancı negatif olarak sınıflandırıldı.

Çalışma verileri “SPSS for Windows, Version 22.0” paket programı kullanılarak analiz edildi. Veriler, ortalama değer $\pm$ standart sapma ($\pm$ SD), sayı ve yüzde değerler ile belirtildi. Gruplar arasında frekansların karşılaştırılması ve iki taraflı p değerinin hesaplanması için Pearson Ki-kare testi, Fisher's Exact testi, McNemar testi kullanıldı. Galaktomannan antijen testi ve PZR testleri arasındaki uyumun karşılaştırması için kappa değeri hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede elde edilen p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı kabul edildi. İnvaziv aspergillozisi belirlemede kullanılan tanı testlerinin performansının ölçülmesi amacı ile duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD), doğruluk değeri, pozitif ve negatif olabilirlik oranları hesaplandı.

4. BULGULAR

Ocak 2015 - Ocak 2016 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hematolojik malignite nedeni ile takip edilen, invaziv aspergillozis (İA) riski olan toplam 32 hasta çalışmaya dahil edilmiş ve bu hastaların 41 febril nötropenik epizodu izlenmiştir. EORTC/MSG'nin 2008'deki revizyonlu kriterlerine göre bu epizodlar tanımlanmıştır. Hasta grubu 18 erkek, 14 kadından oluşmaktadır ve grubun yaş ortalaması 54.47 ± 16.48 'dir. Hasta grubunun 20'si Hematoloji Servisi, 9'u Yoğun Bakım Ünitesi, 3'ü Yetişkin Kök Hücre Transplantasyon Ünitesinde yatan hastalardan oluşmaktadır.

Hastaların 41 febril nötropenik epizodundan toplam 168 serum örneği elde edilmiştir. Hastalardan 25'inin tek febril nötropenik epizodu izlenirken, 5 hastanın iki, 2 hastanın üç febril nötropenik epizodu izlenmiştir. 168 serumun 100 tanesi olası IA epizodu sırasında toplanmıştır. Aynı hastanın tekrar yatışındaki febril nötropeni epizodu yeni bir epizod olarak kabul edilerek değerlendirmeye alınmıştır.

Hasta grubunda en sık altta yatan hastalık %46.9 ile AML olarak görülmüştür. 32 hastanın 17'si (%53.1) indüksiyon kemoterapisi alan hastalardan oluşmaktadır. Hastalara ait demografik özellikler Tablo 4.1'de görülmektedir.

EORTC/MSG tanı kriterlerine göre yapılan sınıflamada hastaların izlenen hiçbir epizodunda kanıtlanmış (proven) IA saptanmamıştır. İzlenen 41 epizodun; 21'i (%51.2) olası (probable) IA, 7'si (%17.1) şüpheli (possible), 13'ü (%31.7) ise IA riski taşıyanlar olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 4.1. Hasta düzeyinde demografik özellikler.

DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER	BULGULAR (sayı/yüzde)
Hasta Sayısı	32
Cinsiyet (E/K)	18/14
Yaş (yıl)	54.47
Yatılan Servis: • Hematoloji servisi • Yoğun bakım ünitesi • Yetişkin kök hücre transplantasyon ünitesi	20 (%62.5) 9 (%28.1) 3 (%9.4)
Toplam Yatış Süresi (gün)	49.75 ±31.35
Altta Yatan Hastalıklar: • Akut Miyeloid Lösemi (AML) • Miyelodisplastik Sendrom-AML transforme (MDS-AML) • Akut Lenfoid Lösemi (ALL) • Graft-Versus-Host Disease (GVHD) • Nonhodgkin Lenfoma (NHL) • Miyelodisplastik Sendrom (MDS) • Multipl Miyeloma (MM) • Kronik Lenfoid Lösemi (KLL)	15(%46.9) 6 (%18.8) 4 (%12.5) 2 (%6.25) 2 (%6.25) 1 (%3.1) 1 (%3.1) 1 (%3.1)
Kemoterapi (KT) Rejimi: • İndüksiyon • Relaps-Rezistans • Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu (AKHT) • Konsolidasyon (idame) • KT başlanmamış (yeni tanı)	17 (%53.1) 10 (%31.3) 3 (%9.4) 1 (%3.1) 1 (%3.1)

4.1. Epizodlardaki Görüntüleme Yöntemleri ve Histopatoloji Bulguları

41 epizodun 38'inde (%92.7) YRBT çekilmiştir. 7 hastada çekilen paranazal sinüs BT'de herhangi bir patoloji bulunmazken nonspesifik sinüzit bulguları izlenmiştir. Çekilen YRBT'lerde en sık gözlenen patolojik görünüm erken dönem bulgularından olan nodül ve buzlu cam (halo) (%29.2) görünümü olmuştur. Histopatoloji açısından değerlendirilen 3 epizoda ait biyopsi materyalinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır. Görüntüleme yöntemi ve histopatoloji bulguları Tablo 4.2'de görülmektedir.

Tablo 4.2. Görüntüleme yöntemi ve histopatoloji bulguları.

YRBT (n=38) • Normal bulgular • Nodül (halosuz) • Nodül ve halo • Nodül, halo ve kavite	Sayı / Yüzde 10 (%24.4) 9 (%22) 12 (%29.2) 7 (%17.1)
Paranasal sinüs BT (n=7) • Nonspesifik sinüzit bulguları	7 (%100)
Histopatoloji (n=3) • Patolojik bulgu yok	3 (%100)

4.2. Epizodlardaki Klinik Kültür Üremeleri

41 epizodun 14'ünde (%34.1) bakteriyemi saptanmıştır. Kan kültüründe en sık üreyen bakteri koagulaz negatif stafilokoklar olmuştur. Hastaların izlenen epizodlardaki kan, idrar ve balgam kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Tablo 4.3'de görülmektedir. Hastaların epizodlarının hiçbirinde kan, idrar ve balgam kültürlerinden *Aspergillus* türleri ve diğer filamentöz mantarlar izole edilmemiştir.

Tablo 4.3. Hastaların klinik kültür örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar.

Kan Kültürü • Koagulaz negatif stafilokok • Vankomisin dirençli <i>E.faecium</i> • <i>E.coli</i>	Sayı / Yüzde 11 (%84.6) 1 (%7.7) 1 (%7.7)
İdrar Kültürü • Vankomisin dirençli <i>E.faecium</i> • <i>Candida sp.</i>	3 (%75) 1 (%25)
Balgam Kültürü • <i>A.baumannii</i> • <i>E.faecium</i>	2 (%66.7) 1 (%33.3)

4.3. Epizodlardaki Antibakteriyel ve Antifungal Kullanımı

Epizodların 38'inde (%92.7) profilaktik olarak trimethoprim-sulfomethoksazol ve kinolon grubu antibakteriyel kullanımı mevcuttur.

41 epizodun hepsinde profilaktik olarak antifungal kullanımı mevcut iken, %68.3 oranında (28/41) en sık posakonazol kullanımı mevcuttur. %26.8 oranında

da (11/41) profilaktik flukonazol kullanımı ve %4.9 oranında (2/41) sekonder profilaksi amaçlı vorikonazol kullanımı gözlenmiştir.

39 (%95.1) epizodda empirik antibakteriyel tedavi kullanımı varken, geniş spektrumlu antibakteriyel kullanımı açısından en sık kullanılan antibakteriyel ajanlar karbapenemler ve antipsödomonal penisilinler olarak görülmüştür (16'sında karbapenem, 4'ünde antipsödomonal penisilin, 17'sinde kombine karbapenem ve antipsödomonal penisilin).

EORTC tanı kriterlerine göre kanıtlanmış İA hastası çalışmada yer almazken, olası (probable) İA olan hastaların tamamında empirik ya da pre-emptif olarak antifungal tedavi başlandığı görülmüştür. 38 (%92.7) epizodda empirik ya da pre-emptif antifungal kullanımı mevcuttur. Empirik antifungal tedavi 27 (%65.9) epizodda uygulanırken, pre-emptif antifungal tedavi 11 (%26.8) epizodda uygulanmıştır.

Tekli antifungal tedavi değerlendirildiğinde 26 epizodda lipozomal amfoterisin B, 6'sında vorikonazol, 1'inde caspofungin yer alırken, 5 epizodda lipozomal amfoterisin B ve vorikonazol kombine kullanılmıştır. Sıklıkla kullanılan antifungaller lipozomal amfoterisin B ve vorikonazol olarak görülmüştür.

4.4. Galaktomannan Antijen Testi Bulguları

Değerlendirmeye alınan 32 hastanın 41 febril nötropenik epizodundan 168 serum örneği elde edilmiştir. Toplam 168 serum örneğinde ELİSA yöntemiyle GM antijeni aranmıştır. Optik dansite indeksinin 0.5 ve üzerinde olması pozitif olarak kabul edilerek 168 serum örneğinin 54'ünde (%32.1), 41 epizodun 30'unda (%73.2) GM antijen pozitifliği saptanmıştır.

Olası İA epizoduna ait olan 100 serum örneğinin 44'ünde (%44) GM pozitif iken, şüpheli İA ve İA riskli gruba ait olan 68 serum örneğinin 10'unda (%14.7) GM pozitifliği mevcuttu. Pozitif olarak kabul edilen GM antijen indeks değerleri 0.52 ile 8.2 aralığında değişmekteydi. EORTC sınıflamasına göre olası (probable) İA olarak tanımlanan epizodların GM indeks düzeyleri ve diğer özellikleri ile ilgili bilgiler tablo 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4. Olası (probable) İA epizodlarının galaktomannan indeks düzeyleri, PCR sonuçları ve diğer özellikleri.

No	Cinsiyet/ yaş	Altta yatan hastalık	YRBT bulgusu	Serum sayısı	GM düzeyi (en düşük - en yüksek)	Artus Qiagen PZR sonucu	MycAssay PZR sonucu (Ct)
1	E/54	MDS	Nodül-halo	7	1.28-5.64	A.fumigatus	Pozitif (36.79)
2	K/67	MDS- AML	Nodül-halo- kavite	14	0.52-1.74	A.fumigatus	Pozitif (38.03)
3	K/67	ALL	Nodül-halo- kavite	2	0.5-0.61	Negatif	Negatif
4	E/70	MM	Nodül-halo	4	0.69-0.71	Negatif	Negatif
5	K/53	AML	Nodül	2	2.71-3.22	A.flavus	Pozitif (35.61)
6	E/53	AML	Nodül-halo	8	0.69-0.94	Negatif	Negatif
7	E/53	AML	Nodül-halo	2	0.5-2.02	A.flavus	Pozitif (36.08)
8	E/27	MDS- AML	Nodül-halo	7	0.55-2.14	Negatif	Pozitif (37.67)
9	K/81	AML	Nodül-halo	8	<0.5-0.55	Negatif	Negatif
10	K/81	AML	Nodül	1	7.0	A.flavus	Pozitif (30.06)
11	E/63	ALL	Nodül	1	3.71	A.fumigatus	Pozitif (37.09)
12	E/62	MDS- AML	Nodül-halo- kavite	6	0.51-1.14	Negatif	Negatif
13	E/62	MDS- AML	Nodül-halo- kavite	10	<0.5-0.57	Negatif	Negatif
14	E/62	MDS- AML	Nodül-halo- kavite	5	1.04-7.0	A.terreus	Pozitif (34.32)
15	K/59	AML	Nodül-halo	8	<0.5-0.61	Negatif	Negatif
16	E/27	ALL	Nodül-halo	1	8.2	A.terreus	Pozitif (32.90)
17	E/40	AML	Nodül	4	1.38-4.91	A.flavus	Pozitif (36.83)
18	E/62	NHL	Nodül-halo	2	0.66-0.67	Negatif	Negatif
19	K/33	GVHD	Nodül	5	0.6-0.8	Negatif	Pozitif (38.81)
20	E/66	ALL	Nodül	2	<0.5-5.25	Negatif	Pozitif (36.02)
21	E/47	AML	Nodül-halo	1	6.73	A.flavus	Pozitif (30.74)

Referans tanı olarak EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları pozitif olarak, şüpheli ve İA riskli epizodlar negatif olarak değerlendirildi. EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde tek ve ardışık GM antijen test sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Tek GM testi pozitifliği ile referans tanının karşılaştırılması.

	Olası/Kanıtlanmış İA	Şüpheli/İA riskli	Total
Tek GM pozitif	21	9	30
Tek GM negatif	0	11	11
Total	21	20	41

Tablo 4.6. Ardışık GM testi pozitifliği ile referans tanının karşılaştırılması.

	Olası/Kanıtlanmış İA	Şüpheli/İA riskli	Total
Ardışık GM pozitif	9	0	9
Ardışık GM negatif	12	20	32
Total	21	20	41

Referans tanı olarak EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları pozitif olarak, şüpheli ve İA riskli epizodlar negatif olarak değerlendirildi. EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde GM antijen testinin duyarlılığı %100, seçiciliği %55, PPD %70, NPD %100 ve doğruluk %78 olarak saptanmıştır.

Tüm epizodlar değerlendirildiğinde GM antijen testinin duyarlılığı %77.8, seçiciliği %35.7, PPD %70, NPD %45.5 ve doğruluk %63.4 olarak saptanmıştır.

EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki GM testi uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde GM testinin duyarlılığı %44, seçiciliği %85.3, PPD %81.5, NPD %50.9 ve doğruluk %60.7 olarak saptanmıştır.

4.5. Artus Qiagen *Aspergillus* Real-time PZR Sonuçları

Serum örneklerinde *Aspergillus* DNA'sını tespit etmek üzere ticari real-time PZR kiti olan Qiagen Artus *Aspergillus* PZR kiti kullanılmıştır. Artus Qiagen *Aspergillus* PZR kiti ile 168 serum örneğinin 18'inde (%10.8) ve 41 epizodun 10'unda (%24.4) pozitiflik bulunmuştur. PZR pozitif bulunan 10 epizodda (10 olası İA) Artus Qiagen PZR kitinin saptadığı türlerin dağılımı: 5 epizodda *A.flavus*, 3 epizodda *A.fumigatus* ve 2 epizodda *A.terreus* saptanmıştır.

Referans tanı olarak EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları pozitif olarak, şüpheli ve İA riskli epizodlar negatif olarak değerlendirildi. EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde Artus Qiagen PZR testinin duyarlılığı %47.6, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %64.5 ve doğruluk %73 olarak saptanmıştır.

EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde Artus Qiagen PZR testinin duyarlılığı %18, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %45.3 ve doğruluk %51 olarak saptanmıştır.

4.6. MycAssay *Myconostica* Real-time PZR Testi Bulguları

Serum örneklerinde *Aspergillus* DNA'sını tespit etmek üzere diğer bir ticari real-time PZR kiti olan MycAssay *Myconostica Aspergillus* PZR kiti kullanılmıştır. MycAssay *Myconostica* PZR kiti ile 168 serum örneğinin 21'inde (%12.5) ve 41 epizodun 13'ünde (%31.7) (13 olası İA) pozitiflik bulunmuştur.

Referans tanı olarak EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları pozitif olarak, şüpheli ve İA riskli epizodlar negatif olarak değerlendirildi. EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde MycAssay PZR testinin duyarlılığı %61.9, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %71.4 ve doğruluk %80.5 olarak saptanmıştır.

EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde MycAssay PZR testinin duyarlılığı %21, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %46.3 ve doğruluk %52 olarak saptanmıştır.

EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış İA, olası İA epizodları ve ayrıca tüm İA epizodları değerlendirildiğinde Tek ve ardışık GM, Artus Qiagen PZR ve MycAssay PZR duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları ile ilgili veriler Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’da belirtilmektedir.

Tablo 4.7. EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde Tek ve ardışık GM, Artus Qiagen PZR ve MycAssay PZR duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, doğruluk, pozitif ve negatif olabilirlik oranları.

	Tek GM	Ardışık GM	Tek Qiagen PZR	Ardışık Qiagen PZR	Tek MycAssay PZR	Ardışık MycAssay PZR
Duyarlılık (%)	100	42.9	47.6	19	61.9	19
Özgüllük (%)	55	100	100	100	100	100
PPD (%)	70	100	100	100	100	100
NPD (%)	100	62.5	64.5	54	71.4	54
Doğruluk (%)	78	70.7	73.2	58.5	80.5	58.5
Pozitif olabilirlik oranı	2.22	0.42	0.48	0.19	0.62	0.19
Negatif olabilirlik oranı	1.80	0.57	0.52	0.81	0.38	0.81

Tablo 4.8. Bütün İA epizodları değerlendirildiğinde Tek ve ardışık GM, Artus Qiagen PZR ve MycAssay PZR duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, doğruluk, pozitif ve negatif olabilirlik oranları.

	Tek GM	Ardışık GM	Tek Qiagen PZR	Ardışık Qiagen PZR	Tek MycAssay PZR	Ardışık MycAssay PZR
Duyarlılık (%)	77.8	33.3	37	14.8	48.1	14.8
Özgüllük (%)	35.7	100	100	100	100	100
PPD (%)	70	100	100	100	100	100
NPD (%)	45.5	43.8	45.2	37.8	50	37.8
Doğruluk (%)	63.4	70.7	73.2	58.5	80.5	58.5
Pozitif olabilirlik oranı	1.20	0.33	0.37	0.14	0.48	0.14
Negatif olabilirlik oranı	1.80	0.67	0.63	0.85	0.52	0.85

4.7. GM Antijen Testi, Real-time PZR Testlerinin Karşılaştırılması

Epizod düzeyinde ve serum düzeyinde yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

4.7.1. GM antijen testi ve Artus Qiagen PZR testi karşılaştırılması

10 epizodda (10 olası İA epizodu) hem GM antijen testi hem de Artus Qiagen PZR testiyle pozitif sonuç alınmıştır. 20 epizodda (11 olası İA ve 9 İA riskli epizod) GM antijen testi pozitif iken Artus Qiagen PZR testi negatif bulunmuştur. Hiçbir epizodda GM antijen testi negatif iken Artus Qiagen PZR testi pozitif bulunmamıştır. 11 epizodda (4 İA riskli ve 7 şüpheli İA) hem GM hem de Qiagen PZR testi negatif bulunmuştur. İki test karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Kappa=0.212).

İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve Qiagen PZR testlerinin sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve Qiagen PZR testlerinin sonuçları.

	Qiagen PZR pozitif	Qiagen PZR negatif
Kanıtlanmış / olası İA		
GM $\geq$ 0.5	18	36
GM $<$ 0.5	0	56
Şüpheli / İA riskli		
GM $\geq$ 0.5	0	10
GM $<$ 0.5	0	58

Serum düzeyinde kanıtlanmış/olası İA epizodları içinde GM ve Qiagen PZR uyumu %74 (74/100) (kappa değeri=0.43) bulunurken, Şüpheli/İA riskli grupta uyum %85 (58/68) bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). GM testinin duyarlılığı daha yüksek iken Qiagen PZR testinin seçiciliği daha yüksek bulunmuştur.

4.7.2. GM antijen testi ve MycAssay Myconostica PZR testi karşılaştırılması

13 epizodda (13 olası İA epizodu) hem GM antijen testi hem de MycAssay PZR testiyle pozitif sonuç alınmıştır. 17 epizodda (8 olası İA ve 9 İA riskli epizod) GM antijen testi pozitif iken MycAssay PZR testi negatif bulunmuştur. Hiçbir epizodda GM antijen testi negatif iken MycAssay PZR testi pozitif bulunmamıştır. 11 epizodda (4 İA riskli ve 7 şüpheli İA) hem GM hem de MycAssay PZR testi negatif bulunmuştur. İki test karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Kappa=0.291).

İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve MycAssay PZR testlerinin sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. İA tanısına istinaden indirek serum testleri olan GM ve MycAssay PZR testlerinin sonuçları.

	MycAssay PZR pozitif	MycAssay PZR negatif
Kanıtlanmış / olası İA		
GM ≥ 0.5	21	33
GM < 0.5	0	56
Şüpheli / İA riskli		
GM ≥ 0.5	0	10
GM < 0.5	0	58

Serum düzeyinde kanıtlanmış/olası İA epizodları içinde GM ve MycAssay PZR uyumu %77 (77/100) (kappa değeri=0.50) bulunurken, Şüpheli/İA riskli grupta uyum %85 (58/68) bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). GM testinin duyarlılığı daha yüksek iken MycAssay PZR testinin seçiciliği daha yüksek bulunmuştur.

4.7.3. Artus Qiagen PZR ve MycAssay Myconostica PZR testlerinin karşılaştırılması

Artus Qiagen PZR ve MycAssay *Aspergillus* PZR testlerinin bulguları karşılaştırıldığında, iki testin pozitif olduğu 10 epizod (10 olası İA epizodu) bulunmuştur. 3 epizodda (3 olası İA epizodu) MycAssay kiti ile pozitif sonuç elde

edilirken Artus Qiagen kiti ile negatif sonuç elde edilmiştir. İki PZR testi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.250$). Uyumlu sonuç elde edilmiştir (Kappa=0.820).

Artus Qiagen *Aspergillus* PZR ile pozitif saptanan 10 serum örneğinin ortalama Ct değeri (eşik değeri) 33.91 ± 3.58 iken MycAssay *Aspergillus* PZR için bu değer ortalama 36.07 ± 2.71 olarak hesaplanmıştır. MycAssay PZR testine göre Qiagen PZR testinin daha erken siklularda pozitiflik saptadığı görülmektedir.

Hem GM hem de her iki PZR testinin pozitif olduğu 10 epizod (10 olası İA) saptanmıştır.

EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde GM ve PZR testlerinin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları Tablo 4.11’de gösterilmektedir.

Kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki GM ve PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde testlerin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğruluk verileri Tablo 4.12’de belirtilmektedir.

Tablo 4.11. EORTC sınıflamasına göre kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde GM antijen testi, real-time testlerinin tek başına veya birlikte duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları, pozitif ve negatif olabilirlik oranları.

	GM	Qiagen PZR	MycAssay PZR	GM+Qiagen PZR	GM+ MycAssay PZR
Duyarlılık (%)	100	47.6	61.9	47.6	61.9
Özgüllük (%)	55	100	100	100	100
PPD (%)	70	100	100	100	100
NPD (%)	100	64.5	71.4	64.5	71.4
Doğruluk (%)	78	73.2	80.5	73.2	80.5
Pozitif olabilirlik oranı	2.22	0.47	0.61	0.47	0.61
Negatif olabilirlik oranı	0	0.52	0.38	0.52	0.38

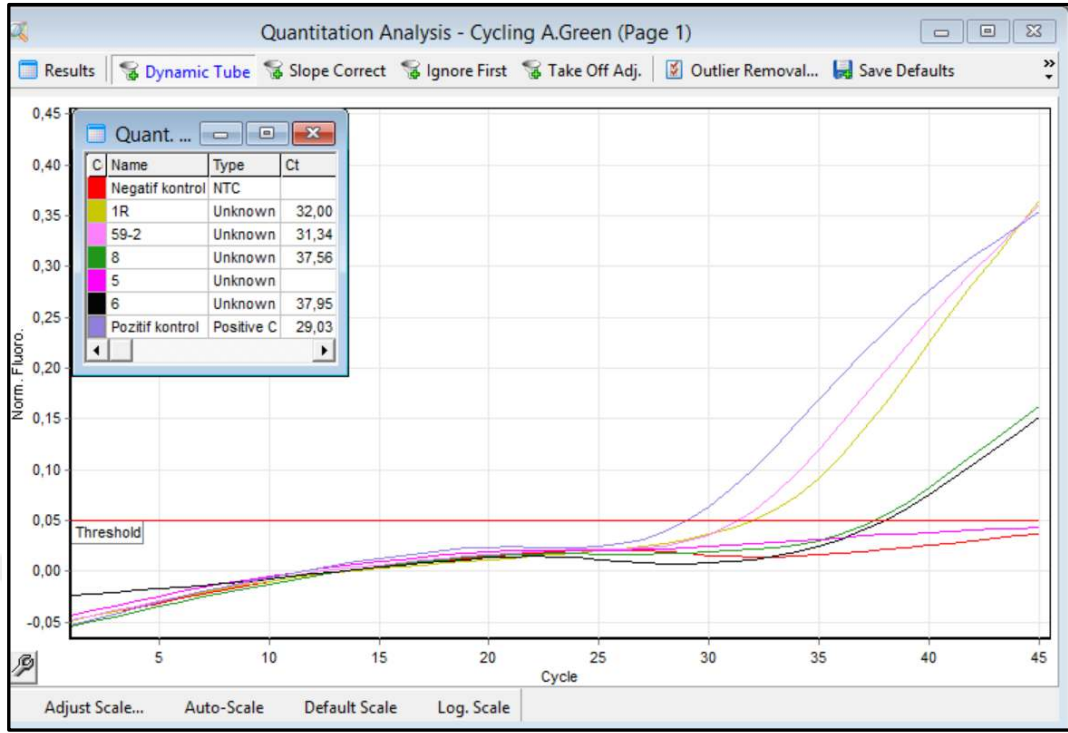
Tablo 4.12. Kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki GM ve PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde testlerin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve doğrulukları, pozitif ve negatif olabilirlik oranları.

	GM	Qiagen PZR	MycAssay PZR	GM+ Qiagen PZR	GM+ MycAssay PZR
Duyarlılık (%)	44	18	21	18	21
Özgüllük (%)	85.3	100	100	100	100
PPD (%)	81.5	100	100	100	100
NPD (%)	50.9	45.3	46.3	45.3	46.3
Doğruluk (%)	60.7	51	52	51	52
Pozitif olabilirlik oranı	3.14	0.18	0.21	0.18	0.21
Negatif olabilirlik oranı	0.65	0.82	0.79	0.82	0.79

GM testi 3.14 değeri ile en yüksek pozitif olabilirlik oranına sahip olan tanısal test olmuştur.

Artus Qiagen PZR testi, GM testi pozitif olan bir serum örneğinde doğrulama testi olarak kullanılacak olursa Qiagen PZR duyarlılığı %33.3, NPD %76, doğruluk %78'e yükselecektir. Aynı şekilde MycAssay PZR testi, GM testi pozitif olan bir serum örneğinde doğrulama testi olarak kullanılacak olursa MycAssay PZR duyarlılığı %38.9, NPD %77.6, doğruluk %80'e yükselecektir. Esas olarak sadece tanı testinin uygulandığı grupta negatif sonucu olanların gerçekte hasta olmama olasılığı artacaktır.

Kanıtlanmış İA epizodumuz bulunmamakla birlikte, olası İA olarak tanımlanan iki ayrı epizodda GM ve PZR pozitifliği YRBT'den 8 gün önce görülmüştür. GM pozitifliğinden önce saptanan herhangi bir PZR pozitifliği bulunmamaktadır.



Şekil 4.2. Real-time PCR görüntüsü.

4.8. Hasta Özelliklerinin Epizod Düzeyinde Yöntemler Üzerine Etkisi

Hastaların altta yatan hastalıkları, aldıkları antibakteriyel tedavi, antifungal tedavi, kemoterapi rejimi, nötropeni düzeyleri, PZR testlerinde kullanılan serum miktarlarının ve GM pozitif indeks değerlerinin yöntemler üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

4.8.1. GM antijen testi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde GM antijen pozitifliği saptanan 30 epizoddan 13'ü (%43.3) AML hastasıydı. Hastaların altta yatan hastalıkları ve GM antijen yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.524$).

Hastalar aldıkları kemoterapi rejimi açısından değerlendirildiğinde 41 epizodun 23(%56.1) remisyon indüksiyon tedavisi, 12 (%29.3) relaps/rezistans tedavisi, 1 (%2.4) konsolidasyon tedavisi, 3 (%7.3) allojenik kök hücre nakli yapılmıştı. Kalan 2 epizod herhangi bir KT alımı olmayan yeni tanıli bir hastaya

aitti. GM pozitifliği İndüksiyon kemoterapisi alan 30/16 (%53.3) epizodlarda en yüksek oranda saptanmıştır. Alınan tedavi tipi ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.726$).

Hastalar nötropeni düzeyleri açısından değerlendirildiğinde 41 epizodun 20'sinde (%48.8) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında (derin nötropeni), 21'inde (%51.2) $100/\text{mm}^3$ 'ün üstündeydi. GM pozitifliği olan 30 epizodun 17'sinde (%56.7) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında, 13'ünde (%43.3) $100/\text{mm}^3$ 'ün üstünde nötrofil sayısı varlığı saptanmıştır. Derin nötropenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da nötropeni düzeyi ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.095$).

Hastalar antibakteriyel tedavi açısından değerlendirildiğinde 41 epizodun 39'unda (%95,1) antibakteriyel kullanımı mevcuttu. Piperasilin-tazobaktamın tek başına veya diğer antibakteriyellerle kombine kullanıldığı 21 epizod (%51.2) ve piperasilin-tazobaktam kullanılmayan 20 epizod (%48.8) vardı. GM pozitifliği saptanan 30 epizodun 16'sında (%53.3) piperasilin-tazobaktam kullanımı varken, 14 epizodda (%46.7) piperasilin-tazobaktam kullanımı mevcut değildi. Piperasilin-tazobaktam kullanımı ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.655$).

Hastalar antifungal kullanımı açısından değerlendirildiğinde 41 epizodun 38'sinde (%92.7) antifungal ajan kullanımı vardı. Tek antifungal kullanımı olan 33 epizod (%80.5), iki ve üzeri antifungal (kombine ya da ardışık) kullanımı olan 5 epizod (%12.2) bulunmaktadır. GM pozitifliği olan 30 epizodun 23(%76.7) epizodunda tek antifungal kullanımı varken, 4 epizodunda (%13.3) iki ve üzeri antifungal kullanımı saptanmıştır. Tek veya ikili antifungal kullanımı ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.658$). Empirik antifungal kullanımı 41 epizodun 27'sinde (%65.9), pre-emptif antifungal kullanımı 41 epizodun 11'inde (%26.8) izlenmiştir. GM pozitifliği olan 30 epizodun 20'sinde (%66.7) empirik antifungal kullanımı varken, GM pozitif 30 epizodun 11'inde (%36.7) pre-emptif antifungal kullanımı saptanmıştır. Empirik antifungal kullanımı ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.275$). Pre-emptif antifungal kullanımı ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p=0.020$**).

4.8.2. Artus Qiagen PZR testi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde Artus Qiagen PZR pozitifliği saptanan 10 epizoddan 5'i (%50) AML hastasıydı. Hastaların altta yatan hastalıkları ve Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.999$).

Artus Qiagen PZR testi pozitifliği en yüksek oranda indüksiyon kemoterapisi gören 10/6 (%60) epizodlarda saptanmıştır. Alınan tedavi tipi ve Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.999$).

Nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında olan 20 epizodun 7'sinde (%35), $100/\text{mm}^3$ 'ün üstünde olan 21 epizodun 3'ünde (%14.3) Artus Qiagen PZR testi pozitifliği saptanmıştır. Derin nötropenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da nötropeni düzeyi ile Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.159$).

Hastalar antibakteriyel tedavi açısından değerlendirildiğinde 41 epizodun 39'unda (%95,1) antibakteriyel kullanımı mevcuttu. Piperasilin-tazobaktam kullanımı olan 21 epizodun 5'inde (%23.8) Artus Qiagen PZR testi pozitifliği varken piperasilin-tazobaktam kullanılmayan 20 epizodun 5'inde (%25) piperasilin-tazobaktam pozitiflik saptanmıştır. Piperasilin-tazobaktam kullanımı ile Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.999$).

Artus Qiagen PZR testi pozitifliği saptanan 33 epizodun 8'inde (%24.2) tek antifungal kullanımı varken, 5 epizodun 2'sinde (%40) iki ve üzeri antifungal kullanımı saptanmıştır. Tek antifungal kullanımı ($p=0.999$) veya ikili antifungal kullanımı ile Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.580$). Empirik antifungal kullanımı olan 27 epizodun 3'ünde (%11.1) Artus Qiagen PZR testi pozitifliği varken, pre-emptif antifungal kullanımı olan 11 epizodun 7'sinde (%63.6) pozitiflik saptanmıştır. Empirik antifungal kullanımı (**$p=0.017$**) ve Pre-emptif antifungal kullanımı ile Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p=0.001$**).

PZR aşamalarından önce kullanılan serum miktarlarına göre PZR yöntemi uygulanan 168 serumun 115'inde (%68.5) işleme alınan serum miktarı $400 \mu\text{L}$ ve

üzerinde iken, 53'ünde (%31.5) işleme alınan serum miktarı 400 µL'den az olarak not edilmiştir. Buna göre 400 µL altındaki 1 serumda (%1.9) Artus Qiagen PZR testi için pozitiflik saptanırken 400 µL ve üzerinde kullanılan 17 serumda (%14.8) pozitif sonuç alınmıştır. Kullanılan serum miktarı ve Artus Qiagen PZR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**p=0.014**).

GM pozitif indeks düzeyi ve Artus Qiagen PZR pozitifliği ilişkisi incelendiğinde 168 serumdan 29'unun (%17.3) GM pozitif indeks değeri ≥ 1 iken 139'unun (%82.7) 1'den küçüktür. Bu 139 serumda Artus Qiagen PZR ile pozitiflik saptanmazken, 29 serumun 18'inde (%62.1) pozitiflik saptanmıştır. GM pozitif indeks değeri ≥ 1 olması ile Artus Qiagen PZR yöntemi pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**p<0.001**).

4.8.3. MycAssay *Aspergillus* PZR testi

Hastalar epizod düzeyinde altta yatan hastalıkları açısından değerlendirildiğinde MycAssay *Aspergillus* PZR pozitifliği saptanan 13 epizoddan 5'i (%38.5) AML hastasıydı. Hastaların altta yatan hastalıkları ve MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.491).

MycAssay *Aspergillus* PZR testi indüksiyon kemoterapisi gören epizodlarda 7/13 (%53.8) en yüksek oranda saptanmıştır. Alınan tedavi tipi ve MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.843).

Nötrofil sayısı 100/mm³'ün altında olan 20 epizodun 8'inde (%40), 100/mm³'ün üstünde olan 21 epizodun 5'inde (%23.8) MycAssay *Aspergillus* PZR testi pozitifliği saptanmıştır. Derin nötropenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da nötropeni düzeyi ile MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.265).

MycAssay *Aspergillus* PZR testi pozitifliği Piperasilin-tazobaktamın tek başına veya diğer antibakteriyellerle kombine kullanıldığı 21 epizodun 8'inde (%38.1), piperasilin-tazobaktam kullanılmayan 20 epizodun 5'inde (%25) saptanmamıştır. Piperasilin-tazobaktam kullanımı ile MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.368).

MycAssay *Aspergillus* PZR pozitifliği tek antifungal kullanımı olan 33 epizodun 11'inde (%33.3), iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 5 epizodun 2'sinde (%40) saptanmıştır. Tek antifungal kullanımı ($p=0.999$) veya ikili antifungal kullanımı ile MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.645$). Empirik antifungal kullanımı olan 27 epizodun 5'inde (%18.5) MycAssay *Aspergillus* PZR testi pozitifliği varken, pre-emptif antifungal kullanımı olan 11 epizodun 8'inde (%72.7) pozitiflik saptanmıştır. Empirik antifungal kullanımı (**$p=0.017$**) ve Pre-emptif antifungal kullanımı ile MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p=0.001$**).

PZR aşamalarından önce kullanılan serum miktarlarına göre sonuçlar incelendiğinde 400 µL altındaki 2 serumda (%3.8) MycAssay *Aspergillus* PZR testi için pozitiflik saptanırken 400 µL ve üzerinde kullanılan 19 serumda (%16.5) pozitif sonuç alınmıştır. Kullanılan serum miktarı ve MycAssay *Aspergillus* PZR yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p=0.020$**).

GM pozitif indeks düzeyi ve MycAssay *Aspergillus* PZR pozitifliği ilişkisi incelendiğinde 168 serumdan 29'unun (%17.3) GM pozitif indeks değeri ≥ 1 iken 139'unun (%82.7) 1'den küçüktür. Bu 139 serumda MycAssay *Aspergillus* PZR 1 (%0.7) pozitiflik saptanırken, 29 serumun 20'sinde (%69) pozitiflik saptanmıştır. GM pozitif indeks değeri ≥ 1 olması ile MycAssay *Aspergillus* PZR yöntemi pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p<0.001$**).

5. TARTIŞMA

Aspergillus enfeksiyonlarının fırsatçı enfeksiyon olarak tanımlandığı tarihten beri yıllar içerisinde yapılan postmortem araştırma sonuçlarına göre risk grubundaki bireylerde, İA nedeni mortalite oranlarının ve dolayısıyla İA insidansının arttığı görülmektedir. Özellikle hematolojik maligniteli remisyon-indüksiyon kemoterapisi ve HKHT nedeni ile yoğun tedavi altındaki hastalar İA gelişimi açısından risk altındadır. Flukonazolun dünya genelinde yaygın kullanımı küflere karşı klinik etkisinin olmaması nedeni ile vakaların sayısını azaltamamakta ve İA en yaygın invaziv küf enfeksiyonu olarak yerini korumaktadır (114).

Febril nötropeni nedeni ile takip edilen hastalarda ateşin sıklıkla nedeni bakteriyel enfeksiyonlar ve kullanılan ilaçlar olsa da, bu hastaların yaklaşık %5-10'unda etken mantar enfeksiyonlarıdır (115).

Riskli gruptaki hastaların çoğunda halo işareti ve/veya nodül varlığı ile özgül olmayan YRBT ve klinik bulgular, konvansiyonel methodların uygulanım zorluğu gibi nedenlerle tanı geç konulmakta bazen net bir tanıya ulaşılamamaktadır (68, 116). Dokudaki mantarın mikroskopi ve kültür ile izolasyonu kesin tanı için gerekmekte fakat örneğe ulaşımındaki zorluk, kanama komplikasyonu riski ve duyarlılıklarının düşüklüğü nedeniyle mümkün olmamaktadır. Erken tanı, hızlı bir şekilde antifungal terapinin başlanmasını ve dolayısıyla hastalığın sonlanması, uzun yatış ve tedavi maliyetlerinin, en önemlisi de mortalitenin azalmasını sağlayacaktır (117). Günümüzde halen birçok merkezde uygulanan GM testi ve YRBT antifungal tedaviye başlama kararında yol göstericidir (118).

Örnek alımında invaziv prosedürler gerektirmeyen, duyarlılığı ve seçiciliği yüksek, erken dönemde, hızlı tanı koyabilen yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda serolojik ve özellikle moleküler tanı yöntemlerine olan ilgi gittikçe artmaktadır (72, 119).

PZR için araştırmaların başladığı ilk yıllarda ticari kitlerin yokluğu nedeni ile in-house testlerin tekrarlanabilirlik ve standardizasyon sorunları mevcuttu (120). Günümüzde özellikle invaziv olmayan yöntemlerle ulaşımı daha kolay olan

serum, plazma gibi örneklerde uygulanabilen ticari PZR kitleri sayesinde karşılaştırmalı sonuçlar elde edebilmekteyiz. Özellikle tam kan elde edilirken EDTA (etilen daimin tetraasetik asit) nedenli inhibisyon sorunları nedeni ile teknik olarak daha az zorlayıcı olan serum örnekleri tercih edilmektedir. Serum örneği ile çalışmanın bir diğer avantajı hem GM hem de PZR'ın aynı örnekten çalışılmasına olanak sağlamasıdır (121).

Biz de bu çalışmamızda, ilk çıkan ticari real-time PZR kiti olan MycAssay *Aspergillus* kiti ile piyasada yerini alan bir diğer yeni ticari real-time PZR kiti olan Artus Qiagen *Aspergillus* PZR kitini serum örneklerinde kullanarak febril nötropeni nedeni ile takip edilen hematolojik maligniteli hastalarda İA tanısındaki performansını değerlendirdik.

Çalışmada yer alan hastaların öncelikle çalışma sırasındaki özellikle balgam örneklerinin ve diğer klinik örneklerinin üremeleri, YRBT, paranazal BT, histopatoloji sonuçlarını değerlendirdik.

Araştırmaya dahil edilen 32 hastanın 41 epizodunda bulunan balgam kültürlerinin hiçbirinde herhangi bir mantar üremesi olmamıştır. Bilindiği üzere, üst solunum yolu örneklerinde bulunan flora elemanları, alt solunum yolu örneklerinden izole edilen mantarın primler patojen olarak düşünülmesini zorlaştırmakta, çoğu zaman kontaminasyon olarak değerlendirilmekte ve kültür duyarlılığını düşürmektedir. BAL gibi alt solunum yolu örneklerinin alımı teknik açıdan zahmetli olmakta birlikte, bizim çalışmamızdaki hasta grubunda olduğu gibi çoğu hastadan bu örneklerin eldesi, kültür ve histopatolojik açıdan çalışılması mümkün olmamaktadır. YRBT bulgularından en çok karşımıza çıkan nodül ve halo ya da sadece nodül olmuştur. Daha önce de vurguladığımız gibi YRBT çekilen epizodların çoğunda (28/38) bu bulgulara rastlanmış, beklenildiği gibi klinisyeni yönlendirme aşamasında yardımcı olmuştur. Aynı şekilde paranazal BT'den de küf açısından tanısal anlamda özgül bir bulgu elde edilememiştir.

Galaktomannan antijen

Galaktomannan, *Aspergillus* türlerinde hücre duvarında bulunan, üreme sırasında ekzoantijen olarak dolaşıma salınabilen bir polisakkariddir. Bu antijen, serum ve BAL örneklerinde ELİSA, LA, RIA gibi yöntemler ile

saptanabilmektedir. Testte kullanılan sıçan kökenli monoklonal EB-A2 antikorları galaktomannan molekülünün immünojenik galaktofuranoz epitopuna özgüdür. Bu yapı hem duvar hem de salgılanan galaktomannan antijeninde bulunduğu için tanı ve tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılır.

Hastalardaki GM salınımı değişkenlik göstermekte, birçok faktörden etkilenmekte ve bu yüzden düzenli bir şekilde ardışık serum örneğinin alınması doğru GM pozitifliğinin yakalanması için önem arz etmektedir (122). Serum anti-*Aspergillus* antikorları varlığı, örnekleme öncesinde veya sırasında antifungal profilaksi ve/veya tedavi alıyor olmak GM negatifliğine neden olabilir (80, 123).

Çalışmamızın veri analizi değerlendirildiğinde, EORTC'ye göre kanıtlanmış İA ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde, GM antijen testi için duyarlılığı %100, seçiciliği %55, PPD %70, NPD %100 ve doğruluk %78 olarak saptanmıştır. EORTC'ye göre sınıflandırılan tüm epizodlar (kanıtlanmış İA, olası İA ve şüpheli İA) değerlendirildiğinde, GM antijen testi için duyarlılığı %77.8, seçiciliği %35.7, PPD %70, NPD %45.5 ve doğruluk %63.4 olarak saptanmıştır. Tek GM yerine ardışık GM testinin kanıtlanmış ve olası İA epizodları değerlendirildiğinde duyarlılık %42.9, özgüllük %100, PPD %100, NPD %62.5 ve doğruluk %70.7 olarak saptanmıştır.

Serum düzeyinde yapılan hesaplamalara göre, EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki GM testi uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde GM testinin duyarlılığı %44, seçiciliği %85.3, PPD %81.5, NPD %50.9 ve doğruluk %60.7 olarak saptanmıştır.

GM antijen testinin FDA verilerine göre duyarlılığı genel olarak %80.7, seçiciliği %89.2'dir. Bununla birlikte farklı merkezlere göre duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %33-100 ve %65-100 arasında değişmektedir. Duyarlılıktaki ve özgüllükteki bu farklılığın hastanın kliniğine, antifungal tedavi alımına, örneğin enfeksiyonun hangi zamanında alındığına, örnek sayı ve tipine, çalışılan merkeze göre kabul edilen GM eşik değerine göre değişebileceği bildirilmiştir (72).

Marr ve arkadaşlarının 2004'de yaptıkları bir çalışmada, hematolojik maligniteli hastalarda cut-off 0.5 alındığında GM için %70 duyarlılık, %70 özgüllük saptamışlar (80).

Maertens ve arkadaşlarının 2004’de yaptıkları diğer bir çalışmada yine 0.5 cut-off sınırında %96.5 duyarlılık, %85.1 özgüllük saptanmıştır (71).

Herbrecht ve arkadaşlarının 2002’de yaptıkları bir çalışmada GM testi için kanıtlanmış İA olgularında %64.5 duyarlılık, olası İA olgularında %16.4 duyarlılık, şüpheli İA olgularında ise %25 duyarlılık saptamışlardır (124).

Pfeiffer ve arkadaşlarının 2006’da yaptıkları 27 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde kanıtlanmış ve olası İA için %61 duyarlılık, %93 özgüllük, hematolojik maligniteli hastalar ayrı olarak değerlendirildiğinde ise %70 duyarlılık, %92 özgüllük saptamışlardır (125).

Hematolojik maligniteler arasında AML diğerlerine göre İA gelişimi açısından daha yüksek riskli olarak bilinmektedir. Ayrıca kemoterapi rejimleri açısından remisyon indüksiyon kemoterapisi alan hastalarda da daha fazla oranda İA gelişimi olduğu bildirilmektedir (126). Çalışmamızda altta yatan hastalıklar ve kemoterapi rejimleri değerlendirildiğinde GM antijen pozitifliği saptanan 30 epizoddan 13’ü (%43.3) AML hastasıydı. Sayısal olarak çalışmamızda AML’li hastalardaki GM pozitifliği fazla olarak saptansa da altta yatan hastalık ve GM antijen yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.524$). GM pozitifliği saptanan 30 epizoddan 16’sında (%53.3) remisyon-indüksiyon kemoterapisi almakta olduğu gözlenmiştir. Alınan tedavi tipi ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.726$).

Hematoloji hastalarında GM antijen düzeyi ile nötropeni düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (127). Çalışmamızda nötropeni düzeyleri değerlendirildiğinde GM pozitifliği olan 30 epizodun 17’sinde (%56.7) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ ’ün altında saptanmıştır. Derin nötropenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da nötropeni düzeyi ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.095$).

Özellikle TZP gibi, mantarlardan elde edilen antibakteriyeller ile tedavi görüyor olmak GM pozitifliğine neden olmaktadır. Gerlinger ve arkadaşlarının 2012’de yaptıkları çalışmada TZP’ye bağlı GM yalancı pozitif sonuçlar nedeni ile TZP flakonlarının tedavi öncesi GM değerleri açısından test edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır (128). Bizim çalışmamızda antibakteriyel tedavi değerlendirildiğinde GM pozitifliği saptanan 30 epizodun 16’sında (%53.3)

piperasilin-tazobaktam kullanımı mevcuttu ve piperasilin-tazobaktam kullanımı ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.655$). Mikulska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da TZP kullanan ve kullanmayan hastalar arasında GM testi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış ve rastgele seçilen TZP şişelerinde de GM pozitifliği saptanamamıştır (129).

Mc Culloch ve arkadaşlarının 2012’de yaptığı bir çalışmada özellikle fungistatik etkili posakonazol gibi antifungallerin yöntemleri negatif yönde etkilediği ve sonuçların antifungal kullanımı dikkate alınarak yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır (130).

Marr ve arkadaşları ise serum örneklemesinden önceki onbeş gün içinde itraconazol, vorikonazol veya amfoterisin B gibi antifungal kullanan hastalarda testin duyarlılığının anlamlı şekilde düşük olduğunu bildirmişlerdir (80). Çalışmamızdaki örnekleme öncesinde veya örnekleme sırasında alınan antifungal tedavi değerlendirildiğinde GM pozitifliği olan 30 epizodun 23(%76.7) epizodunda tek antifungal kullanımı varken, 4 epizodunda (%13.3) iki ve üzeri antifungal kullanımı saptanmıştır. Tek veya ikili antifungal kullanımı ile GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.658$). GM pozitifliği olan 30 epizodun 20’sinde (%66.7) empirik antifungal kullanımı varken, GM pozitif 30 epizodun 11’inde (%36.7) pre-emptif antifungal kullanımı saptanmıştır. Empirik antifungal kullanımı ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamazken ($p=0.275$), pre-emptif antifungal kullanımı ve GM antijen testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**$p=0.020$**). Sonuç olarak antifungal kullanımının GM testi üzerine etkisi ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, genel olarak antifungal ilaçların testi etkileyebileceği bilinerek sonuçlar değerlendirilmelidir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İA tanısındaki mevcut güçlükler moleküler tanı yöntemlerini gündeme getirmiş ve farklı PZR tekniklerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Buna rağmen halen standardize edilmiş ve EORTC tanı kriterlerine dahil edilmiş bir moleküler yöntem bulunmamaktadır. İlk olarak Melchers ve arkadaşları 18S

rRNA genini kodlayan primerleri kullanarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Aspergillus* türlerine ait DNA'nın gösterilmesinde PZR yöntemini kullanmışlardır. Sonrasında yapılan birçok PZR çalışmasında da hedef olarak bu gen bölgesi seçilmiştir (131). PZR testini değerlendiren çalışmalarda örnek tipi (serum, plazma, BAL), ekstraksiyon protokolü (enzimatik, mekanik, otomatize, ticari kit), amplifikasyon sistemi (nested, geleneksel), protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve geleneksel), hedeflenen gen bölgesi (18S rRNA, 28S rRNA vb) ya da primler seçimi (*Aspergillus* ya da tüm küflere özgül, panfungal) gibi çok sayıda faktörde büyük çeşitlilik gözlenmektedir (132). Martinez ve arkadaşlarının serum ve plazma örneklerini karşılaştırdığı çalışmasında iki örnek arasında duyarlılık farkı olmadığı belirtilmiştir. BAL'ın PZR testi için İA'nın erken tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bazı yayınlarda bildirilse de, ekzojen kaynaklı sporların inhalasyonu ve akciğerde kolonizasyonu gibi nedenlerle yanlış pozitif PZR sonuçları görülebilmektedir (132-133).

İn-house yöntemlerin ticari kitlelere göre daha az maliyetli olması, cihaz ve kit bağımlılığı gerektirmemesi gibi özellikleri olsa da kapalı sistemlerde çalışılmaması, kontaminasyon riski varlığı, daha uzun zamanda sonuçlanması, tekrar edilebilirliğinin, kantitasyonunun ve standardizasyonunun zor olması, çok sayıda hasta örneğinin aynı anda çalışılmaması gibi dezavantajları da mevcuttur.

Bu çalışmamızda kullandığımız MycAssay PZR kiti serum örnekleri için standardize edilmiş, Eylül 2010'dan itibaren kullanılmakta olup Avrupa'ya uygunluk (CE) onayı almış ticari bir kittir. Artus Qiagen PZR kiti ise 2013 yılında piyasaya sürülmüş tür düzeyinde saptama yapan özellikle RotorGeneQ platformu için tasarlanmış ticari bir kittir.

EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde Artus Qiagen PZR testinin duyarlılığı %47.6, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %64.5 ve doğruluk %73 olarak saptanmıştır. Serum düzeyinde yapılan hesaplamalara göre, EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde Artus Qiagen PZR testinin duyarlılığı %18, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %45.3 ve doğruluk %51 olarak saptanmıştır.

EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlar değerlendirildiğinde MycAssay PZR testinin duyarlılığı %61.9, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %71.4 ve doğruluk %80.5 olarak saptanmıştır. Serum düzeyinde yapılan hesaplamalara göre, EORTC'ye göre kanıtlanmış ve olası İA olarak sınıflandırılan epizodlardaki PZR uygulanan bütün serumlar değerlendirildiğinde MycAssay PZR testinin duyarlılığı %21, seçiciliği %100, PPD %100, NPD %46.3 ve doğruluk %52 olarak saptanmıştır.

Mengoli ve arkadaşlarının yaptığı bir meta-analiz değerlendirmesinde, 2000-2008 yılları arasında yapılmış 16 çalışma (1618 hastaya ait 10.000 tam kan, serum veya plazma örneği) incelenmiş. Kanıtlanmış ve olası IA vakalarında tek pozitif PZR sonucu için duyarlılık ve özgüllük sırası ile %88 ve %75, PPD %36.7, NPD %97.4 bulunmuş. Ardışık pozitif PZR sonucu için duyarlılık ve özgüllük sırası ile %75 ve %87 bulunmuş. Tek bir negatif PZR sonucu kanıtlanmış veya olası IA tanısını dışlamak için yeterken, tanıyı doğrulamak için ardışık pozitif PZR sonucu gerektiği, çünkü tek PZR için duyarlılık daha yüksek iken, ardışık PZR için seçiciliğin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Genel olarak çalışmalar arasındaki performans değerleri arasında farklılıkların seçilen popülasyonlar ve kullanılan PZR methodları arasındaki homojenite eksikliklerine bağlı olabileceği düşünülmüş. Bütün bu standardizasyon farklılıklarının PZR'ın hastalık tanımlamalarında yer alamamasını ve geniş çapta kabul görememesini açıkladığı belirtilmiş. PZR methodları arasındaki heterojenite sebeplerinin: seçilen örneğin çeşidi (tam kan, serum, plazma), test edilen örnek volümü (200µl-10ml), DNA ekstraksiyon prosedürü (enzimatik veya mekanik parçalama), seçilen hedef gen, PZR ürününün saptanması ve uygun kontrollerin kullanılmasındaki farklılıklar olarak özetlenmiş. Meta-analiz kapsamındaki çalışmalarda profilaktik ve empirik kullanım da dahil olmak üzere eş zamanlı kullanılan antifungal ajanlar yetersiz şekilde rapor edildiği ve bu ajanların kullanımının olasılıkla PZR'ın sensitivitesini azalttığı üzerinde durulmuş (83).

Danylo ve arkadaşlarının yaptığı 35 hematoloji hastasından (4 kanıtlanmış, 12 olası, 19 şüpheli ve İA olmayan) 146 serumun test edildiği bir çalışmada MycAssay *Aspergillus* PZR kiti değerlendirilmiş ve GM testi ile karşılaştırılmış. Her bir epizodun kendi içinde ve her bir testin kendi içinde analizi yapılmış.

Kanıtlanmış ve olası İA epizodları epizod düzeyinde değerlendirildiğinde, MycAssay için duyarlılık %43.8 ve özgüllük %63.2, testler düzeyinde yapılan analizde de duyarlılık %23.5, özgüllük %83.3 bulunmuş. MycAssay PZR, GM'a göre daha düşük bir seçiciliğe (GM seçiciliği %93.1) ve 1.5 gibi daha düşük pozitif olabilirlik oranına (GM için 4.63) sahip bulunmuş. PZR tek bir olası İA tanısında zaman kazandırırken, GM yerine kullanımda iki vakanın tanısını geciktirmiştir. Sonuçlarına göre olası İA'dan daha çok kanıtlanmış İA'da daha duyarlı olduğunu bu nedenle, kanıtlanmış ve olası İA oranı belirtilmediği ve daha yüksek oranda kanıtlanmış İA içeren bir çalışma yapılacak olursa epizod düzeyinde duyarlılığın artabileceği vurgulanmış. GM ile karşılaştırıldığında MycAssay PZR'ın duyarlılığı arttırmadığı ve GM'dan daha düşük seçiciliğe sahip olduğu gözlenmiş ve MycAssay için daha ileri çalışmaların gerekliliği üzerinde durulmuştur (134).

Loeffler ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 68 kan kültür örneğinin hiçbirinde *Aspergillus fumigatus* izole edilemezken, PZR ile 68 örneğin 17'sinde (%25) *Aspergillus* DNA'sı tespit etmişlerdir (135).

Millon ve arkadaşlarının serum örneklerinde uyguladıkları mitokondriyal ve ribozomal DNA bölgelerini hedefleyen real-time PZR yönteminde %57 duyarlılık, %94 özgüllük oranları bildirmişlerdir (136).

Hebart ve arkadaşlarının febril nötropenik hematolojik maligniteli ve HKHT hastalarında yaptıkları bir çalışmada panfungal primerler kullanarak prospektif olarak değerlendirdikleri 92 epizodda (48 kanıtlanmış ve olası İA hastalarından oluşan) in-house PZR'ın %100 duyarlılığı, %73 seçiciliği olduğunu bildirmişlerdir (137).

Halliday ve arkadaşlarının febril nötropenik epizodları olan hematolojik maligniteli ve HKHT hastalarında kan örneklerinde prospektif olarak nested PZR uyguladıkları bir çalışmada kanıtlanmış ve olası İA grubunda %100 duyarlılık, %75 özgüllük oranları bildirmişlerdir (138).

El Mahallawy ve arkadaşlarının pediatrik hastalarda 91 febril nötropenik epizod değerlendirerek ve panfungal primerler kullanarak yaptığı bir çalışmada %75 duyarlılık, %92 özgüllük oranları bildirmiş olsalar da hasta grubunun büyük

çoğunluğu kanıtlanmış ve olası İA olan hastalardan oluşmuş olması yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarını açıklamaktadır (139).

White ve arkadaşlarının 2011 yılında, bizim de bu çalışmada kullandığımız ticari *Aspergillus* PZR yöntemi (MycAssay *Aspergillus*) ve in house real-time PZR yöntemini serum örneklerinde karşılaştırdıkları çalışmalarında 10 kanıtlanmış/olası İA vakasından 104 serum, 21 yüksek riskli vakadan 66 serum örneği test edilmiş MycAssay *Aspergillus* PZR'ın tek test için %70 duyarlılık, %90.5 özgüllük çoklu test için %60 duyarlılık, %100 özgüllük saptarken in-house PZR tek test için %80 duyarlılık, %100 özgüllük çoklu test için %50 duyarlılık, %100 özgüllük oranı olduğunu bildirmişlerdir (11).

White ve arkadaşlarının 2010'da, 2006 yılında oluşturulmuş olan Avrupa *Aspergillus* PZR inisiyatifi grubu (EAPCRI) adına *Aspergillus* PZR standardizasyonu için çeşitli merkezlere yolladıkları tam kan üzerine hazırladıkları kalite kontrol panellerine göre birçok merkezin amplifikasyon protokollerinin benzer saptama eşik değerine sahip olduklarını görürken, amplifikasyon ve ekstraksiyonun beraber değerlendirildiğinde %50 merkezin aynı saptama eşiğini yakalayamadıklarını görmüşlerdir (140).

White ve arkadaşlarının 2011'de EAPCRI grubu adına serum PZR protokollerini değerlendirdikleri bir çalışmada %86.1 duyarlılık ve %93.6 özgüllük oranları saptamışlardır. Daha büyük örnek hacimleri, internal kontrol ve ITS bölgesinin hedeflendiğinde daha yüksek duyarlılık oranlarına ulaşırken, elüsyon hacminin yüksek tutulduğu ve mitokondriyal genlerin hedeflendiği protokollerde daha düşük duyarlılık oranlarının elde edildiğini vurgulamışlardır. Çalışmaya dahil edilen 22 merkezden elde edilen 29 farklı ekstraksiyon ve amplifikasyon protokollerinin sonuçlarına göre %97'sinin tek bir çalışmada, %83'nün de tekrarlı çalışmada ml'de 10 genomluk eşik değeri saptayabildiklerini görmüşlerdir. Kırmızı ve beyaz küre hücrelerinin lizisi gibi teknik detaylardan dolayı tam kana göre serum örneklerinin daha kolay test edildiğinin, özellikle ticari ekstraksiyon methodlarının kullanımı ile standardizasyon ve kalite kontrolün sağlanabileceği vurgulamışlardır. Tek bir serum örneğinden GM, beta-D-glukan ve PZR testlerinin uygulanabilir olmasının yüksek riskli hasta grubunun taramasında verimlilik sağlayabileceği belirtilmiştir (141).

Torelli ve arkadaşlarının 2011'deki çalışmalarında BAL örneklerinde PZR ve GM testini değerlendirdiklerinde PZR'ın doğrulayıcı bir test olarak seçiciliği arttırmak üzere kullanılabileceğini belirtmişlerdir (142).

Pini ve arkadaşlarının 2014'de yaptıkları prospektif bir çalışmada 64 hastanın 71 epizodundan (2 kanıtlanmış İA, 28 olası İA, 40 kontrol) elde ettikleri serumdan 500 µl ekstrakte ederek MycAssay *Aspergillus* PZR kiti GM ile karşılaştırıldığında GM için %50 duyarlılık, %95.1 özgüllük, PPD %88.2, NPD %72.2 bulunurken, MycAssay PZR için %46.7 duyarlılık, %97.6 özgüllük, %93.3 PPD, %71.4 NPD saptamışlar ve iki test arasında belirgin fark olmadığını belirtmişlerdir. Yine yatılan servis, altta yatan hastalık, antifungal tedavi (profilaktik, empirik ve pre-emptif) ve diğer İA dışı enfeksiyonlar açısından iki grup arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Ekstraksiyon aşamasında eklenecek bir internal kontrolün platformun performansını olumlu yönde etkileyebileceğini vurgulamışlardır (143).

Öz ve arkadaşlarının 2015'de yayınladıkları 99 hastanın 161 epizoddan (1 kanıtlanmış İA, 17 olası İA, 60 şüpheli İA, 83 İA riskli) elde ettikleri 358 serum örneğinin çalışıldığı bir araştırmada klinik karakteristiklerden altta yatan hastalık, kemoterapi rejimi, dozu, antifungal, antibakteriyel tedavi, nötropeni düzeyi değerlendirildiğinde iki grup arasında anlamlı fark saptanmazken, hospitalizasyon süresi, nötropeni süresi, T hücre baskılayıcı terapi değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmuştur. Diğer çalışmalarda ve bizim çalışmamızda olduğu gibi yüksek örnek hacimlerinin real-time PZR'ın performansını arttırdığını belirtmişlerdir (144). Yine aynı hasta grubu ve aynı örneklerle Aslan ve arkadaşlarının 2015'de yaptıkları bir çalışmada MycAssay PZR kiti için %65.3 duyarlılık ve %57.8, GM için %23 duyarlılık ve %90.3 özgüllük GM ile PZR'ın birlikte kullanımı ile %73.7 duyarlılık ve %50.6 özgüllük saptamışlar, PPD ve NPD üzerine hastalığın prevalansının etkili olabileceği üzerinde durmuşlardır (145).

White ve arkadaşlarının 2015'de EAPCRI adına yaptığı 1 kanıtlanmış, 18 olası İA vakasından 190 çift ve 42 kontrol grubundan 203 çift toplam 393 serum ve plazma örneğinde PZR'ın klinik performansını değerlendirdikleri bir çalışmada serum örneklerinin tam kana göre daha düşük duyarlılık gösterdiğini ve DNA konsantrasyonunun plazmada daha yüksek olduğunu bunun da sebebinin

serumdaki pıhtı formasyonu sırasında DNA'nın bunun içinde kalmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Serum örneklerinde tek PZR testi için duyarlılık %68.4, özgüllük %76.2 ve çoklu PZR pozitifliği için duyarlılık %42.1, özgüllük %95.2 iken tek plazma PZR testi için duyarlılık %94.7, özgüllük %83.3 ve çoklu plazma PZR için duyarlılık %68.4, özgüllük %100 bulunmuştur. Plazma pozitiflik zamanının da serumdan daha önce olduğunu saptamışlardır. Plazma PZR, 13 vakada tek başına erken belirteç iken diğer tanı testleri ile kombine edildiğinde de 5 vakada erken belirteç olmuştur (146).

White ve arkadaşlarının 2015'de yaptıkları sistematik literatür incelemesinde PZR (duyarlılık %76.8-%88, özgüllük %75-%94.5) ve GM (duyarlılık %81.6, özgüllük %91.6) için benzer duyarlılık ve özgüllük değerlerini saptamışlardır (147).

İA epizodu sırasında kanda bulunan *Aspergillus* DNA varlığı her zaman devam eden bir durum değil, aynı GM salınımında olduğu gibi değişkendir ve doğru tespit için ardışık örnekleme bu yüzden çok önemlidir. Bizim çalışmamızda da düzenli ve kurallı bir biçimde her hastadan eşit oranda örnek toplanamamış, hatta bazı hastalarda vefat ya da başka bir merkeze sevk gibi nedenlerden dolayı tek serum örneği ile sınırlı kalmıştır. GM ve PZR duyarlılıklarının bu sebepten de etkilenebileceği araştırmalarda belirtilmektedir (134).

GM testi ilk olarak taze serum örneğinde uygulansa da bizim çalışmamızda olduğu gibi PZR testi araştırma amaçlı tasarlanan çalışmalarda, uzun dondurulma süreci ve test öncesinde istemeden de olsa tekrarlı dondurma-çözdürme işlemlerine maruziyet sebebiyle DNA miktarı düşmekte, dolayısıyla kitin performansı etkilenmektedir (148).

Her ne kadar hasta karakteristikleri ve EORTC/MSG ve benzeri tanı kriterleri kullanılmış olsa da, çalışmalarda seçilen popülasyonların büyüklüğü ve daha da önemlisi IA prevalansları arasında kayda değer farklılıklar mevcuttur. Altta yatan hastalık, kullanılan kemoterapötik rejim ve HKHT varlığı IA riskini belirlemekle birlikte prevalansı ve kullanılan tanısal testin performansını da etkilemektedir. Bununla beraber, PZR testini febril nötropeni sırasında veya pnömoniye düşündüren pulmoner infiltrat varlığında tanı amaçlı kullanan merkezlerde prevalans daha yüksek iken, hastalık başlamadan önce tarama amaçlı

kullanan merkezlerde beklenildiği üzere prevalans düşüktür. Prevalans düşük ise, tek PZR negatifliği ortada klinik şüphe de yoksa İA tanısını dışlayabilir. Bunun aksine, iki veya daha fazla PZR pozitifliği, mevcut vaka tanısını şüpheli hastalıktan, olası hastalığa yükseltmek için mikolojik doğrulama amaçlı kullanılabilir (83).

Mengoli ve arkadaşlarının üzerinde durduğu önemli bir nokta da gelecek çalışmalar açısından PZR testinin, hastalık belirtisi olmayan yüksek riskli vakalarda İA varlığını veya yokluğunu göstermek için ve hastalığı doğrulama veya dışlama için kullanımı konusunda net bir sonuç elde etmeyi amaçlaması gerektiğidir. Pozitif sonuçları içeren çalışmaların, negatif sonuçları içeren çalışmalara göre daha çok yayınlanmasının literatürdeki yanlış pozitif sonuçları açıklayabileceğini belirtmektedirler (83).

İnvaziv aspergillozda sporlar inhale edildikten sonra akciğer alveollerinde birikmekte ve hif formu gelişmektedir. Fungal DNA (sporlar ve/veya hifler) bu evrede dolaşıma salınabilmektedir. Bu durum klinik belirtilerin başlamasından çok önce gelişebilir. Akut lösemili veya HKHT yapılan hastaların prospektif çalışmaları sonucunda klinik belirtilerden yaklaşık beş gün önce, PZR'ın en erken invaziv fungal enfeksiyon belirleyicisi olarak değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (137).

Cuenca-Estrella ve arkadaşlarının ardışık real-time PZR, GM ve YRBT'yi beraber değerlendirdikleri bir çalışmada kanıtlanmış İA'lu hastalarda GM pozitifliğinden 65 gün önce, YRBT'den 67 gün önce PZR pozitifliği bildirmişlerdir (149). Bizim çalışmamızda GM pozitifliğinden ya da YRBT'den önce saptanan herhangi bir PZR pozitifliği bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra çalışmamızda kanıtlanmış İA epizodu bulunmamakla birlikte, olası İA olarak tanımlanan iki ayrı epizodda GM ve PZR pozitifliği YRBT'den 8 gün önce gerçekleşmiştir.

Millon ve arkadaşlarının 29 hastadan (2 kanıtlanmış, 6 olası, 11 şüpheli, 11 İA riskli) ilk GM pozitifliği saptanan serum örneklerinde real-time PZR uyguladıkları çalışmada GM pozitif-PZR pozitif sonucun antifungal terapiye başlanmasını sağlayabileceği gibi, GM pozitif-PZR negatif sonucun maliyetli antifungal uygulamaların ertelenmesini destekleyebileceğini belirtmişlerdir (150).

Reinwald ve arkadaşlarının BAL örneklerinde GM ve PZR'ı değerlendirdikleri çalışmada GM ve PZR'ın birlikte kullanımıyla duyarlılık %83'e NPD %89'a yükselmiştir (151). Bizim çalışmamızda GM pozitifliğinden önce saptanan herhangi bir PZR pozitifliği bulunmamakla birlikte bu sonuca bağlı olarak GM antijen testi ve real-time PZR (Artus Qiagen PZR veya MycAssay *Aspergillus* PZR) testinin birlikte kullanımı ile duyarlılıklarda yükselme görülmemiştir.

Danylo ve arkadaşlarının MycAssay *Aspergillus* real-time PZR performansını değerlendirdikleri bir çalışmada GM pozitif serum örneklerinde doğrulama amacı ile PZR uyguladıklarında serum düzeyinde değerlendirmede PZR PPD'i %39.3'den %77.8'e yükselirken, NPD'i %72'den %41.7'e düşmüştür. Bizim çalışmamızda ise Artus Qiagen PZR testi ve MycAssay PZR testi GM testi pozitif serum örneklerinde doğrulama testi olarak kullanılacak olursa Qiagen PZR duyarlılığı %33.3'e (önceki değeri %18), MycAssay PZR duyarlılığı %38.9'a (önceki değeri %21) yükselirken, esas olarak negatif prediktif değerleri Qiagen PZR için %45.3'den %76'a, MycAssay PZR testi için %46'dan %77.6'a yükselmiştir. Yani sadece, tanı testinin uygulandığı grupta negatif sonucu olanların gerçekte hasta olmama olasılığı artmıştır.

Altta yatan hastalık, kemoterapi rejimi ve antibakteriyel kullanımının her iki PZR testinin da sonuçları üzerine etkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir.

Artus Qiagen PZR testi pozitifliği olan 10 epizodun 7'sinde (%70) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında saptanmıştır. Artus Qiagen PZR pozitifliği derin nötropenik olan grupta fazla olsa da nötropeni düzeyi ile Artus Qiagen PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.159$). MycAssay *Aspergillus* PZR testi pozitifliği olan 13 epizodun 8'inde (%61.5) nötrofil sayısı $100/\text{mm}^3$ 'ün altında saptanmıştır. Derin nötropenik olan grupta pozitiflik fazla olsa da yine nötropeni düzeyi ile MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.265$).

Öz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada derin nötropeni olan grupta real-time PZR ve geleneksel PZR yönteminin duyarlılığı daha yüksek saptanmıştır (144).

Hem deneysel hayvan modellerinde hem de klinik şartlarda yapılan çalışmalarda antifungal terapinin GM ve PZR sonuçlarını negatif olarak etkileyebileceği belirtilmiştir (152).

Çalışmamızın verilerine göre antifungal tedavi değerlendirildiğinde, tek antifungal kullanımı olan 33 epizodun 8'inde (%24.2) Artus Qiagen PZR testi pozitifliği izlenmiştir. MycAssay *Aspergillus* PZR pozitifliği ise tekli antifungal kullanımı olan 33 epizodun 11'inde de (%33.3) izlenmiştir. Çalışmamızda tekli antifungal tedavi alan hastalarda daha az oranda PZR pozitifliği saptansa da tek antifungal kullanımı veya ikili antifungal kullanımı ile Artus Qiagen PZR testi ya da MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Empirik antifungal kullanımı olan 27 epizodun 3'ünde (%11.1) Artus Qiagen PZR testi pozitifliği varken, pre-emptif antifungal kullanımı olan 11 epizodun 7'sinde (%63.6) pozitiflik saptanmıştır. Empirik antifungal kullanımı olan 27 epizodun 5'inde (%18.5) MycAssay *Aspergillus* PZR testi pozitifliği varken, pre-emptif antifungal kullanımı olan 11 epizodun 8'inde (%72.7) pozitiflik saptanmıştır. Çalışmamızda özellikle empirik antifungal tedavi alan hastalarda daha az oranda PZR pozitifliği görülmüş ve empirik antifungal kullanımı (**p=0.017**), pre-emptif antifungal kullanımı ile Artus Qiagen PZR testi ya da MycAssay *Aspergillus* PZR testi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (**p=0.001**).

Antifungal tedavi ekstraksiyon üzerinde etki yapmasa da PZR'ın saptadığı tespit limitini düşürerek negatif PZR sonucuna yol açabilmekte, bu yüzden de etkili bir ekstraksiyon yönteminin ve daha fazla miktarda örnek kullanılmasının antifungal etkiyi engelleyebileceği belirtilmektedir (153).

EAPCRI grubunun 2011 yılında Avrupa'daki farklı merkezlerde çalışılan kan örneklerindeki PZR sonuçlarını ve performanslarını içeren ve PZR aşamalarına yönelik öneriler içeren bir rapor yayınlamışlardır. Bu önerilerden en önemli olanı çalışmamızdaki verilerle benzer olarak yüksek örnek hacimleri kullanılmasıdır. Negatif ve pozitif ekstraksiyon kontrolleri ile internal kontrollerin kullanılması ve ekstraksiyon aşamasının sonunda DNA elüsyon hacminin 100 µL'den az olması gibi diğer öneriler de mevcuttur (141).

Fungal yükün az olduğu serum gibi örneklerde yüksek örnek hacimlerinin kullanımının ekstraksiyon etkinliğini arttıracak genel olarak bilinmektedir. Çalışmamızda, hematolojik maligniteli hasta grubundaki özellikle kan değerleri ve genel durum düşüklüğü gibi nedenlerle bu kadar fazla hacimde serum örneği elde edilmesi her hasta için mümkün olmamıştır. Çalışmada kullanılan serum miktarının PZR üzerine etkinliği değerlendirildiğinde 400 µL'nin altındaki serum örneklerinde her iki PZR testi için de 400 µL ve üzerinelere göre daha düşük oranda pozitiflik bulunmuş olup, istatistiksel olarak belirgin fark saptanmıştır (Artus Qiagen PZR **p=0.014**, MycAssay *Aspergillus* PZR **p=0.020**).

Suarez ve arkadaşlarının 100 µl ve 1000 µl hacimlerde serum örneklerinde real-time PZR duyarlılığını değerlendirdikleri çalışmalarında artan serum miktarıyla PZR duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir (121).

Artus Qiagen PZR kiti 168 serum örneğinin 18'inde (%10.8) ve 41 epizodun 10'unda (%24.4) pozitiflik saptamıştır. PZR pozitif bulunan 10 epizodda (10 olası İA) Artus Qiagen PZR kitinin saptadığı türlerin dağılımı: 5 epizodda *A.flavus*, 3 epizodda *A.fumigatus* ve 2 epizodda *A.terreus* şeklindedir. MycAssay Myconostica PZR kiti ise 168 serum örneğinin 21'inde (%12.5) ve 41 epizodun 13'ünde (%31.7) (13 olası İA) pozitiflik saptamıştır. Qiagen PZR sadece 3 farklı *Aspergillus* türünü saptayabilirken, MycAssay PZR kiti 15 farklı *Aspergillus* türü saptayabilmektedir. MycAssay PZR kiti ile bizim çalışmamızda da olduğu gibi daha çok pozitiflik saptanmasının nedeninin bu olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kullandığımız Platelia *Aspergillus* Galaktomannan antijeni (Platelia *Aspergillus*, BioRad, France)(PA-ELISA) ilk olarak 1999'da Avrupa'da ilk çıktığında üretici firma tarafından pozitif cut-off değeri 1.5 olarak piyasaya sürülmüştür. Bu değeri destekleyecek bir kanıt olmadığı için son yıllarda birçok araştırmacı daha düşük cut-off değerlerini önermiştir (1,0.8 ve 0.7 gibi). Amerika'da 0.5 değeri ile 2003 yılında serum örnekleri için FDA onayı aldıktan sonra üretici firma, Avrupa'daki hematolojik maligniteli hastaların GM takiplerindeki verilerin ROC analizlerine dayanarak birçok diğer ülkedeki cut-off değerlerini 0.5'e düşürmeye karar vermiştir (154).

Bizim merkezimizde de 0.5 cut-off değeri esas alınsa da hem Artus Qiagen PZR kiti hem de MycAssay *Aspergillus* PZR kiti ile pozitif sonuç bulunan

serumların çalışılan GM cut-off değerlerinin genel olarak 1'den büyük olması dikkat çekicidir ve GM pozitif indeks değerinin 1'den büyük olması ile her iki PZR testinin pozitifliği arasında istatistiksel olarak belirgin fark saptanmıştır (**p<0.001**).



6. SONUÇ

Hematolojik maligniteli hastalarda İA varlığı açısından serum örneklerinde kullanılmak üzere hem Artus Qiagen *Aspergillus* hem de MycAssay *Aspergillus* PZR kitinin beklenenin altında performans göstermişlerdir. Bu nedenle İA tanısında kullanılan indirek mikrobiyolojik testler sınıfında tek başına rutin bir tanı testi olarak yer almak yerine erken tanı ve pre-emptif tedaviyi yönlendirmek amacıyla destekleyici olarak kullanılabilir. Riskli hastaların taramasında kullanılmak üzere PZR standardizasyonu için girişimlere ve daha birçok prospektif, geniş kapsamlı, özellikle klinisyen desteği ile iyi kurgulanmış çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, altta yatan hastalık, kemoterapi rejimleri, nötropeni şiddeti ve antibakteriyel kullanımının GM ve PZR testi performansı üzerine etkisi ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı bulgu saptanmamış olmakla birlikte benzer çalışmalar değerlendirildiğinde testlerin sonuçlarının yorumlanması sırasında bu ve benzeri birçok faktörün göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

GM antijen testi ve moleküler yöntemler ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar gösterse de invaziv olmayan tanı yöntemleri olarak erken tanıda oldukça ümit vaad edicidir. Özellikle İA açısından yüksek riskli hasta gruplarında bu testler için daha yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları bildirilmektedir. Bunun yanı sıra serolojik ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanılması ile duyarlılık oranlarının artacağı düşünülmektedir. Her ne kadar maliyeti yüksek testler olsa da kar-zarar oranı hesaplanarak hem yan etkileri hem de maliyeti yüksek antifungallerin gereği dışında kullanımı önlenebilir bir diğer açıdan bakacak olursak etkili ve zamanında antifungal tedavi ile yüksek mortalite azaltılabilir.

7. ÖZET

Hematolojik Maligniteli Hastaların İnvaziv Aspergillozis Varlığı Açısından Değerlendirilmesinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Tanı Değerinin Araştırılması

Hematolojik malignite nedeni ile indüksiyon kemoterapisi alan ve Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu nedeni ile yoğun tedavi altındaki hastalar İnvaziv Aspergillozis (İA) gelişimi açısından risk altındadır. Riskli gruptaki hastalarda özgül olmayan yüksek rezolüsyonlu bilgisayar tomografisi ve klinik bulgular, konvansiyonel methodların uygulanım zorluğu gibi nedenlerle tanı geç konulmakta bazen net bir tanıya ulaşılamamaktadır. Erken tanı, hızlı bir şekilde antifungal terapinin başlanmasını ve dolayısıyla uzun süreli yatış ve tedavi maliyetlerinin, en önemlisi de mortalitenin azalmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada, ilk çıkan ticari Aspergillus gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kiti olan MycAssay Aspergillus kiti ile bir diğer yeni ticari Aspergillus gerçek zamanlı PZR kiti olan Artus Qiagen Aspergillus kitini serum örneklerinde kullanarak febril nötropeni nedeni ile takip edilen hematolojik maligniteli hastalarda IA tanısındaki performansını değerlendirdik.

Ocak 2015 - Ocak 2016 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisi ve Yetişkin Kök Hücre Transplantasyon Ünitesinde takip edilen IA açısından riskli 32 hastanın 41 febril nötropenik epizoduna ait 168 serum çalışılmıştır. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler, IA için risk faktörü olabilecek veriler sorgulandı ve klinik izlemleri kaydedildi. Referans tanı olarak European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG)'nin 2008 yılında revize ettiği IA tanı kriterleri (Kanıtlanmış, olası, şüpheli IA) kullanıldı. Buna göre yapılan sınıflamada hastaların izlenen hiçbir epizodunda kanıtlanmış (proven) IA saptanmadı. İzlenen 41 epizodun; 21'i olası (probable) IA, 7'si şüpheli (possible), 13'ü ise IA riski taşıyanlar olarak sınıflandırıldı. Artus Qiagen PZR kitinin duyarlılığı %47.6, seçiciliği %100, pozitif prediktif değeri (PPD) %100,

negatif prediktif değeri (NPD) %64.5 ve doğruluk %73 olarak saptandı. MycAssay Aspergillus PZR kitinin duyarlılığı %61.9, seçiciliği %100, PPD'i %100, NPD'i %71.4 ve doğruluk %80.5 olarak saptandı.

Hematolojik maligniteli hastalarda İA varlığı açısından serum örneklerinde kullanılmak üzere ticari PZR kitlerinin tek başına rutin bir tanı testi olarak kullanılması yerine erken tanı ve pre-emptif tedaviyi yönlendirmek amacıyla destekleyici testler olarak kullanılması mümkündür. PZR testinin mikrobiyolojik tanı kriterleri arasında yer alması için çok merkezli, özellikle klinisyen desteği ile iyi kurgulanmış çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: İnvaziv Aspergilozis, ticari *Aspergillus* gerçek zamanlı PZR kiti, galaktomannan.

8. ABSTRACT

Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the Presence of Invasive Aspergillosis in Patients with Haematologic Malignancies

Patients who are receiving induction chemotherapy due to haematologic malignancies and patients who are under intense therapy cause of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, have risk of Invasive Aspergillosis (IA). Diagnosis may be uncertain or delay in these group of patients because of nonspecific clinic presentation, high resolution computed tomography findings, lack of sensitivity and difficult application techniques of conventional methods. Early diagnosis can provide initial antifungal therapy accordingly reduce long hospitalization periods, high costs of therapy and most of all prevent high mortality.

In this study, we investigated the performance of first commercial real-time Aspergillus Polymerase Chain Reaction (PCR) Mycassay of Myconostica and another novel commercial Aspergillus PCR assay of Qiagen with using serum samples for the IA diagnosis of patients with febrile neutropenic episodes.

The study was conducted in Akdeniz University Medical Faculty Hospital, Haematology and adult stem cell transplantation units. Between January 2015 and January 2016, 168 serum samples of 41 febrile neutropenic episodes belong to 32 patients with risk of IA were tested. We also collected the demographic data and clinical characteristics which can be a risk for IA.

The reference diagnosis of IA was assessed according to revised definitions of European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria published in 2008. According to the definitions, there was no proven IA patient in our study. 21 patients were probable IA, 7 patients were possible IA and 13 patients were under the risk of IA. Artus Qiagen PCR assay had a sensitivity of 47.6%, specificity of 100%, positive and negative predictive values were 100% and 64.5%, respectively. MycAssay Aspergillus PCR assay had a sensitivity of 61.9%, specificity of 100%, positive and negative predictive values were 100% and 71.4%, respectively.

Instead of the use of commercial PCR assays as a single test for IA diagnosis in serum samples from haemathologic patients in routine clinical practice, it is much more suitable as a supporting test for conducting of early diagnosis and pre-emptive therapy. Further well designed investigations with clinician correlation and multicenter comprehensive studies are required to accept PCR tests as a part of microbiological diagnostic tests for IA.

Key words: Invasive Aspergillosis, commercial *Aspergillus* real-time PCR assay, galactomannan.



9. KAYNAKLAR

1. Riwes MM, Wingard JR. Diagnostic methods for invasive fungal diseases in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol* 2012; 5(6): 661-9.
2. Binder U, Lass-Florl C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3(1): e20110016.
3. Uzun Ö. İnvaziv Fungal İnfeksiyonların Değişen Epidemiyolojisi. In: Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö, editors. Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi 2006; 21-6.
4. Girmenia C, Finolezzi E, Federico V, Santopietro M, Perrone S. Invasive Candida infections in patients with haematological malignancies and hematopoietic stem cell transplant recipients: current epidemiology and therapeutic options. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3(1): e2011013.
5. Mayr A, Lass-Florl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. *Eur J Med Res* 2011; 16(4): 153-7.
6. Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis* 2007; 45(9): 1161-70.
7. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91(8): 1068-75.
8. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46(12): 1813-21.
9. Akan H. Fungal infeksiyonlarda EORTC tanımları. *ANKEM Derg* 2009; 23 (Ek 2): 130-4.
10. Morrissey CO. Advancing the Field: Evidence for New Management Strategies in Invasive Fungal Infections. *Curr Fungal Infect Rep* 2013; 7(1): 51-8.

11. White PL, Perry MD, Moody A, Follett SA, Morgan G, Barnes RA. Evaluation of analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay Aspergillus when testing serum specimens for diagnosis of invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6): 2169-74.
12. Kuştımur S, Kalkancı A. Moleküler Mikoloji Laboratuvarının Tasarımı, Kurulması, Yönetimi ve Beklentiler. *Moleküler Tanı Dergisi* 2007; 3(1): 101-6.
13. Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol* 2011; 3: 175-91.
14. Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27 Suppl 1: 3-6.
15. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52(3): 197-205.
16. İnci R. Aspergilloz. In: Ustaçelebi Ş, Tümbay E, editors. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 1093-8.
17. Perkhof S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G, Krause R, Honigl M, et al. The Nationwide Austrian Aspergillus Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(6): 531-6.
18. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sa M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med* 2009; 35(1): 55-62.
19. Rex JH, Walsh TJ, Nettleman M, Anaissie EJ, Bennett JE, Bow EJ, et al. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2001; 1; 33(1): 95-106.
20. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brucker G. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J Hosp Infect* 2002; 51(4): 288-96.
21. Nosari A, Oreste P, Cairoli R, Montillo M, Carrafiello G, Astolfi A, Muti G, Marbello L, Tedeschi A, Magliano E, Morra E. Invasive aspergillosis in haematological malignancies: clinical findings and management for intensive chemotherapy completion. *Am J Hematol* 2001; 68(4): 231-6.

22. Patterson TF. *Aspergillus* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone 2010; 3241-55.
23. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* 2010; 50(8): 1101-11.
24. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; 50(8): 1091-100.
25. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; 100(13): 4358-66.
26. Luong ML, Chaparro C, Stephenson A, Rotstein C, Singer LG, Waters V, Azad S, Keshavjee S, Tullis E, Husain S. Pretransplant *Aspergillus* colonization of cystic fibrosis patients and the incidence of post-lung transplant invasive aspergillosis. *Transplantation* 2014; 97(3): 351-7.
27. Rosenhagen M, Feldhues R, Schmidt J, Hoppe-Tichy T, Geiss HK. A risk profile for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Infection* 2009; 37(4): 313-9.
28. Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M, Perego CA, Boeckh M, Marr KA. Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2010; 50(12): 1588-97.
29. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2007; 45(2): 205-16.
30. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30(4): 782-800.
31. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359(17): 1766-77.
32. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, Plantinga TS, van Spruel AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 2011; 203(5): 736-43.

33. Cunha C, Aversa F, Lacerda JF, Busca A, Kurzai O, Grube M, et al. Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014; 370(5): 421-32.
34. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* 2010; 116(24): 5394-402.
35. Lambourne J, Agranoff D, Herbrecht R, Troke PF, Buchbinder A, Willis F, et al. Association of mannose-binding lectin deficiency with acute invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2009; 49(10): 1486-91.
36. Walsh TJ, Dixon DM. Nosocomial aspergillosis: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. *Eur J Epidemiol* 1989; 5(2): 131-42.
37. Kiraz N. Aspergillus, Fusarium ve Diğer Fırsatçı Hiyalen Mantarlar. In: A. B, editor. *Klinik Mikrobiyoloji Ankara, Atlas Kitapçılık* 2009; 1802-22.
38. Kuştımur S. Aspergillus, Fusarium Türleri ve Diğer Küf Mantarları. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi* 2008; 2458-63.
39. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med* 2009; 360(18): 1870-84.
40. Eren A, Kuştımur S, Kalkancı A, Ünverdi S, Aktaş F, Türköz Sucak G. Hastanede yapılan inşaat çalışmalarının immün sistemi baskılanmış hastaların bulunduğu çevre ve fırsatçı küf enfeksiyonları gelişimi üzerindeki etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2008; 42(1): 83-93.
41. Anaissie EJ, Costa SF. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin Infect Dis* 2001; 33(9): 1546-8.
42. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, Spencer T, Kasai M, Francesconi A, Walsh TJ. Pathogenic Aspergillus species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin Infect Dis* 2002; 34(6): 780-9.
43. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006; 63(3): 246-54.
44. Hansen D, Blahout B, Benner D, Popp W. Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *J Hosp Infect* 2008; 70(3): 259-64.

45. Koch A, Heilemann KJ, Bischof W, Heinrich J, Wichmann HE. Indoor viable mold spores--a comparison between two cities, Erfurt (Eastern Germany) and Hamburg (Western Germany). *Allergy* 2000; 55(2): 176-80.
46. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34(7): 909-17.
47. Balajee SA, Marr KA. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. *Future Microbiol* 2006; 1(4): 435-45.
48. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-50.
49. Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, Francesconi A, et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2007; 195(3): 455-66.
50. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol* 2010; 150(4): 406-17.
51. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest* 2002; 121(6): 1988-99.
52. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 2011; 20(121): 156-74.
53. Patterson K, Strek ME. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7(3): 237-44.
54. Sharma OP, Chwogule R. Many faces of pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 1998; 12(3): 705-15.
55. Fernandez-Ruiz M, Silva JT, San-Juan R, de Dios B, Garcia-Lujan R, Lopez-Medrano F, Lizasoain M, Aguado JM. *Aspergillus* tracheobronchitis: report of 8 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2012; 91(5): 261-73.
56. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006; 43(5): 577-84.
57. Tasci S, Glasmacher A, Lentini S, Tschubel K, Ewig S, Molitor E, Sauerbruch T, Luderitz B, Rabe C. Pseudomembranous and obstructive

- Aspergillus tracheobronchitis* - optimal diagnostic strategy and outcome. *Mycoses* 2006; 49(1): 37-42.
58. van Assen S, Bootsma GP, Verweij PE, Donnelly JP, Raemakers JM. *Aspergillus tracheobronchitis* after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(10): 1131-2.
 59. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis* 2003; 37 Suppl 3: S265-80.
 60. McCarthy M, Rosengart A, Schuetz AN, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Mold infections of the central nervous system. *N Engl J Med* 2014; 371(2): 150-60.
 61. Sivak-Callcott JA, Livesley N, Nugent RA, Rasmussen SL, Saeed P, Rootman J. Localised invasive sino-orbital aspergillosis: characteristic features. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(5): 681-7.
 62. Riddell IV J, McNeil SA, Johnson TM, Bradley SF, Kazanjian PH, Kauffman CA. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis: report of 3 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81(4): 311-20.
 63. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. *Clin Infect Dis* 2001; 32(1): 50-62.
 64. van Burik JA, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3115-21.
 65. Gonzalez-Vicent M, Diaz MA, Colmenero I, Sevilla J, Madero L. Primary gastrointestinal aspergillosis after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: an unusual presentation of invasive aspergillosis. *Transpl Infect Dis* 2008; 10(3): 193-6.
 66. Kontoyiannis DP, Mathur M, Chen YB, Shellito PC, Tse JY. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 13-2014. A 41-year-old man with fever and abdominal pain after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014; 370(17): 1637-46.
 67. Horger M, Hebart H, Einsele H, Lengerke C, Claussen CD, Vonthein R, Pfannenberger C. Initial CT manifestations of invasive pulmonary aspergillosis in 45 non-HIV immunocompromised patients: association with patient outcome? *Eur J Radiol* 2005; 55(3): 437-44.

68. Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis* 2011; 52(9): 1144-55.
69. Ellis D. Mycology Online. 2016.
70. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004; 39(10): 1467-74.
71. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 126(6): 852-60.
72. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190(3): 641-9.
73. Huang YT, Hung CC, Hsueh PR. *Aspergillus* galactomannan antigenemia in penicilliosis marneffeii. *AIDS* 2007; 21(14): 1990-1.
74. Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C, Cascio GL. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3): 1051-3.
75. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, Knox K, Hage C. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(5): 638-40.
76. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaheer A, Murray H, Mya-San C, Bacher J, Petraitis V. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4744-8.
77. Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, Estes L, Caliendo AM, Baden LR, et al. Reduction in false-positive *Aspergillus* serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol* 2014; 52(6): 2199-201.
78. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after

- haematopoietic stem cell transplantation. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 411-6.
79. Guigue N, Menotti J, Ribaud P. False positive galactomannan test after ice-pop ingestion. *N Engl J Med* 2013; 369(1): 97-8.
 80. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40(12): 1762-9.
 81. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2): 199-205.
 82. Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20(3): 711-27, viii.
 83. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(2): 89-96.
 84. Semighini CP, Delmas G, Park S, Armstrong D, Perlin D, Goldman GH. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31(1): 15-9.
 85. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(7): 1095-105.
 86. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2013; 51(5): 1510-6.
 87. Koo S, Thomas HR, Daniels SD, Lynch RC, Fortier SM, Shea MM, Rearden P, Comolli JC, Baden LR, Marty FM. A breath fungal secondary metabolite signature to diagnose invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2014; 59(12): 1733-40.
 88. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(1): 96-128.

89. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2015; 162(2): 81-9.
90. Marty FM, Cosimi LA, Baden LR. Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N Engl J Med* 2004; 350(9): 950-2.
91. Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad, II. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(12): 775-85.
92. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 408-15.
93. Howard A, Hoffman J, Sheth A. Clinical application of voriconazole concentrations in the treatment of invasive aspergillosis. *Ann Pharmacother* 2008; 42(12): 1859-64.
94. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 201-11.
95. McCormack PL, Perry CM. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 2005; 65(14): 2049-68.
96. Maertens J, Glasmacher A, Herbrecht R, Thiebaut A, Cordonnier C, Segal BH, et al. Multicenter, noncomparative study of caspofungin in combination with other antifungals as salvage therapy in adults with invasive aspergillosis. *Cancer* 2006; 107(12): 2888-97.
97. CRESEMBA (isavuconazonium sulfate). Highlights of prescribing information. [March 09, 2015].
98. Sugar AM. Overview: antifungal combination therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2(10): 1364-5.
99. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, Mellado E, Donders AR, Melchers WJ, Verweij PE. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; 5(11): e219.
100. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356(14): 1481-3.
101. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly

- resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis* 2013; 57(4): 513-20.
102. Denning DW, Bowyer P. Voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: should we be concerned? *Clin Infect Dis* 2013; 57(4): 521-3.
 103. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46(3):327-60.
 104. Safdar A. Immunotherapy for invasive mold disease in severely immunosuppressed patients. *Clin Infect Dis* 2013; 57(1): 94-100.
 105. Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Letscher-Bru V, Canuet M. Invasive pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25(2): 191-202.
 106. Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, Corey L, Driscoll T, Cornely OA, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood* 2005; 106(8): 2641-5.
 107. Groll AH, Tragiannidis A. Recent advances in antifungal prevention and treatment. *Semin Hematol* 2009; 46(3): 212-29.
 108. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356(4): 348-59.
 109. Marr KA. Empirical antifungal therapy--new options, new tradeoffs. *N Engl J Med* 2002; 346(4): 278-80.
 110. Cordonnier C, Maury S, Pautas C, Bastie JN, Chehata S, Castaigne S, Kuentz M, Bretagne S, Ribaud P. Secondary antifungal prophylaxis with voriconazole to adhere to scheduled treatment in leukemic patients and stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33(9): 943-8.
 111. Sipsas NV, Kontoyiannis DP. Clinical issues regarding relapsing aspergillosis and the efficacy of secondary antifungal prophylaxis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 2006; 42(11): 1584-91.
 112. Fisher CE, Stevens AM, Leisenring W, Pergam SA, Boeckh M, Hohl TM. The serum galactomannan index predicts mortality in hematopoietic stem cell transplant recipients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 201; 57(7): 1001-4.
 113. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4): 531-40.

114. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26(4): 781-803; quiz 4-5.
115. Karthaus M, Cornely OA. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Ann Hematol* 2005; 84(4): 207-16.
116. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis* 2007; 44(3): 373-9.
117. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(3): 161-72.
118. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41(9): 1242-50.
119. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; 125(1 Suppl): S14-24.
120. Baskova L, Buchta V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol (Praha)* 2012; 57(5): 421-30.
121. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe V, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46(11): 3772-7.
122. Morton CO, Loeffler J, De Luca A, Frost S, Kenny C, Duval S, Romani L, Rogers TR. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 4): 408-13.
123. Verweij PE. Advances in diagnostic testing. *Med Mycol* 2005; 43 Suppl 1: S121-4.
124. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, et al. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20(7): 1898-906.
125. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42(10): 1417-27.

126. Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 1: i5-14.
127. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, Pautas C, Maury S, Kuentz M, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(1): 81-6.
128. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C, Touratier S, Castaigne S, Eloy O. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect* 2012; 42(1): 10-4.
129. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Ratto S, Bacigalupo A, Viscoli C. Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(7): 1746-8.
130. McCulloch E, Ramage G, Rajendran R, Lappin DF, Jones B, Warn P, Shrief R, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Williams C. Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 2012; 65(1): 83-6.
131. Melchers WJ, Verweij PE, van den Hurk P, van Belkum A, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1710-7.
132. Bretagne S. Primary diagnostic approaches of invasive aspergillosis--molecular testing. *Med Mycol* 2011; 49 Suppl 1: S48-53.
133. Klingspor L, Loeffler J. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Med Mycol* 2009; 47 Suppl 1: S241-7.
134. Danylo A, Courtemanche C, Pelletier R, Boudreault AA. Performance of MycAssay *Aspergillus* DNA real-time PCR assay compared with the galactomannan detection assay for the diagnosis of invasive aspergillosis from serum samples. *Med Mycol* 2014; 52(6): 577-83.
135. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, et al. Polymerase chain reaction detection of *aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 2002; 185(8): 1203-6.
136. Millon L, Grenouillet F, Legrand F, Loewert S, Bellanger AP, Gbaguidi-Haore H, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(3): 1058-63.

137. Hebart H, Loffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181(5): 1713-9.
138. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, et al. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 132(4): 478-86.
139. El-Mahallawy HA, Shaker HH, Ali Helmy H, Mostafa T, Razak Abo-Sedah A. Evaluation of pan-fungal PCR assay and Aspergillus antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients. *Med Mycol* 2006; 44(8): 733-9.
140. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al. Aspergillus PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1231-40.
141. White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, et al. Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(11): 3842-8.
142. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L, Caira M, De Carolis E, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for Aspergillus DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12): 4273-8.
143. Pini P, Bettua C, Orsi CF, Venturelli C, Faglioni L, Forghieri F, et al. Clinical performance of a commercial real-time PCR assay for Aspergillus DNA detection in serum samples from high-risk patients: comparison with a galactomannan enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(1): 131-6.
144. Oz Y, Aslan M, Aksit F, Metintas S, Gunduz E. The effect of clinical characteristics on the performance of galactomannan and PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in febrile neutropenic patients. *Mycoses* 2016; 59(2): 86-92.
145. Aslan M, Oz Y, Aksit F, Akay OM. Potential of polymerase chain reaction and galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *Mycoses* 2015; 58(6): 343-9.
146. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and

- Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol* 2015; 53(9): 2832-7.
147. White PL, Wingard JR, Bretagne S, Loffler J, Patterson TF, Slavin MA, Barnes RA, Pappas PG, Donnelly JP. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis* 2015; 61(8): 1293-303.
 148. Bellete B, Flori P, Hafid J, Raberin H, Tran Manh Sung R. Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler. *J Microbiol Methods* 2003; 55(1): 213-9.
 149. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 379-84.
 150. Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, Rohrlach P, Costa JM, Bretagne S. Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 5097-101.
 151. Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaya E, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ, et al. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(9): 2260-7.
 152. Lass-Flörl C, Gung'or E, Gastl G, Bonatti H, Freund MC, Gschwendtner A, Kropshofer G, Dierich MP, Petzer A. Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 4154-7.
 153. White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn* 2006; 8(3): 376-84.
 154. 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. *Blood* 2001; 97(6): 1604-10.

10. EKLER

Ek 1. Hasta İzlem Formu

Adı-Soyadı-Dosya No:

Cinsiyet:

Yaş:

Epizod	Servis: Hemato. /KHT/ YBÜ	Yatış Tarihi:	Çıkış Tarihi:	Yattığı gün sayısı:
1				
2				
3				

Altta yatan hastalık (AML, ALL, NHL, lenfoma, burkitt, MM, MDS, GVHD):

Tanı tarihi:

Eşlik eden hastalık (HT, DM, KOAH, Ca):

Kemoterapi protokolü: İndüksiyon/ Konsolidasyon (idame)/ Rezistans (farklı KT)/ Relaps

Rejim:	Tarihi ve kür sayısı:

Son 90 günde T hücre baskılayıcılarının kullanımı (siklosporin, TNF- α blokerleri, monoklonal antikorlar-alemtuzumab gibi) veya nükleozid analogları kullanımı:

Antifungal profilaksi:	Başlangıç:	Bitiş:	Kaç gün:
Flukonazol			
posaconazol (Noxafil)			
Vorikonazol (Vfend)			
Mikafungin (mycamin)			

Antibakteriyel profilaksi:	Başlangıç:	Bitiş:	Kaç gün:
TMP-SMX			
Kinolonlar			

Antiviral profilaksi:	Başlangıç:	Bitiş:	Kaç gün:
Valsiklovir			

Epizod	Febril nötropeni tarihi:	Nötrofil Sayısı: >100/ <100	Nötropeni süresi: >10/ <10 gün
1			
2			
3			

HRCT tarihi:	HRCT sonucu: Nodül ve/veya halo (buzlu cam), kavitasyon, hava-hilal

Paranasal BT tarihi:	Paranasal BT sonucu:

Serum GM tarihi:	GM sonucu:	Qiagen sonucu:	Qiagen Ct değeri:	Myconostica sonucu:	Myconostica Ct değeri:

Kültür:	Sonuç:
Kan	
İdrar	
Balgam	

Histopatoloji:

EORTC tanımlamaları:

Kanıtlanmış	
Olası	
Şüpheli	

Antibakteriyel tedavi:	Başlangıç:	Bitiş:	Kaç gün:
Antipseudomonal penisilin			
Antipseudomonal sefalos.			
Karbapenemler			
Aminoglikozitler			
Kinolonlar			
Glikopeptitler			
Lipopeptitler			
Glisisiklinler			
Kolistin			

Antifungal tedavi:	Başlangıç:	Bitiş:	Kaç gün:
Po flukonazol			
Iv flukonazol			
Po voriconazole (Vfend)			
Iv voriconazole (Vfend)			
Itraconazole (Sporanox)			
Caspofungin (Cancidas)			
Mikafungin (mycamin)			
Liposomal amphotericin B (Ambizome)			