T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
Hematolojik maligniteli hastalarda invaziv pulmoner aspergilloz tanısında 'lateral flow' cihazının kullanılması

Proje No:
TSA-12-3951

Proje Türü
Tıp ve Sağlık Bilimleri

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Gökhan Metan, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D

Araştırmacılar
Uz. Dr. Muzaffer Keklik, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD
Yrd. Doç. Dr. Göçen Dinç, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Prof. Dr. Bülent Eser, İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD

Eylül 2013
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma için gerekli maddi desteği sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinasyon Birimi'ne, çalışma kapsamında veri toplanmasına destek veren Yrd. Doç. Dr. Çiğden Pala'ya, hastaların tüm radyolojik incelemelerini yeniden değerlendiren Yrd. Doç. Dr. Afra Yıldırım'a, serum örneklerini toplanması ve testlerin zamanında uygulanmasında gösterdiği hassasiyetten dolayı Kök-Biyotek çalışanlarına, Berkay Saraymen'e ve Doç. Dr. Mustafa Yavuz Köker'e, galaktomannan testlerini hibe eden Pfizer firmasına, beta-glukan teslerini temin eden Malcolm Finkelman'a ve Cape Cod firmasına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR..... 3

İÇİNDEKİLER 4

ÖZET…… 6

SUMMARY ……... 7

1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 8

2.GENEL BİLGİLER 9

2.1.İnvaziv aspergilloz epidemiyolojisi 9

2.2..İnvaziv aspergillozda tanı 9

2.2.1.Mikroskobik inceleme 10

2.2.2.Kültür 10

2.2.3. Histopatolojik inceleme 10

2.2.4.Radyoloji 10

2.2.5.Galaktomannan antijen testi 11

2.2.6.1-3 β-D Glukan Testi 12

2.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu 13

2.2.8. Aspergillus "lateral flow device" 14

3. HASTALAR VE YÖNTEM 16

3.1.Hasta seçimi ve serum örneklerinin toplanması 16

3.1.1. Hasta gruplarının seçilmesi 16

3.1.2. Serum örneklerinin toplanması 16

3.2. Çalışma döneminde hematoloji klinikleri ve kök hücre nakil merkezinde mantar enfeksiyonu tanı ve antifungal profilaksi protokolleri 16

3.3. Hasta verilerinin toplanması 18

3.4. Mantar enfeksiyonu tanısı alan hastaların kategorizasyonu 18

3.5. Serum örneklerinden serolojik testlerin uygulanması 18

3.5.1. Serum örneklerinde galaktomannan indeksinin belirlenmesi 18

3.5.2. Serum örneklerinde 1,3-beta-D-glukan düzeylerinin belirlenmesi 19

3.5.3 Serum örneklerinin Aspergillus "Lateral flow" yöntemi ile test edilmesi 20

3.6.İstatistiksel analiz 21

3.7. Çalışmayı destekleyen kurumlar 21

4. BULGULAR 22

4.1. Çalışmaya alınan hastaların demografik ve klinik özellikleri 22

4.2. Hastalarda saptanan mantar enfeksiyonları ve EORTC/MSG kriterlerine göre sınıflandırması 22

4.3. Galaktomannan, 1,3-beta-D-glukan ve Aspergillus "lateral flow" testlerinin tanısal etkinliklerinin analizi 24

5.TARTIŞMA 27

6. SONUÇLAR 31

KAYNAKLAR ……... 32

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı *Aspergillus*-"Lateral flow device" (LFD) cihazının invasiv aspergilloz (IA) tanısında yatakbaşı testi olarak uygulandığındaki etkinliğini belirlemektir.

Hastalar ve Yöntem: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Klinikleri ve Kök Hücre Nakli merkezinde yapıldı. Çalışmaya akut lösemi ve allojenik kök hücre nakli için kemoterapi verilen hastalar alındı. Aspergillus LFD için serum toplanmaya hastanın nötrofil sayısı 500/mm^3'ün altına düşünce başlandı. Nötropeniden çıkınca veya invasiv fungal hastalık (İFH) tanısı ile konunca sonlandırıldı. Çaılışma süresince hastalardan haftada iki kez kan alındı. *Aspergillus*-LFD (Dr Thornton, University of Exeter, UK) üretici önerilerine göre yapıldı. Hastalarda saptanan IFH Avrupa Kanser Tedavisi ve Araştırması Organizasyonu ve Mantar Çalışma Grubu tarafından geliştirilen kriterlere göre tanımlandı.

Bulgular: Çalışmaya Şubat 2012 ile Ocak 2013 arasında prospektif olarak izlenen 64 hastanın 75 nötropeni epizodu dahil edildi. Hastalardan 12'sinde yüksek olasılıklı invaviz akciğer aspergillozu (İAA) bir hastada aspergillus sinüziti ve iki hastada da fungemi saptandı. *Aspergillus*-LFD 13 İA olgusundan birinin serum örneğinde kuvvetli pozitif sonuç verirken bir başka İA'lu olgunun bronkoalvolar sıvısında iki günlük amfoterisin B tedavisine rağmen pozitif bulundu. Testin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri ve negatif predikitf değerleri sırasıyla; %13.7, %99.1, %1.9%, and %98 olarak belirlendi.

Sonuç: *Aspergillus*-LFD İa tansında yardımcı olabilecek bir testtir, fakat düşük duyarlılığı nedeniyle yatak başında hastalığı dışlama testi olarak kullanılmasını mümkün kılmamaktadır.

Anahtar kelimeler: Invasive aspergilloz, Aspergillus, "lateral flow" cihazı, galaktomannan, beta-d-glukan, lösemi, kök hücre nakli

SUMMARY

Background: The aim of this study is to investigate the performance of *Aspergillus*-Lateral flow device (LFD) as a bedside test for the diagnosis of invasive aspergillosis (IA).

Patients and methods:

The study was conducted at Erciyes University Haematology Clinics and Stem Cell Transplantation Centre. Patients who had undergone chemotherapy for acute leukaemia or allogenic stem cell transplantation were included in the study. Screening tests were started at the day of an absolute neutrophil count of <500/mm^3 until recovery of neutropenia or diagnosis of invasive fungal diseases (IFD). During the study period, serum was sampled twice a week from the patients. *Aspergillus*-LFD (provided by Dr Thornton, University of Exeter, UK), was performed based on the manufacturer's instructions. IFD were catogorized based on definitions of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and Mycoses Study Group.

Results: A total of 75 neutropenic episodes in 64 patients were prospectively followed between February 2012 and January 2013. Probable invasive pulmonary aspergillosis was detected in 12 patients, aspergillus sinusitis in one patient and fungemia in three patients. *Aspergillus*-LFD was strongly positive in the serum of 1 out of 13 patients with probable IA and moderately positive (despite two days of amphotericin B therapy) in the bronchoalveolar lavage of an other patient with probable IA. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were as; 13.7%, 99.1%, 1.9%, and 98%.

Conclusion: *Aspergillus*-LFD can be helpful for the rapid diagnosis of IA. However, it is not not a bedside rule-out test with low sensitivity.

Keywords: Invasive aspergillosis, Aspergillus, lateral flow device, galactomannan, beta-d-glucan, leukemia, stem cell transplantation

1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM

İnvaziv mantar enfeksiyonları, başta hematolojik maligniteli hastalar olmak üzere kök hücre ve solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda artan sıklıkla karşılaşılan, yüksek mortalite ve morbidite oranları ile seyreden bir klinik tablodur (1).

İnvaziv mantar enfeksiyonu (İME) tanısında en sık yararlanılan yöntemler klinik bulgular ve radyolojik yöntemlerdir, fakat bu değerlendirmelerin duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlıdır. Kesin tanı için siteril dokuda mantarın üretilmesi veya histopatolojik olarak hifa invazyonunun gösterilmesi büyük önem taşımakla beraber bu hastalarda sık karşılaşılan trombositopeni, hipoksi ve genel durum bozukluğu gibi sorunlar invaziv işlemlerin uygulanmasını zorlaştırmaktadır (1).

Günümüzde İME'nin erken ve doğru tanısı için üzerinde çalışmaların en yoğun olarak sürdüğü yöntemler, galaktomannan (GM) antijen testi ve 1,3 β-D glukan (BDG) testleridir (2). GM, Aspergillus'un hücre duvarına özgü bir polisakkarittir. Yapısı, mannoz rezidülerinden oluşan bir temel zincir ve kısa (1,5)-galaktofuranoz rezidülerinden oluşan yan zincirlerden oluşmaktadır (2). Aspergillus enfeksiyonları nötropenik hastalarda invaziv seyreder. Özellikle damarsal yapılara karşı afinitesi vardır ve çevre damarları invaze etmesiyle birlikte ürediği ortama GM antijeni salınır (3). Hematolojik malignitesi olan hastaların serumda 'Enzyme-linked immunosorbent assay' (ELISA) yöntemi ile GM antijeninin saptanmasının invaziv aspergilloz (İA) tanısında duyarlığı % 57-100 ve özgüllüğü % 66-100 olarak bildirilmiştir (4). BDG, Zygomycetes ve Cryptococcus neoformans dışındaki bir çok patojenik maya ve filamantöz mantarların hücre duvarında yer almaktadır. İME'nin tanısında duyarlılığı %55-100, özgüllüğü %52-100 olarak bulunmuştur (5, 6). Hematolojik maligniteli nötropenik hastalarda GM ve BDG testlerinin kombine kullanımının invaziv aspergilloz (İA) tanısında duyarlılık ve özgüllüğü artırdığı bildirilmiştir (7), fakat bu testlerin maliyetleri yüksektir ve uygulanmaları için iyi eğitimli laboratuvar ekibine ve pahalı cihazlara ihtiyaç vardır.

'Lateral flow device' (LFD) yöntemi hepatitten bruselloza kadar pek çok farklı enfeksiyon hastalığının tanısında başarı ile kullanılmaktadır. Uygulama için karmaşık ekipmanlar ve üst düzeyde eğitimli teknik personel gerektirmemesi en önemli avantajlarıdır (8). Bu çalışmanda hematolojik maligniteli hastalarda invaziv pulmoner aspergilloz (İPA) tanısında LFD kitinin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Klasik tanı yöntemlerine göre uygulaması kolay ve ekonomik maliyeti düşük bir test olan LFD'nin İPA tanısında özellikle hasta başı tanı testi olarak kullanımımda tanısal etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İnvaziv aspergilloz epidemiyolojisi

Aspergillus, doğada yaygın olarak bulunan bir mantar olup, insanlara bulaş genellikle inhalasyonla olur. İmmünolojik olarak normal kişilerde tamamen zararsız olan bu bulaş, konak immünitesi bozuk kişilerde allerjik hastalıklardan invaziv hastalıklara kadar uzanan değişik tablolara yol açabilir. Aspergillus cinsinde 19'dan fazla tür olmakla beraber *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* olguların büyük bir kısmında etken olarak izole edilmektedir (9).

İA özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda giderek artan sıklıkla görülen önemli mortalite ve morbidite nedenidir. İME olgularındaki bu artışın nedenleri arasında; kanser hastalarına daha güçlü kemoterapi rejimleri verilmesi ve bu hastaların yaşam sürelerinin uzaması, yoğun bakım hizmetlerinin artmasıyla invaziv işlemlerde ve kateter kullanımında artma, daha çok sayıda organ ve hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yapılmasıyla immun sistemi baskılanmış hasta sayısının artması ve otoimmün hastalıklarda daha yüksek doz immün baskılayıcı tedavi verilmesi sayılabilir (1, 10).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çok merkezli bir çalışmada altı yıl içerisinde HKHN yapılan 875 hastada gözlenen 983 İME'nin %43'ünün İA, %28'inin invaziv kandidiyazis ve %8'inin zigomikoz olduğu bildirilmiştir. *A. fumigatus* en sık görülen aspergilloz etkeniyken *C. glabrata* ve *C. albicans*'ın en sık invaziv kandidiyaz etkenleri olduğu gözlenmiştir. Transplantasyon sonrası İME için başlangıç zamanının kandidiyazda 61, aspergillozda 99, fusariyozda 123 ve zigomikozda 135'inci günlerde olduğu saptanmıştır (11).

Ülkemizden bir üniversite hastanesinde İME'nin epidemiyolojisini değerlendiren çalışmada ise bir yıllık sürede bağışıklık sistemi baskılanmış ve baskılanmamış 32 hastada 33 enfeksiyon atağı gözlemlenmiş olup, etkenler sırasıyla *C. albicans* (%63), *A. fumigatus* (%21) ve *C. glabrata* (%12) olarak bildirilmiştir (12). Üniversitemiz 2009 yılı sürveyans verilerine göre hematoloji ve kemik iliği transplantasyonu kliniklerinde bir yıllık dönemde bir kanıtlamış İPA, 27 yüksek olasılıklı ve 34 düşük olasılıklı İPA görülmüştür (13).

2.2.İnvaziv aspergillozda tanı

İA tanısında kullanılan başlıca yöntemler; mikroskobik inceleme, kültür, biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi, radyoloji, GM antijeni ve BDG'nin hasta serum ve vücut sıvılarında saptanması ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur. Steril doku örneklerinde mantar hücrelerinin gösterilmesi veya bu örneklerin kültürlerinde etken mantarın üretilmesi tanıda altın standarttır. Oysa özellikle hematolojik maligniteli hastalarda,

trombositopeni, hipoksi ve genel durum bozukluğu nedeniyle biyopsi veya derin doku örneklemesi genelde mümkün olmamaktadır (1).

2.2.1.Mikroskobik inceleme

Aspergilloz tanısında, direk mikroskobik yöntemlerin duyarlılığı yüksek ve hızlı olmalarına karşın özgüllüklerinde sorunlar vardır. Çünkü direk mikroskobik görünümler diğer filamantöz mantarlardan *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* ve *Scedosporium* gibi mantar enfeksiyonları ile karıştırılabilir. Direk mikroskobik inceleme yanında şeffaflaştırıcı olarak %10 potasyum hidroksit ile işlem sonrasında da inceleme yapılabilir. Gram boyama rutin olarak yapılmalıdır. Sitolojik boyalar, mantar boyaları ve floresan boyama yöntemlerinin kullanılmasının mikroskobik incelemenin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. Mantarlara özgü boyalar Gomorinin metamin gümüşleme boyaması (GMS) ve periyodik asit-Schiff (PAS)'dir. Bu boyalar özellikle biyopsi örneklerinde kullanılabilir. GMS daha duyarlıyken, PAS hücresel yapı ve detaylar hakkında bilgi verir. Floresan boyalardan 'Calcoflour White', 'Uvitex 2B' ve 'Blankophor' renksiz ve suda çözünebilen boyalardır. Bu boyama yöntemleri frozen kesitlerde parafinle kaplanmış dokularda, bronkoalveolar lavaj (BAL), korneal kazıntı gibi taze örneklerde kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanıldığı immunohistokimyasal, immunofloresan ve in situ hibridizasyon yöntemleri tanıda yardımcı diğer yöntemlerdir (2).

2.2.2.Kültür

Sabouraud's dekstroz agar (SDA), beyin-kalp infüzyon (BHI) agarı, sabouraud- BHI (SABHI) agar, inhibitör mold agar (IMA), Mikosel ve Mikobiyotik agar primer izolasyon amacı ile en sık kullanılan besiyeridir (49).

Kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kemik iliği örneklerinden yapılan kültürlerde aspergillus nadiren ürer. *Aspergillus* türleri anjioinvaziv olmalarına rağmen tüm İA olgularının %10'undan az bir bölümünde kan kültürü üremesi mevcuttur (2).

2.2.3. Histopatolojik inceleme

Mantar elemanlarının dokuda gösterilmesi için en sık kullanılan boyama yöntemleri PAS, GMS gümüşleme yöntemidir. Mantar türleri kültürde üretildiğinde etken, kontaminasyon ve kolonizasyon olasılıkları söz konusudur. Etkenin biyopside histopatolojik incelemede de gösterilmesi enfeksiyonun karakteristik göstergesidir (2).

2.2.4.Radyoloji

İA'da fungusun giriş yeri genellikle akciğer olmasına karşın akciğer grafisi yeterli bilgi vermez ve çoğu zaman normal olabilir. Akciğer, sinüs ve beyinde İA'dan şüpheleniliyorsa, tanının düşünüldüğü andan itibaren 24 saat içinde yapılan bilgisayarlı

tomografi (BT) veya magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile görüntülenmesi, tanı için geçen zamanı altı günden bir güne indirebilir (14).

İA'da erken BT bulguları tek veya çoklu nodül ve halo işaretidir. Nodül ve çevresinde kanama alanına bağlı olarak ortaya çıkan, nodülden daha az yoğunlukta buzlu cam alanı olarak tanımlanan halo işareti erken tanı ve tedavide önemlidir. Erken dönem bulgularından yaklaşık bir-iki hafta sonra kavitasyon ve hava-hilal belirtisi görülmektedir. Hava-hilal belirtisi nodülde nekroz ve nekrotik akciğer dokusunun komşu akciğer parankiminden ayrılmasıyla nodül içinde hilal şeklinde saydam alan oluşumuyla karakterizedir. Hava-hilal belirtisi genellikle nötropeniden çıkış döneminde artmış inflamatuvar yanıtla beraberdir ve geç dönem bulgusudur. Halo işareti semptomlar başlamadan yaklaşık 10 gün önce saptanabilmektedir (15). Yapılan çalışmalarda halo işaretinin görülme sıklığı %22-95 arasında değişmektedir. Bu radyolojik bulgular İA'yı öncelikle düşündürmekle beraber sadece bu hastalığa özgü değildir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Nocardia* türlerinin yanı sıra, *Zygomycetes*, *Fusarium* ve *Scedoporium* türleri gibi diğer anjioinvaziv filamentli mantarlara bağlı enfeksiyonlar da halo işaretine ve aspergilloz için tanımlanan diğer radyolojik görüntülere yol açabilir (16).

2.2.5.Galaktomannan antijen testi

Aspergillus'un hücre duvarına özgü bir polisakkarittir. Yapısı, α-mannoz rezidülerinden oluşan bir temel zincir ve kısa β(1,5)-galaktofuranoz rezidülerinden oluşan yan zincirlerinden oluşmaktadır. *Aspergillus* enfeksiyonları nötropenik hastalarda invaziv seyreder, özellikle damarsal yapılara karşı afinitesi vardır. *Aspergillus'*a ait hifalar çevre damarları invaze eder, ürediği ortama GM antijeni salgılanır. GM antijeni lateks aglütinasyon (LA) veya ELISA yöntemi ile serumda, plazmada veya vücut sekresyonlarında tespit edilebilir. ELISA testinin LA testine göre duyarlılığı ve özgüllüğünün daha yüksek olması nedeniyle son yıllarda tamamen ELISA yöntemi kullanılmaktadır (17). Monoklonal anti-galaktomannan antikoru EB-A2, Aspergillus GM'sinin (1→5)-β-D-galaktofuranosid yan zincirini tanır. monoklonal EB-A2 antikorunun hem yakalayıcı hem de peroksidaz ile işaretleyici olarak iki taraflı kullanıldığı sandviç ELISA yöntemi (Platelia® Aspergillus; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) geliştirilmiştir (17). Test sonucu GM indeksi (GMİ) olarak ifade edilir. GM testinin duyarlılığı %29-100 oranlarında değişkendir. Bu değişkenliğin çok sayıda nedeni vardır. Test öncesi antifungal kullanımı, yetersiz sıklıkla örnek alınması ve yöntemin uygulanması konusunda tecrübe eksikliği sık karşılaşılan sorunlardır. İA için risk altında olan hastalarda genelde haftada iki kez antijen düzeyinin değerlendirilmesi önerilmektedir (2). Erciyes Üniversitesi Hematoloji Kliniklerinde yapılan

ve 129 hastanın katıldığı çalışmada GM testinin duyarlılığı %56.8, özgüllüğü ise %84.6 olarak bulunmuştur (18).

Alınan kan örneğinin pamukla veya karton mikrosantrifüj tüpleri ile kontamine olması, soya ile enteral beslenme, çocuklarda, Bifidobacterium gastrointestinal kolonizasyonu beta-laktam yapısındaki antibiyotiklerin kullanılması, 'Plasmalyte' (sodyum glukonat) elektrolit solüsyonun intravenöz uygulanması ve siklofosfamid uygulaması yanlış pozitif GM nedenleri içinde sayılmaktadır (19).

2.2.6. 1-3 β-D Glukan Testi

BDG Zygomycetes ve Cryptococcus türleri dışında bir çok saprofitik ve patojen mantarın dış hücre duvarında bulunan bir yapıdır. BDG saptanmasında kullanılan 3 ticari kit Fungitell (Associates of Cape Cod Inc., East Falmount, MA), FungiTec G (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo) ve türbimetrik test Wako-WB003 (Waco Pure Chemical Industries, Osaka) mevcuttur. Testlerin tümünün yaygın özelliği BDG'nin 'horseshoe crab' (atnalı yengeci) hemolenfinden kaynaklanan amebositlerde koagülasyon kaskadını aktive etme yeteneğidir. 'Horseshoe crab' lizat ilk kez limulus testi kullanılarak endotoksin saptamak için kullanılmış ve 'horseshoe crab'ın bir tipi *Limulus polyphemus* olarak adlandırılmıştır. Endotoksin, faktör C olarak adlandırılan bir serin proteaz zimojen yoluyla koagülasyon kaskadını eyleme geçirir. Sonradan BDG ikinci bir serin proteaz enzimi olan faktör G aracılığıyla faktör C'den bağımsız olarak koagülasyon kaskadını eyleme geçirir (2). Batı dünyasında BDG saptanması için yaygın olarak kullanılan test Fungitell'dir. Bu kit dışındaki BDG testlerinin hematolojik maligniteli hastalarda kullanımı ile ilgili bilgi kısıtlıdır. Fungitell testi için eşik değerinin 60 veya 80 pg/mL olarak tanımlanması önerilmiştir (21).

İA'li hastalarda BDG düzeyi enfeksiyondan sorumlu mantar türüne, türün anjio-invaziv özelliğine, yapısına ve enfeksiyon süresince salınan BDG'nin molekül ağırlığına bağlıdır. Salınan BDG düzeyini konak düzeyinde etkileyen faktörler ise BDG içeren fungal doku yükünün düzeyi, organ enfeksiyonu bulunması, nötropeni derecesi ve immünsupresif durumun diğer belirteçleridir. Pan-fungal bir belirteçtir. İA dışında *Fusarium* türleri, *Acremonium* türleri, *Trichosporon* türleri, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium prolificans* ve *Histoplasma capsulatum* ile enfekte hastaların serumlarında saptanmıştır. Kanıtlanmış İA'lı hastalarda, beş gün içinde serum BDG düzeyinde önemli bir artış gösterilmiş, bu yüzden salınan antijen kinetiğinin gözlenmesi için haftada iki serum örneği incelemesi önerilmiştir (21). BDG testi, GM testinden daha erken pozitif olma eğilimindedir (7). Toplam 2979 hastayı içeren 16 çalışmanın değerlendirildiği meta-analizde BDG testinin mantar enfeksiyonu tanısındaki duyarlılığı %76.8, özgüllüğü ise %85.3 olarak bulunmuştur

(22). Hastanemizde yapılan 50'si kanıtlanmış veya yüksek olasılıklı İPA olgusu toplam 128 hastanın değerlendirildiği çalışmada BDG testinin duyarlılığı %66, özgüllüğü ise %75.6 bulunmuştur (23).

Tıpkı GM antijen testinde olduğu gibi BDG testinde de yalancı pozitiflik ile karşılaşılabilmektedir. Serum örneklerinde endotoksin varlığında, 1-3 β-D glukan içeren anti-tümör preparatları kullanımında, albümin, globülin veya diğer ticari kan ürünleri alan hastalarda, cerrahide pamuk, sargı bezi, ped kullanımında ve serozal yüzeylere glukan içeren sargı bezi temasında yalancı pozitiflik bildirilmiştir. Selüloz diyaliz membranlarının BDG içerdiği ve bu membranlar ile diyalize giren hastaların serumlarında BDG seviyesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (20). Test edilen örneklerin çevresel kontaminasyonu sonrasında da yanlış pozitif BDG sonuçları bildirilmiştir (24).

2.2.7.Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Moleküler tanı yöntemi olan PZR ile fungal deoksiribonükleik asit (DNA) yapıları tespit edilebilmektedir. Klinik kullanıma sunulan dört kadar Aspergillus PZR kiti olmasına rağmen, özellikle primerin standart olmaması bu yöntemde en önemli sorundur. Moleküler tanı için serum ve BAL örnekleri kullanılmaktadır. İlk çalışmalar DNA'nın BAL'dan elde edilmesine yöneliktir. Moleküler tanıda hem yalancı pozitifliklere hem de yalancı negatifliklere rastlanılmaktadır. Konidiyumların solunum havasında yoğun olarak bulunmasından dolayı yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilir (25)

PZR'ın İA tanısında rolünü araştıran bir meta-analizde toplam 1618 hastanın katıldığı 16 çalışma incelenmiş, tanı için duyarlılığının %75, özgüllüğünün ise %87 olduğu bildirilmiştir. Testin tanısal kabul edilebilmesi için ardışık iki pozitif sonuç elde edilmesi gerektiği saptanırken, tek negatif testin İA'u ekate edebileceği rapor edilmiştir (26).

Üniversitemizden yapılan, İA şüphesi olan 87 hastanın incelendiği ve 57 hastaya İA tanısı konan çalışmada kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İA'sı olan 36 hastanın 31 (%86.1)'inin BDG testi pozitif, 15 (%41.6)'inin GM testi pozitif ve 8 (%22.2)'inin PCR testi pozitif olarak bulunmuştur. BDG ve GM testlerinin birlikte kullanımı ile duyarlılık %71.9, özgüllük %91 olarak bulunmuştur. BDG, GM ve PCR testlerinin birlikte kullanımı ile duyarlılığın %73 olduğu tespit edilmiştir, fakat bu uygulama yüksek test maliyetini de beraberinde getirmektedir (27).

2.2.8. Aspergillus "lateral flow device"

İmmnükromotografi ilkesi ile geliştirilen "Lateral flow device" cihazı pek çok farklı enfeksiyon hastalığının tanısında uzun yıllardır başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Kısa süre

önce tamamlanan 704 HIV pozitif hastanın değerlendirildiği çalışmada, *Cryptococcus neoformans* enfeksiyonu tanısında LFD'nin duyarlılığı %94 özgüllüğü ise 100% rapor edilmiştir (28). LFD'nın İA tanısından kullanılabilmesi için ilk çalışma İngiliz araştırmacı Chris Thornton tarafından başlatılmıştır. Fareden geliştirilen hibrid hücre kültürü üzerinde aspergillus spesifik monoklonal JF5 antikoru geliştirilmiştir. Bu antikor *Aspergillus fumigatus*'un hifaların dokuya invazyonu sırasında sırasında salınan bir hücre dışı glikoproteinin epitopuna bağlanma yeteneğine sahiptir. Elde edilen aspergillus spesifik monoklonal antikor (MAB JF5) nitrosellüloz zarlara emdirilmiştir. Testin prensibi İA gelişmiş olan hastada aspergillus antijenin ile MAB JF5 birleşerek presipitasyon bandları oluşturmasıdır. İlk çalışmada sağlıklı kan bankası donörleri ve diğer yöntemlerle daha önce İPA tanısı konulmuş hastalar test edilmiştir. LFD sağlıklı donörlerden alınan dört serum örneğinde de negatif bulunmuş; yüksek olasılıklı İPA olgularından dördünde negatif bulunurken sekizinde test pozitif saptanmıştır. Pozitif sonuç saptanan hastaların üçünde bu sonuca serum örneği 1/10 oranında dilüe edildikten sonra ulaşılabilmiştir. LFD çeşitli mantarlardan elde edilen süpernatanlarla test edildiğinde ise Aspergillus dışında hiçbir mantar türü ile pozitif reaksiyon vermemiştir (28). LFD'nin GM ve BDG testleri ile karşılaştırıldığı deneysel çalışmada ise nötropenik Hartley Gine domuzlarında İPA geliştirilmiş ve hayvanlardan 3, 5 ve yedinci günlerde serum örnekleri alınmıştır. LFD deneyinin üçüncü gününde pozitif sonuç vermeye başlarken GM ve BDG testleri beşinci günde pozitif sonuç vermiş; yedinci günde alınan serum örnekleri ise her üç yöntemle de pozitif bulunmuştur (29). Yedinci günde alınan serum örnekleri duyarlılığı üç test yöntemi içinde %100 olarak belirlenirken, LFD'nın 15 dakika gibi kısa bir sürede pozitif sonuç verebilmesi uygulama için özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyulmaması en önemli üstünlüğü olarak görülmüştür (29).

İPA'nın mikrobiyolojik tanısı amacıyla kullanılan GM, BDG ve Aspergillus PZR testleri pahalı ve uygulanması için özel laboratuvar ekipmanı ve eğitimli personel gerektiren testlerdir. Maliyet etkinlik prensipleri göz önüne alındığında GM, BDG, PZR testlerinin yapılması için örneklerin biriktirilmesinin gerektiği ve haftanın bir veya iki günü testlerin yapılabildiği görülmektedir. Aspergillus LFD ise uygulanması son derece kolay maliyeti diğer antijen testlerinden belirgin olarak düşük olan bir testtir. Her hasta için tek bir kitin kullanılıyor olması nedeniyle her hasta örneğininin aynı gün içinde test edilerek birkaç saat içerisinde sonuç verilebilmektedir. Aspergillus LFD yöntemi İPA tanısında ümit verici olmakla beraber yöntemin yaygın olarak kullanılabilmesi için daha geniş kapsamlı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Aspergillus LFD kitini geliştiren araştırmacı tarafından testin uygulaması konusunda iki yöntem tanımlanmıştır. Yöntemlerin birincisinde serum örneği daha önceden hazırlanmış doku kültür sıvısı ile birebir oranında karıştırıldıktan sonra LFD kitine pipet aracılığıyla 100µl'si aktarılmaktadır. İkinci yöntemde ise serum önce EDTA'lı solüsyonla karıştırılmakta sonrasında ısı banyosunda bekletilmektedir (30). Birinci yöntem testin hasta başı tanı yöntemi olarak kullanılmasına izin verirken ikinci yöntem testin laboratuvar şartlarında yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışmada Aspergillus LFD testinin hasta başı testi olarak performansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1.Hastalardan serum örneklerinin toplanması

3.1.1. Hasta gruplarının seçilmesi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınan izni (Tarih: 03.01.2012, No:2012/22) takiben Şubat 2012- Ocak 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji Onkoloji Hastanesi Hematoloji Klinikleri ve Şahinur Dedeman Kemik İliği Nakli ve Kök Hücre Tedavi Merkezi'ne akut myeloid lösemi (AML), akut lenfositer lösemi (ALL) veya miyelodisplastik sendrom (MDS) tanısı ile kemoterapi almak veya allojenik kök hücre nakli (AKHN) yapılmak üzere hastaneye yatırılan ve kemoterapi sonrası 7 günden uzun süre nötropenik (nötrofil sayısı <500 mm^3) kalacağı tahmin edilen 18 yaş üzeri hastalara çalışma hakkında bilgi verildi ve yazılı onay veren hastalar çalışmaya dahil edildi.

3.1.2. Serum örneklerinin toplanması

Hastalarda nötrofil sayısı 500/mm^3'ün altına düştüğünün tespit edilmesiyle birlikte haftada iki kez 10 mL kan alındı. Alınan kanın 5 mL'si klinikte rutin olarak istenen GM testi için laboratuvara gönderilirken kalan 5 mL Aspergillus LFD ve BDG testleri yapılana kadar -20°C'da saklandı. Hastanın nötrofil sayısınının 500/mm^3' ün üstüne çıkması veya İPA tanısı ile tedavi başlanması ile serum örneği toplanmasına son verildi. Empirik antifungal tedavi alan hastalarda ve başlangıçta GM testi pozitif rapor edilip antifungal tedavi başlanan hastalarda GM negatifleşene kadar serum örneği alınmaya devam edildi. Bir hasta nötropeniden çıkıp en az 15 gün süreyle nötrofil sayısı normal seyrettikten sonra tekrar başlanan kemoterapi ile yeniden nötropeniye girerse aynı protokolle tekrar çalışmaya alındı.

3.2. Çalışma döneminde hematoloji klinikleri ve kök hücre nakil merkezinde mantar enfeksiyonu tanı ve antifungal profilaksi protokolleri

Hastalara uygulan tanı ve tedavi yöntemlerine hematoloji kliniği doktorları ve enfeksiyon hastalıkları kliniği konsültanı tarafından karar verildi. Tanı protokolü Türk Toraks Derneği Bağışıklığı Baskılanmış Erişkinlerde Gelişen Pnömoni Tanı ve Tedavi Uzlaşı Raporu ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği Febril Nötropeni Rehberi göz önüne alınarak hazırlanmıştır (31, 32). Uygulanan mantar enfeksiyonu tanı protokolü aşağıda özetlenmiştir:

- Galaktomannan (GM) antijen (Platelia Aspergillus ELISA, Bio-Rad Laboratories) testi AML, ALL, MDS tanısı ile kemoterapi alan veya AKHN yapılacak hastalarda hasta nötropeniye girdiği dönemden itibaren (nötrofil sayısı <500 mm3) hafta iki kez rutin olarak uygulanır.

- Febril nötropeni gelişen hastalarda ateş 3-4 gün içerisinde geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine yanıt vermez ve ateşi açıklayacak bir neden bulunamazsa hastalara çoklu kesitli akciğer bilgisayarlı tomografi (BT) ile toraks görüntülemesi yapılır.
- Ateş ve akciğer enfeksiyonu bulguları olsun veya olmasın GM pozitifliği GM indeksi >0.5) saptanan tüm hastalara GM testinin klinik bulgular ortaya çıkmadan on gün önce pozitifleşebileceği bilgisi göz önüne alınarak akciğer BT ile radyolojik değerlendirme yapılır.
- Ateşi olsun veya olmasın öksürük, balgam, nefes darlığı gibi akciğer enfeksiyonu bulguları olan hastalara akciğer BT ile radyolojik değerlendirme yapıldı. Radyolojik inceleme nodüler lezyon, pnömonik konsolidasyon, kavitasyon, hava-hilal işareti gibi İPA ile ilişkili olabilecek bulgular saptanan hastalar göğüs hastalıkları uzmanı tarafından değerlendirilir. Kontrendikasyon olmayan (trombosit sayısı 20.000/mm^3'ün altında, ağır hipoksi ve solunum sıkıntısı gibi) hastalara mikrobiyolojik tanının kesinleştirilebilmesi için bronkoskopi yapılır. Bronkoalveolar lavaj (BAL)'dan aerop kültür, mantar kültürü, direk mikroskopik inceleme, aside dirençli basil için boyama, tüberküloz kültürü ve GM antijen testi yapılır.

Antifungal profilaksi protokolü (32):

Primer profilaksi:

- AML remisyon-indüksiyon kemoterapisi alan hastalara nötropeni başlangıcından itibaren nötroepniden çıkıncaya kadar veya tedavi amaçlı antifungal tedavi başlayana kadar posakonazol 3X200 mg ağız yoluyla
- 10 günden uzun nötropenik kalması beklenen ALL hastalarına nötropeni başlangıcından itibaren nötropeniden çıkıncaya kadar veya tedavi amaçlı antifungal tedavi başlayana kadar flukonazol 2X200 mg ağız yoluyla
- AKHN yapılan hastalara ötropeni başlangıcından itibaren nötropeniden çıkıncaya kadar veya tedavi amaçlı antifungal tedavi başlayana kadar flukonazol 2X200 mg ağız yoluyla

Sekonder profilaksi:

- Daha önce mantar enfeksiyonu geçiren hastalarda bir önceki mantar enfeksiyonu epizodunda tedavide etkin bulunan antifungal ajan kemoterapi protokolünün başlamasıyla beraber

3.3. Hasta verilerinin toplanması

Hastaların demografik özellikleri, tanısal testlerin sonuçları (Yaş, cinsiyet, alt hastalık, antifungal profilaksi için verilen ilaçlar, nötropeniye girme tarihi, LFD testi uygulandığındaki nötrofil sayısı, uygulanan antibakteriyelve/veya antifungal tedaviler, kan kültürü sonucu, galaktomannan antijeni testi sonuçları, akciğer Çoklu kesitli Bilgisyarlı Tomografi (BT) sonuçları, bronkoalveolar lavaj (BAL) kültür sonucu, BAL direk mikroskopi inceleme sonucu, BAL GM antijen testi sonucu, immünoglobülin uygulaması, hemodiyaliz uygulaması, trombosit ve eritrosit infüzyonu tarihleri) ve uygulanan tedaviler kayıt edildi.

3.4.Mantar enfeksiyonu tanısı alan hastaların kategorizasyonu

İPA varlığı "European Organization for Research and Treatment of Canser/Invasive Fungal Infections Cooperative Group"(EORTC) ile "Mycoses study Group"un (MSG) birlikte geliştirdiği tanımlar kullanıldı (Tablo 1) (1).

Tablo 1. İnvasiv pulmoner aspergilloz varlığnın belirlenmesi için kullanılan kriterler (1)

KONAK FAKTÖRLERİ : 1.10 günden fazla devam eden <500/mm^3 nötropeni: 2.Allogenik kök hücre transplantasyonu **KLİNİK KRİTER:** -BT'de 3 işaretten birinin olması: Halo belirtisi ile beraber nodül veya tek başına nodül Hava – Hilal belirtisi Konsolide alanda kavite TRAKEOBRONŞİT: Trakeobronşial ülserasyon, nodül, psödomembran, plak veya bronkoskopik analizde esker dokusunun görülmesi SİNÜZİT.: Sinüzitin radyolojik belirtileriyle beraber aşağıdaki bulgulardan en az birinin bulunması: Akut lokalize ağrı Siyah eskarla birlikte nazal ülser Paranazal sinüslereden orbitayı da içene alacak şekilde genişleme
MİKOLOJİK KRİTERLER Doğrudan (sitoloji, mikroskopi veya kültür) balgamda, BAL'da, bronş fırçalama materyalinde Aspergillus'a işaret eden fungal yapı yada kültür de *Aspergillus,* türlerinin üretilmesi veya Dolaylı testlerle (antijen ya da hücre duvarı yapısı saptanması) , serum, BAL'da galaktomannan antijen testinin pozitif olması (Serumda 0.5'in üzerinde olması BAL'da 1'in üzerinde olması) , Serumda 1,3- beta-D-glukan pozitif olması (> 80 pg/mL)
MUHTEMEL İPA; konak faktör + klinik kriter **YÜKSEK OLASILIKLI İPA**; konak faktör+klinik kriter + mikolojik kriter **KANITLANMIŞ İPA;** steril doku örneğinden yapılan kültürde aspergillusun izole edilmesi veya sitopatolojik/histopatolojik olarak hifa gösterilmesi

3.5. Serum örneklerinden serolojik testlerin uygulanması

3.5.1. Serum örneklerinde galaktomannan indeksinin belirlenmesi

GM antijen indeksini belirlemek için Platelia Aspergillus ELISA kit (Bio-Rad Laboratories) üretici firma önerilerine uygun olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hastanesi Laboratuvarları'nda rutin tanı protokolünün bir parçası olarak uygulandı. Pozitiflik için sınır değer olarak 0.7 kabul edildi (33).

Klinik ve radyolojik bulgular ile İA tanısı konulan, fakat GMİ<0.7 olarak rapor edilen hastaların serum örnekleri test öncesi örnek hazırlama protokolü modifiye edilmiş bir yöntem ile tekrar test edildi (34). Test protokolü aşağıda özetlenmiştir:

- 1.5 ml. lik ependorfa örnek serumdan 300 µl kondu.
- Üzerine 200 µl treatment solüsyonu eklendi ve vortekslendi
- Su banyosunda tüpler 3 dk. 100 C'de ısıtıldı.
- 10.000.gx10 dk santrifüj edildi.
- Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmış olan seruma ait süpernatanttan 500 µl alınarak 1.5ml.lik 50kDA filtreli ependorflara kondu.
- 14.000 g.de 4-6 dk santrifüj edilir.
- Filtre üzerinde kalan 50 µl ELISA 'da kullanılmak üzere alındı.
- Bu 50 µl' lik süpernatan (kalıntı) 50 µl peroksidaz bağlı anti GM MAb EB-A2 içeren reaksiyon karışımına eklendi.

• Yüz mikrolitre karışım ayrı MAb EB-A2 ile kaplı mikrotitrasyon kuyucuğun kaynağına eklendi ve 37ºC' de 90 dakika inkübe edildi. Bu şekilde Aspergillus antijenini bulan bir MAb – GM – Mab/peroksidaz kompleksi oluşması sağlandı.

• Mikrotitre kuyucukları bağlanmamış materyali temizlemek için yıkandı ve 200 µl substrat solusyonu her kuyucuğa eklendi.

• Kuyucuklar karanlıkta oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

• Enzimatik reaksiyon 100 µl bitirme solusyonuyla (1.5 N sülfirik asit) sonlandırıldı.

• Materyallerin optik dansitesi 450 ve 620 nm filtre ile donatılmış spektrofotometri cihazı kullanılarak belirlendi.

• Enzim immunoassayden optik dansite verileri bir GMİ olarak kayıt edildi. GMİ her test örneği için, test kitinde klinik örneğin başlangıç serum optik dansitesine bölünmesiyle sağlanan optik dansite değeri olarak yorumlandı.

3.5.2. Serum örneklerinde 1,3-beta-D-glukan düzeylerinin belirlenmesi

BDG düzeyleri Fungitell (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA) kiti ile üretici firma önerilerine uygun olarak belirlendi. Deneyler aşağıdaki sıra izlenerek yapıldı.

• Beş µl serum örneğine 20 µl ayıraç (0,25 M KOH ve 1,2 M KCL) eklendi. Oluşan karışım 37ºC' de 10 dakika inkübe edildi. Bu işlem aracılığıyla hasta serumlarında bulunan protezlar inhibe edilmektedir.

- Beş µl ‘pathcyman’ (standart glukan) örneği 50, 25, 12.5 ve 6.25 pg/ml de standart eğrinin oluşturulmasında kullanıldı.
- Yirmi beş µl ‘Lysate reagent water ‘ (LRW) örneği ayıraç olarak kullanıldı.
- Fungitel reaktifi (1,3-beta-D-glukan spesifik Limulus Amebocyte Lysate) 2.8 ml LRW ve pirosol tampon (0,2 M Tris HCL:PH;7,4) ile sulandırıldı. Bu karışımın 100 µl’ si her örneğe ve standarta eklendi.
- Hazırlanan mikro kuyucuklar 37ºC’ de inkübe edilen THERMOmax (Molecular Devices) kuyucuk okuyucuya yerleştirildi. Kırk dakika süre ile emilimin değişen oranları kaydedildi. ‘GEN5 soft’ (Biotek) yazılımını kullanan kinetik okuma cihazı ile mikro kuyucukların kinetik analizi yapıldı.
- Pozitif sonuç için sınır değer olarak 80 pg/mL değeri kullanıldı (33).

Modifiye GM ve BDG testleri Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma merkezinde kurulan araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.5.3. Serum örneklerinin Aspergillus “Lateral flow” yöntemi ile test edilmesi

Aspergillıs “Lateral flow” (LFD) testi üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. Test prosedürü şu basamaklardan oluşmaktadır (30):

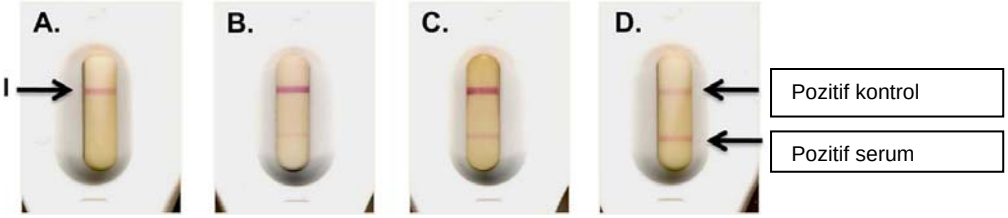
- Test için alınan kan örneği +4°C’da saklanarak pıhtılaşması beklendi.
- Ayrılan serum -20 °C’da saklandı.
- Serum doku kültür sıvısı (RPMI-1640 sıvısı, %10’luk fetal dana serumu, %1’lik 200mM L-glutamin solüsyonu ve %0.02 sodyum azid) hazırlandı. Bu sıvı +4 °C’da saklandı.
- Serum örneği test edileceği zaman vortekslendi ve 14000 rpm’de 1 dakika santirfüf edildi.
- Hasta serumu ile serum doku sıvısı 1:1 oranında dilüe edildi.
- Hazırlanan örnekten 100 µl pipet yardımı ile inkübasyon çukuruna konuldu ve 15 dakika süre ile oda ısısında beklenir. Klinik ve radyolojik bulgular ile İA tanısı konan, fakat Aspergillus LFD testi negatif bulunan hastalara ait serum örnekleri konsantrasyon 50, 150 ve 200 µl olarak yeniden test edildi.Böylece serum miktarının test sonucu üzerindeki etkisi araştırıldı.
- Hasta serum örnekleri test edilirken bu çalışma öncesi doku örneğinde *Aspergillus fumigatus* üretilerek kanıtlanmış kanıtlanan invaviz aspergillozlu bir olgudan elde edilen serum örneği aynı işlmelerden geçirilip Aspergillus LFD ile test edilerek pozitif dış kontrol olarak kullanıldı.

- BAL sıvısı ise her hangi bir ön işlem uygulanmadan direk test edildi. Öncelikle üretici önerisine uygun olarak 100 µl sonrasında ise farklı konsantrasyonlarda örnek pipet yardımı ile inkübasyon çukuruna konuldu ve 15 dakika süre ile oda ısısında beklendi.

Testin yorumlanması:

LFD membranı üzerinde tek bir band görülmesi (Şekil A) veya kontrol bandının altında zayıf pozitif bir band görülmesi durumunda test negatif olarak yorumlandı. Tüm serum örnekleri iki kez test edildi. Testler iki farklı kişi tarafından okundu ve yorumlar arasında farklılıklar olduğu takdirde tekrarlandı. LFD testini yorumlayan personel sonuçlar konusunda tarafsız kalabilmesi için hastaların klinik ve radyolojik bulgularından haberdar edilmedi. Çalışma süresince Aspergillus LFD test sonuçlarıyla ilgili rutin klinik izlemi yapan hekimlerin bilgisi olmadı ve test hastalara İPA tanısı koymak veya tanıyı ekarte etmek amacıyla kullanılmadı.

Resim 1. Aspergillus "lateral flow" testinin yorumlanması



A. negatif sonuç **B.** zayıf pozitif sonuç **C.** pozitif sonuç **D.** güçlü pozitif sonuç

3.6. İstatisitik analiz

Klinik bulgularla beraber radyolojik incelemede İA ile uyumlu bulgular saptanması referans (altın satandard) tanı yöntemi olarak kabul edildi. Buna göre hastalar İA olan ve olmayan şeklinde iki gruba ayrıldı. GM, BDG ve Aspergillus LFD'nin İA tanısında duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri belirlendi. İstatistik analiz için MedCalc software (version 11.5.1.0, Mariakerke, Belgium) programı kullanıldı.

3.7. Çalışmayı destekleyen kurumlar

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-12-3951 numaralı proje ile desteklendi. Çalışmada kullanılan BDG kitleri (Fungitell) Associates of Cape Cod East Falmouth, MA, USA firması tarafından, modifiye GM testi için kullanılan Platelia Aspergillus ELISA kit (Bio-Rad Laboratories) kitleri ise Pzifer, Türkiye şirketi tarafından karşılıksız olarak hibe edildi.

4.BULGULAR

4.1. Çalışmaya alınan hastaların demografik ve klinik özellikleri

Çalışmaya Şubat 2012-Haziran 2013 arasında izlenen 64 hematolojik maligniteli hastanın 75 nötropeni epizodu dahil edildi. Hastaların yaş ortalaması 41 yıl (aralık 18-69 yıl) idi. Hastaların 34'ü kadındı. Altta yatan hematolojik hastalık 38 hastada AML, 24 hastada ALL, 1 hastada bifenotipik lösemi ve 1 hastada da aplastik anemi olarak belirlendi. ALL hastalarında yedisine, AML hastalarından beşine ve aplastik anemili hastaya AKHN uygulandı.

Nötropeni epizotlarının 42'sinde flukonazol, 31'inde posakonazol ve ikisinde de vorikonazol profilaksisi uygulandı. Yetmişbeş nötropeni epizodundan 71'inde nötropenik ateş gelişti. Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine rağmen ateşi devam eden 10 hastadan ikisine lipozomal amfoterisin B, sekizine ise kaspofungin ile empirik antifungal tedavi verildi.

4.2. Hastalarda saptanan mantar enfeksiyonları ve EORTC/MSG kriterlerine göre sınıflandırması

Hastalardan 12'sinde thoraks BT İPA ile uyumlu lezyonlar belirlendi. Bir hastada ise klinik bulgular la birlikte sinüzitin radyolojik bulguları saptandı. İki hastada ise fungemi tespit edildi. Fungemi etkenleri albikans-dışı *Candida* türleri ve *Blastoschizomyces capitatus* olarak belirlendi.

EORTC/MSG kritelerine göre 12 hastada yüksek olasılıklı İPA, 1 hastada aspergillus sinüziti ve iki hastada fungemi mevcuttu (Tablo 2).

Tablo 2. İnvaziv mantar enfeksiyonu tanısı konulan hastaların demografik ve klinik özellikleri

Yaş/ Cinsiyet	Hematolojik hastalık	Tanı öncesi antifungal kullanımı	Toraks BT Bulguları	GMİ	GMİ[a]	BDG (pg/ml)	ALFD[b]	EORTC/MSG sınıflandırması
22/ Erkek	ALL	Flukonazol	Halolu nodül	0.20	0.47	251	-	Yüksek olasılıklı İPA
18/ Erkek	ALL/ AKHN	Flukonazol	Halolu nodül	0.19	1.24	39	-	Yüksek olasılıklı İPA
42/ Erkek	AML	Flukonazol	Halolu nodül	0.16	1.23	192	-	Yüksek olasılıklı İPA
43/ Erkek	AML	Posakonazol	Nodül	0.20	0.98	101	-	Yüksek olasılıklı İPA
49/ Erkek	AML	Posakonazol	Halolu nodül	0.18	1.65	104	+++	Yüksek olasılıklı İPA
18/ Kadın	AML	Posakonazol	Halolu nodül	0.13	0.98	<7	-	Yüksek olasılıklı İPA
18/ Erkek	ALL/ AKHN	Flukonazol	Halolu nodül	0.16	1.38	10	-	Yüksek olasılıklı İPA
49/ Kadın	AML	Kaspofungin	Nodül ve kavitasyon	0.72	TE	25	-	Yüksek olasılıklı İPA
48 / Erkek	AML	Posakonazol	Halolu nodül	0.10	1.78	108	-	Yüksek olasılıklı İPA
20/ Kadın	ALL	Amfoterisin B	Halolu nodül	0.10	1.05	36 (BAL BDG 90)	Serum (-) (BAL ALFD ++)	Yüksek olasılıklı İPA
23 / Erkek	AML	Posakonazol	Normal	0.16	TE	>523	-	Fungemi
49/ Erkek	ALL	Flukonazol	Halolu nodül ve Kavitasyon	3.33	TE	176	-	Yüksek olasılıklı İPA
58/ Kadın	ALL/ AKHN	Amfoterisin B	Nodül	0.81	TE	57	-	Yüksek olasılıklı İPA
53/ Kadın	ALL	Amfoterisin B	Paranazal BT'de kemik dokuda dekstrüksiyon	3.27	TE	83	-	Aspergillus Sinüziti
24/ Erkek	ALL	Kaspofungin	Normal	0.20	TE	117	-	Fungemi

[a]GMİ; Modifiye test sonucunda elde edilen galaktomannan indeksi
[b]Aspergillus LFD yorumu: "-", negatif, "++"; pozitif, "+++"; güçlü pozitif
ALFD; Aspergillus "Lateral flow device"AML; Akut myeloid lösemi, ALL; akut lenfositer lösemi, AKHN; allojenik kök hücre nakli, BAL; Bronkoalveolar lavaj, BDG; 1,3-beta-D-glukan, EORTC/MSG; "European Organization for Research and Treatment of Canser/Invasive Fungal Infections Cooperative Group"GMİ; Galaktomannan indeksi, İPA; İnvaziv pulmoner aspergilloz, , TE; Test edilmedi

4.3. Galaktomannan, 1,3-beta-D-glukan ve Aspergillus "lateral flow" testlerinin tanısal etkinliklerinin analizi

Klinik ve radyolojik bulgular ile akciğer mantar enfeksiyonu ve fungal sinüzit tanısı konulması duyarlılık-özgüllük analizleri için altın standart referans yöntem kabul edildi. Tablo 3'de bu testler için hesaplanan duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerler görülmektedir. GM testi için sınır değer 0.7 kabul edilerek hesaplama yapılırken, BDG için kit üretici tarafınca önerilen 80 pg/mL ve daha önce hastanemizde BDG için optimum sınır değeri araştıran çalışma kaynak alınarak 110 pg/mL sınır değer kabul edilerek yapıldı (23, 33).

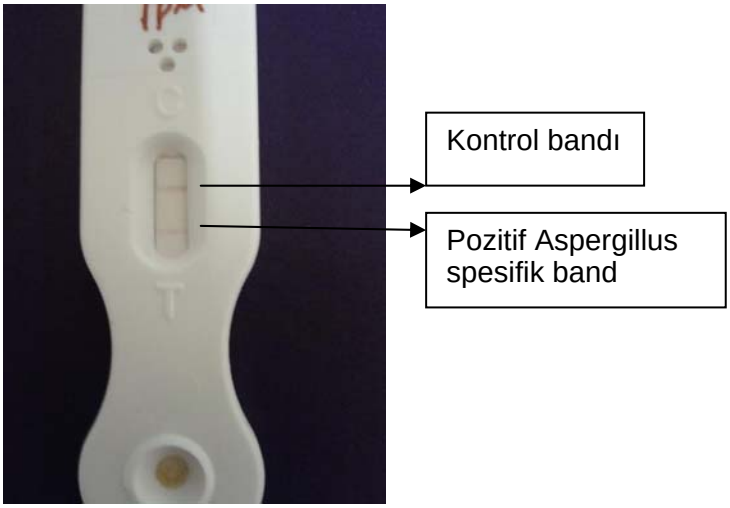
Tablo 3. Galaktomannnan, 1,3-beta-D-glukan ve Asperillus "lateral flow" testlerinin özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri

	Galaktomannan >0.7 (%95, CI)	**1,3-beta-D-glukan (> 80 pg/mL) (%95, CI)**	**1,3-beta-D-glukan (>110 pg/mL) (%95, CI)**	**Aspergillus "Lateral flow device" (%95, CI)**
Duyarlılık	%35.7 (19.3-55.8)	%53.5 (34.2-71.9)	%25 (12.1-43.7)	%13.7 (4.5-32.5)
Özgüllük	%99.6 (98-99.9)	%76 (70.8-80.9)	%88 (83.9-91.4)	%99.1(97.1-99.7)
PPD	%3.1 (1.5-5.6)	%26.3 (21.8-31.4)	%13 (9.7-17.1)	%1.9 (0.8-4.2)
NPD	%96.8 (94.3-98.3)	%73.6 (68.5-78.1)	%86.9 (82.3-90.2)	%98 (95.7-99.9)

CI, "Confidence interval", PPD, pozitif prediktif değer, NPD, Negatif prediktif değer

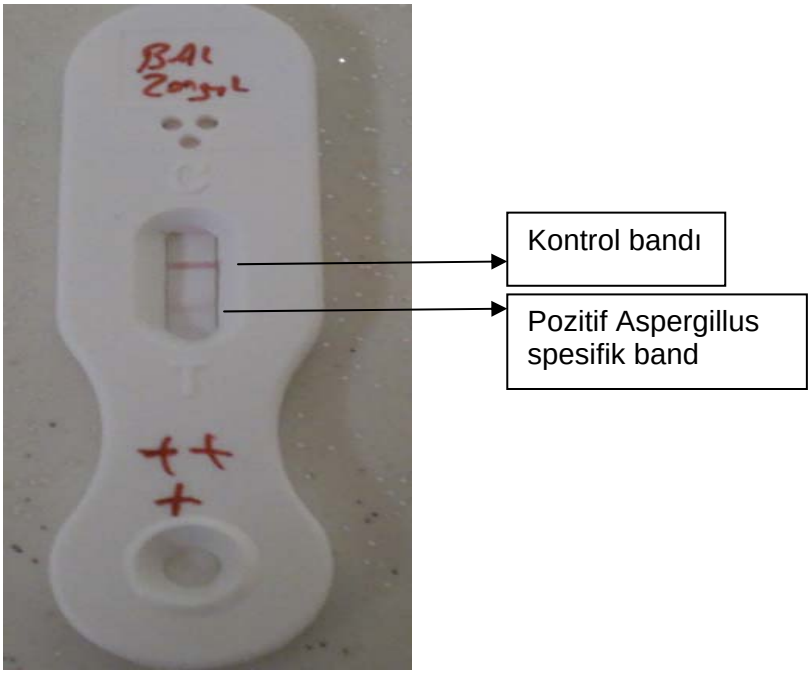
Aspergillus LFD yüksek olasılıklı İPA tanısı alan hastalardan birinin serum örneğinde pozitif bulundu (Resim 2). İlk testte kuvvetli pozitiflik saptanırken tedavi altında testin negatifleştiği görüldü. Aynı hastanın BDG ve modifiye GM testleri de pozitif bulunurken Standard metodla test yapıldığında GMİ negatif idi (Tablo 2).

Resim 2. İPA tanılı hastada serumda elde edilen pozitif Aspergillus LFD sonuç



İPA'lı bir diğer hastada ise ise iki gün süreyle uygulanan amfoterisin B tedavisine rağmen BAL sıvısında Aspergillus LFD pozitif bulundu.

Resim 3. Bronkoalveolar lavaj sıvısında Aspergillus LFD pozitifliği



Aspergillus LFD testi kuvvetli pozitif bulunan bir hastada radyolojik incelemelerde İPA bulgusu belirlenememekle beraber, empirik olarak başlanan kaspofungin tedavisi sonrası hastanın ateşinin düştüğü ve klinik durumunun düzeldiği görüldü. Aspergillus LFD sadece bir hastada zayıf pozitif sonuç verdi.

İPA tanısının diğer yöntemlerle doğrulandığı fakat Aspergillus LFD yönteminin negatif kaldığı hastaların serumları ve Aspergillus LFD'nin pozitif sonuç verdiği hastanın serumları testte kullanılan serum miktarının test üzerine etkisi belirlemek için 50, 150, 200 µl'lik konsantrasyonlarda yeniden test edildi. Serum konsantrasyonu 50, 100 150 ve 200 µl kullanıldığında sonuçlar arasında farklılık belirlenmedi. BAL sıvısı farklı konsantrasyonlarda test edildiğinde ise en iyi pozitif band görüntüsünün 200 µl'lik konsantrasyonda elde edildiği görüldü (Resim 2).

Diğer yöntemlerle yüksek olasılıklı İPA tanısı konulan hastalardan Aspergillus LFD testi uygulanan tüm konsantrasyonlarda negatif bulundu (Tablo 4).

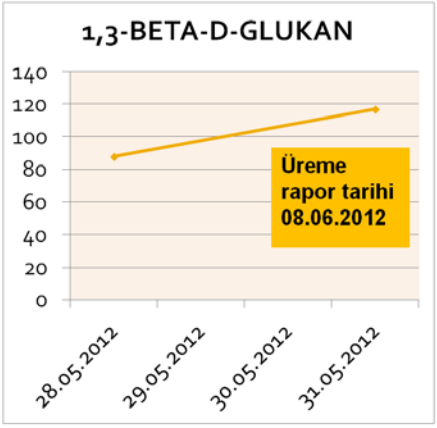
Tablo 4. Mantar enfeksiyonu tanısı konulan hastalarda GM, BDG ve Aspergillus-LFD sonuçlarının dağılımı

	GM (n, pozitif hasta sayısı)	**BDG (n, pozitif hasta sayısı)**	**Aspergillus-LFD (n, pozitif hasta sayısı)**
İnvaviz pulmoner aspergilloz (n=12)	11*	6	2
Sinüzit (n=1)	1	1	0
Fungemi (n=2)	0	2	0

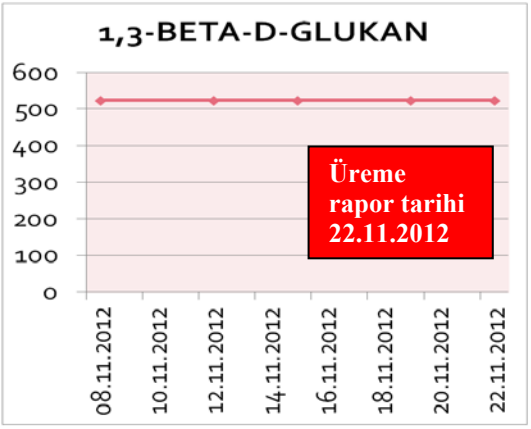
* Hastalardan 3'ünde standart yöntem ile 8 hastada modifiye yöntem ile sınır değer üzerinde sonuç elde edildi.

GM testi standart uygulanma yöntemi ile İA olgularından sadece dördünü yakalayabilirken antijen yapısının santirfüj ile bir membran üzerinde konsantre edilmesi temeline dayalı modifiye yöntem uygulandığında sekiz hastada daha pozitif sonuç elde edildi. BDG ise İA olgularından yedisinde sınır değerin üzerinde pozitif sonuç verdi. BDG ile en dikkat çekici bulgu ise iki fungemi olgusunda kan kültürlerinde pozitiflik rapor edilmeden yaklaşık 10 gün öncesinden itibaren BDG pozitifliğinin saptanmış olmasıydı (Resim 3).

Resim 4. Fungemi saptanan hastalarda BDG değerlerinin seyri



22 y, erkek hasta, ALL, flukonazol profilaksisi altında Nötropenik ateş gelişen hastada, empirik başlanan kaspofungin tedavisi altında kan kültüründe *Candida* türleri



23 y, Erkek hasta, AML relaps, posakonazol profilaksisi altında kan kültüründe *Blastoschizomyces capitatus*

5.**TARTIŞMA**

İA'da doğru tanı, erken tedavi için büyük önem taşımaktadır. Tanıda altın standart olan doku kültürleri hastaların önemli bir bölümünde yapılamamaktadır. GM ve BDG invaziv olmayan serolojik yöntemler olarak öne çıkmıştır, fakat uygulanmaları için ciddi teknik alt yapı gerektirmeleri pratikte kullanımları konusunda önemli bir sınırlama oluşturmaktadır. Asperillus LFD az sayıda laboratuvar ekipmanı gerektiren basit ve hızlı bir test olarak GM ve BDG testlerine bir alternatif olarak sunulmuştur (28). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda GM ve BDG ile benzer performans gösterdiği rapor edilmiştir (29).

Aspergillus LFD uygulanmasında iki farklı yöntem tanımlanmıştır. Bunlardan birincisinde serum örneği sadece önceden hazırlanmış doku kültür sıvısı ile birebir karıştırılmakta ve pipet aracılığıyla kitin test çukuruna yüklenmektedir. Ek hiçbir laboratuvar ekipmanı gerektirmemesi bu testi hasta başı uygulama için aday hale getirmektedir (30). Deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmada yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak rapor edilmiştir (29).

Aspergillus LFD'nin hasta başı tanı testi olarak performansını değerlendirdiğimiz çalışmamızda İA açısından yüksek risk altında olan 64 hasta 75 nötropeni epizodu boyunca prospektif olarak izlendi. Hastalardan 12'sinde İPA uyumlu klinik ve radyolojik bulgular belirlenirken, 1 hasta aspergillus sinüziti saptandı. Hastaların nötropeniye girmesiyle beraber toplanmaya başlanan serum örneklerinin test edilmesiyle sadece bir hastada Aspergillus LFD testi pozitif saptandı (Tablo 2). Çalışmaya 100 nötropeni epizodu alınması planlanmasına rağmen ara değerlendirmede testin 13 İA olgusundan sadece birinin serum örneklerinde pozitif saptanması üzerine, çalışmaya yeni hasta alınması sonlandırılarak yalancı negatiflik oluşturabilecek nedenler araştırıldı. Optimum antijen antikor bağlanmasının serumdaki antijen konsantrasyonu tarafından etkilenebileceği göz önüne alınarak farklı serum miktarları ile testler tekrarlandı. 50, 100, 150 ve 200 µl serum uygulamasının sonuçlar üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Serumdaki diğer antijenik yapıların ve immünkomplekslerin aspergillus antijeni ile spesifik monoklonal antikor arasındaki bağlanmayı inhibe etmesi yalancı negatif sonuçların bir diğer olası nedeni olarak düşünüldü. Serum örneklerinin EDTA ile karıştırılması, karışımın 3 dakika kaynatılması ve 14.000 g'de 5 dakika santirfüj edilmesi içeren ön işlemlerin immünkomplekslere bağlı yalancı negatifliği önleyebileceği bildirilmektedir (30). Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen İA çalışmasında serum örneklerine ön işlem uygulanıp uygulanmamasının testin duyarlılığının değiştirmediği rapor edilmiştir (35). Aspergillus LFD kitini geliştiren araştırmacı testin uygulanması konusunda ayrıntılı bilgiler verdiği makalesinde insan serumu veya BAL sıvısı

test edilirken ön işlem uygulanması gerekmediğini ifade etmektedir (30). Buna rağmen kısa süre önce Aspergillus LFD'nin klinik performansı konusunda yapılan her iki çalışmada da serum örnekleri test öncesi işlemden geçirilmiştir (36, 37). Çalışmalarda testin duyarlılığı %40-81.8 ve özgüllüğü ise % 86.8-98 olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Aspergillus LFD testinin tansısal etkinliğini dğerlendiren çalışmalarda eldilen veriler

Kaynak no	Hasta grubu (n)	Kontrol grubu (n)	Duyarlılık (%) (%95, CI)	Özgüllük (%) (%95, CI)	PPD (%) (%95, CI)	NPD (%) (%95, CI)
36	22	59	81.8 (61.5-97.2)	84.7 (73.5-91.8)	66.6 (47.7-81.4)	92.5 (82.5-97.1)
37	10	91	40 (13.7-72.6)	86.8 (77.7-92.7)	25 (8.3-52.6)	92.9 (84.7-97.1)
Mevcut çalışma	13	62	%13.7 (4.5-32.5)	%99.1 (97.1-99.7)	%1.9 (0.8-4.2)	98 (95.7-99.9)

PPD, pozitif prediktif değer, NPV; negatif prediktif değer

Çalışmamızda elde edilen serum örnekleri de ön işlemden geçirilerek test edilmek istenmiş, fakat eldeki kit stoğunun yetersiz olması nedeniyle bu yapılamamıştır. Çalışmamız verileri ile serumun ön işlemden geçirildikten sonra test edildiği çalışmalar karşılaştırıldığında serumun test öncesi ön işlemden geçirilmesinin testin duyarlılığını belirgin olarak artırdığı görülmektedir (Tablo 5). Fakat ön işlemsiz yöntem uygulandığında özgüllüğün %99.1 olduğu görülmüştür. Çalışmamızda sadece iki serum örneğinde yalancı pozitiflik saptanmış, kuvvetli pozitiflik saptanan serum örneğinin alındığı hastanın da empirik olarak başlanan anti-fungal tedaviyle ateşinin düştüğü görülmüştür. Dolayısıyla ön işlem yapılmaksızın uygulanan Aspergillus LFD'nin negatif olması İA'yı ekarte ettirmezken, pozitif sonucun mümkün tüm tanısal işlemlere başlanması ve tedavinin geciktirilmemesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Serumun örneklerinin test edilmeden önce işlemden geçirilmesi için santirfüj cihazı ve ısı banyosuna ihtiyaç vardır. Bu durum Aspergillus LFD'nin hasta başı tanı yöntemi olarak kullanılmasını engellemesine rağmen, her bir hasta serumu için tek bir kitin kullanılması ve 15 dakika içinde sonuç alınması önemli avantajlar olarak ortaya çıkmaktadır. Serum test edilmeden önce uygulanacak ön işlemlerin standart hale getirilmesi Aspergillus LFD'yi ileri yıllarda önemli bir tanı aracı haline getirebilir. Yanısıra ön işlem uygulanmaksızın test edilen serumda pozitif sonuç elde edilmesi düşük oranda yalancı pozitiflik göz önüne alındığında hızlı tanı ve tedaviye katkı sağlayabilir.

Çalışmamızda elde edilen düşük duyarlılık kullanılan yöntemden kaynaklanabileceği gibi aspergillusa karşı aktif antifungal profailsinin yaygınlığı ve radyolojik yöntemlerin etkin kullanılmasıyla erken tanı gibi diğer faktörler de göz önüne alınmalıdır. Çalışma döneminde yüksek riskli hastalarda antifungal profilakside önemli oranda posakonazol kullanılmıştır. Aspergillus'a karşı belirgin in vitro aktivitesi olan bu ajanın profilakside kullanılması antijen seviyesinin testin saptayabileceği seviyeye kadar ulaşmasına engel olmuş olabilir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmada posakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B kullanımının Aspergillus LFD'nin duyarlılığını belirgin bir şekilde düşürdüğü ortaya konulmuştur (35). Bir diğer konu ise ateşi düşmeyen hastalarda erken dönemde toraks BT çekilmesidir. Erken BT nin aspergillus antijenlerinin tespitinden daha önce tanı konulmasını sağladığı ve radyolojik bulgular oluşmadan önce galaktomannan antijeninin pozitifleşmediği bildirilmiştir (38). Çalışmamızda hastaların 12'sinden 9'unda İPA'un erken radyolojik bulgusu olan halolu nodül rapor edilmiştir. Bu hastalarda erken tanı ve tedavi nedeniyle hastalarda aspergillus antijenleri saptanamamış olabilir. Aspergillus LFD sonuçlarına paralel olarak İA'lu hastalardan sadece dördünde standart test yöntemi ile GM pozitifliği (GMİ>0.7) saptanmış, ancak antijen miktarını artıracak modifiye yöntem kullanıldığında bir olgu dışında tüm hastalarda GM pozitifliği elde edilmiştir. Günümüzde çeşitli antifungal tedavi uzlaşı raporları anti-fungal seçiminde kültür pozitifliğinin yanı sıra en önemli yol gösterici belirteç olarak GM antijen testini kabul etmektedir (39). Buna göre kültürlerde Aspergillus türleri izole edilemeyen ve GM antijeni negatif akciğer mantar enfeksiyonları olgularına başlangıç tedavisi olarak tüm mantarlara karşı etkili olan Amfoterisin B verilmesi önerilirken, GM antijeni pozitif hastalarda Aspergillus'a karşı seçici etkinliği ve parenteral-oral ardışık kullanım imkanı olan vorikonazol ile tedaviye başlanması önerilmektedir. Modifiye yöntem tanımlandıktan sonra ilk kez klinik çalışmada kullanılması sonucu elde ettiğimiz veriler, mevcut yöntem ile GM negatif olarak yorumlanan olguların ve standart metodolojinin merkezimiz açısından yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Aspergillus LFD testinin tanısal etkinliğinin en yüksek olduğu örnek BAL sıvısıdır. İPA şüphesiyle bronkoskopi yapılan 37 hastadan alınan 39 BAL sıvısının test edildiği çalışmada Aspergillus LFD'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü %81, pozitif prediktif değeri %81 ve negatif prediktif değeri %100 rapor edilmiştir (40). Çalışmamızda İPA'dan şüphelenilen olgulardan sadece birine bronkoskopi yapılabilmiştir. Radyolojik olarak şüpheli lezyonların saptanmasından ancak 48 saat sonra bronkoskopi yapılabilmesine rağmen Aspergillus LFD pozitif bulunmuştur (Resim 3). Hastaya başlanan vorikonazol tedavisi yükleme dozundan sonra ortaya çıkan cilt döküntüsü nedeniyle kesilmiş, ardışık intravenöz

amfoterisin B ve oral posakonazol tedavisiyle hasta klinik ve radyolojik olarak tamamen düzelmiştir.

Çalışmamızda duyarlılığı en yüksek olan serolojik test BDG olarak belirlenmiştir. İA'lı olgulardan yedisinde radyolojik olarak lezyonların saptandığı dönemde BDG 80 pg/mL'nin üzerinde bulunurken, fungemik iki olguda da kan kültüründe üreme rapor edilmeden 10 gün öncesinde itibaren alınan serum örneklerinde BDG'nın sınır değerin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Fungemi görülme oranının gittikçe arttığı (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi enfeksiyon Kontrol Kurulu yıllık raporları) hastanemizde yüksek riskli hastalarda BDG izlemi fungemisi olan olgulara erken tanı konmasında önemli rol oynayabilir. BDG testinin kullanımını sınırlayan en önemli etkenler çevresel kontaminasyondan kan ürünü infüzyonu sırasında kullanılan lökosit filtrelerine kadar pek çok faktörün testte yalancı pozitifliğe neden olabilmesidir. Çalışmamızsa en yüksek yalancı pozitiflik oranına BDG testine rastlanmış ve testin İA tanısındaki özgüllüğü %76 olarak saptanmıştır. GM ve Aspergillus LFD testleri içinse özgüllük %99 oranında gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan merkezimiz açısından önemli bir diğer bulgu ise mantar enfeksiyonu açısından yüksek risk altında olan hematolojik maligniteli veya AKHN yapılan hastalarda GM monitorizasyonun etkisizliğidir. Her ne kadar literatürde kimi çalışmalarda GM antijenin haftada birkaç kez test edilmesinin İA olgularında klinik bulgular ortaya çıkmadan tanı konulmasının belirtse de; çalışmamızda bir olgu dışında (klinik bulgu olmadığı dönemde GM: 0.59; üç gün sonra ateş ve öksürük şikayeti başladığında ise 3.33) GM antijen pozitifliği saptanan tüm olgularda radyolojik bulgularla GM antijen pozitifliği aynı dönemde saptanmıştır. Klinik tanı öncesi serolojik testler ile tanı sadece BDG pozitifliğinin saptandığı fungemik olgularla sınırlı kalmıştır. Bu veriler ışığında hematoloji klinikleri ve kök hücre nakli merkezinde uygulanan tanı protokolleri tekrar gözden geçirilmesi planlanmaktadır.

6. **SONUÇLAR**

- LFD Aspergillus testinin İA tanısında hasta başı tanı testi olarak duyarlılığı %13 bulunmuştur.

- Düşük duyarlılığın nedeni serumdaki aspergillus antijenleri ile aspergillus spesifik antikorun optimum bağlanmasının engelleyen immünkompleksler olabilir.

- Posakonazol profilaksisinin yaygın kullanımı Aspergillus LFD'nin yanı sıra GM testinin de duyarlılığının düşük olmasın nedeni olabilir.

- İki günlük antifungal tedaviye rağmen BAL'da Aspergillus LFD'nin pozitif bulunması testin özellikle BAL'da tanı değerinin yüksek olduğunu düşündürmektedir.

- Aspergillus LFD'nin İA tanısında serumun test edilmesinde kullanılabilmesi için, uygulama yöntemleri üzerinde ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

- Mevcut çalışma verileri göz önüne alındığında antibiyotik tedavisi altında ısrarlı ateşi olan ve toraks görüntülenmesinde patolojik bulgu saptanmayan hastalarda BDG testinde ardışık pozitiflikler saptanması fungemi için uyarıcı olmalıdır.

- Radylojik incelemelerde İA ile uyumlu bulgular saptanan hastalarda GM testi standart yöntem ile negtif bulunduğunda modifiye yöntem ile test edilmelidir.

KAYNAKLAR

1.Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly P, 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: 1813-21.

2. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609-22.

3. Pfeiffer DC, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2006; 42: 1417-27.

4. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin, et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. J Infect Dis 2004; 190: 641-9.

5. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, at al. B-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: 199-205.

6. Ostrsky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-3) beta –D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis 2005; 41: 654-59.

7. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Conrubution (1-3) beta –D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. J Clin Microbiol 2005; 43: 299-305.

8. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. Clin Vaccine Immunol 2008; 15: 1095-105.

9. Ener B. Fungal infeksiyonların değişen epidemiyolojisi. Arman D, Odabaşı Z, ed'ler. Fungal infeksiyonlar ve tedavisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2009, ss 9-17.

10. Cornely OA. *Aspergillus* to *Zygomycetes*: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. Infection 2008; 36: 296-313.

11. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, 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: 1091-1100.

12. Yapar N, Şener A, Kuruüzüm Z, et al. Bir üniversite hastanesinde bir yıllık dönemde izlenen invazif fungal infeksiyonların değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 18: 67-70, 2005.

13. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Kontrol Kurulu Yıllık Sürveyans Verileri, Kayseri, 2009.

14. Stevens DA. Diagnosis of fungal infectious: current status. J Antimicrob Chemother 2002; 49 (suppl 1): 11-19.

15. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, et al: Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia, J Clin Oncol 2001; 19: 253-9.

16. Maroma EM, Kontoyiannis DP. Imaging studies for diagnosing invasive fungal pneumonia in immunocompromised patients. Curr Opin Infect Dis 2011; 24:309–314.

17. Odabaşı Z. Mikrobiyolojik tanı: invaziv fungal enfeksiyonlarda serolojik tanı. Akova M, Akkan H, ed'ler. Febril nötropeni. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2010, ss 285-292.

18. Metan G, Koc AN, Atalay A, Kaynar LG, Ozturk A, Alp E, Eser B. The peformance of galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis at different cutoff values. Mycoses 2011;54 (Supplement 2): 80-81.

19. Walsh TJ, Wheat LJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 245-251.

20. Marty FM, Koo S. Role of (1-3)-β-D-Glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycology 2009; 47 (Supp1): 233-240.

21. Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, et al. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)- β-D-glucan antigens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26: 755-766.

22. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. Beta-D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections: A Meta-analysis. Clin Infect Dis 2011; 52:750-70.

23. Metan G, Koc AN, Atalay A, Kaynar LG, Ozturk A, Alp E, Eser B. What should be the optimal cutoff of serum 1,3-beta-d-glucan for detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies? Scandinavian J Infect Dis 2012; 44:330-336.

24. Kelaher A. Two non-invasive diagnostic tools for invasive aspergillosis: (1,3)-beta-D-glucan and the galactomannan assay. Clin Lab Sci 2006; 19: 222–224.

25. Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for diagnosing invasive aspergillosis:getting closer but still a ways to go. Clin Infect Dis 2006; 42: 487-489.

26. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systemic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2009;9(2):89-96.

27. Öz TH. Sistemik Aspergillus enfeksiyonlarının farklı yöntemlerle mikrobiyolojik tanısı ; Uzmanlık tezi; Kayseri, 2010.

28. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. Clin Vaccine Immunol 2008; 15:1095-1105.

29. Wiederhold NP, Thornton CR, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Bocanegra R, Patterson TF. Comparison of lateral flow technology and galactomannan and (1->3)-beta-D-glucan assays for detection of invasive pulmonary aspergillosis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 1844-1846.

30. Thornton C, Johnson G, Agrawal S. Detection of invasive pulmonary aspergillosis in haematological malignancy patients by using lateral flow technology. J Vis Exp 2012; 22.

31. Kumbasar ÖÖ, Akçay Ş, Akova M, Azap A, Çelikbaş A, Tabak L, Yüce A, Zeytinoğlu A. Türk Toraks Derneği Bağışıklığı Baskılanmış Erişkinlerde Gelişen Pnömoni Tanı ve Tedavi Uzlaşı Raporu. Türk Toraks Dergisi 2009; 10 (ek 5): 3-16.

32. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, Raad II, Rolston KV, Young JA, Wingard JR, Infectious Diseases Society of AmericaClinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2011; 52:427-431.

33. Marchetti O, Lamoth L, Mikulska M,Viscoli C, Verweij P, Bretagne S and the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipientsBone Marrow Transplantation 2012; 47:846–854.

34. Mennink-Kersten M, Ruegebrink D, Klont R,Warris A, Blijlevens N, Donnelly JP, Verweij PE. Improved Detection of Circulating Aspergillus Antigen by Use of a Modified Pretreatment Procedure. J Clin Microbiol 2008; 46: 1391–1397.

35. Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, et al. Interlaboratory and Interstudy reproductibility of novel lateral-flow device and influnce of antifungal therapy on detection of invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbio 2013; 51:459-465.

36. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes R. An Evaluation of real-time PCR, Galactomannan ELISA and a novel Lateral-Flow Device for the diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2013; 51:1510-1516.

37. Held J, Schmidt T, Thornton C, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel Aspergillus lateral-flow device and the Platelia galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. Infection 2013 DOI 10.1007/s15010-013-0472-5.

38. Weisser M, Rausch C, Droll A, et al. Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerised tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with haematological malignancies. Clin Infect Dis 2005; 41: 1143–1149.

39. Girmenia C, Aversa F, Busca A, et al. A hematology consensus agreement on antifungal strategies for neutropenic patients with hematological malignancies and stem cell transplant patients. Hematol Oncol 2012 doi:10.1002/hon.2031.

40. Hoenigl M, Koidl C, Duettmann W, et al. Bronchoalveolar Lavage Lateral-Flow Device Test for Invasive Pulmonary Aspergillosis Diagnosis in Haematological Malignancy and Solid Organ Transplant Patients. J Infect 2012; 65:588-591.