

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

İNVAZİF MİKOZLARIN TANISINDA SEROLOJİK TANI YÖNTEMLERİNİN YERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ESRA KILIÇ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYŞE KALKANCI

ANKARA
EKİM 2024

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

İNVAZİF MİKOZLARIN TANISINDA SEROLOJİK
TANI YÖNTEMLERİNİN YERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ESRA KILIÇ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYŞE KALKANCI

ANKARA
EKİM 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR.....	v
KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.3. Sınıflandırma	5
2.4. Genel Özellikler.....	7
2.4.1. Makroskopik özellikler.....	7
2.4.2. Mikroskopik özellikler	8
2.4.3. Hücre duvar yapısı	10
2.5. Antijenik Özellikleri	12
2.5.1. Galaktomannan	12
2.5.2. β -(1,3)- D-Glukan	12
2.6. Virülans Faktörleri.....	12
2.6.1. Adhezyon (Yapışma).....	13
2.6.2. Termotolerans (Isı toleransı).....	13
2.6.3. Enzimler.....	14
2.6.4. Pigmentler.....	14

2.6.5. Toksinler	15
2.7. Patogenez	15
2.8. Konak Savunması	16
2.8.1. Doğal immün yanıt	16
2.8.2. Kazanılmış immün yanıt	18
2.9. Klinik	20
2.9.1. Aspergilloma	20
2.9.2. Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)	21
2.9.3. Kronik pulmoner aspergilloz (KPA)	22
2.9.4. Akut invazif pulmoner aspergilloz (İPA)	22
2.9.5. Trakeobronşiyal aspergilloz	23
2.10. Tanı Yöntemleri	24
2.10.1. Klinik tanımlama	24
2.10.2. Radyoloji	26
2.10.3. Mikroskopik inceleme	27
2.10.3.1. Native preparat hazırlanması	27
2.10.3.2. Laktofenol pamuk mavisini ile preparat hazırlanması	28
2.10.3.3. Floresan boyalarla boyama	28
2.10.4. Histopatolojik inceleme	29
2.10.4. Kültür	29
2.10.5. Serolojik yöntemler	30
2.10.5.1. Galaktomannan Antijen Testi	31
2.10.5.2. (1,3)- β -D-glukan (BDG) Antijen Testi	33

2.10.6. Moleküler yöntemler	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hasta seçimi	35
3.2. Örneklerin Toplanması	36
3.3. Çalışmada kullanılan cihaz ve sarf malzemeler	36
3.3.1. Kullanılan cihazlar	36
3.3.2. Kullanılan sarf malzemeler	37
3.4. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag ELISA Kiti.....	37
3.4.1. Test prensibi.....	37
3.4.2. Testin uygulanışı	38
3.4.3. Sonuçların yorumlanması	39
3.5. Dynamiker <i>Aspergillus</i> Galaktomannan kiti.....	40
3.5.1. Test prensibi.....	40
3.5.3. Testin uygulanışı.....	41
3.5.4. Sonuçların yorumlanması	42
3.6. Fungus (1-3)- β -D-Glukan Tespit Kiti (CLIA)	43
3.6.1. Test prensibi.....	43
3.6.2. Testin uygulanışı	44
3.6.3. Sorunların Yorumlanması.....	44
3.7. <i>Aspergillus</i> Galactomannan Detection Kit (CLIA)	45
3.7.1. Test prensibi.....	45
3.7.2. Testin uygulanışı	46
3.7.3. Sonuçların yorumlanması	47

3.8. İstatiksel Analiz	47
4. BULGULAR	49
4.1. Demografik Veriler	49
4.1.1. Dinamik <i>Aspergillus</i> Galaktomannan Testi	52
4.2. Kemilüminesans İmmünoanaliz Temelli <i>Aspergillus</i> Galaktomannan Testi	54
4.3. Kemilüminesans İmmünoanaliz Temelli Fungus (1-3)- β -D-Glukan Testi (CLIA BDG)	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZET	84
9. SUMMARY	86

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde ve bu tezi hazırlamamda ilgi ve desteğini çokça hissettiğim, bilgi ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık eğitimim boyunca deneyimleri ve bilgi birikimleri ile her daim bana yol gösteren, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Kayhan Çağlar'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan ve teknisyen arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi iletiyorum. Mikoloji laboratuvarı laborantı Sayın Aykut SEYREK'e ve Sayın Aysel YALÇIN'a tez çalışmalarında olan yardım ve katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum. Saygılı, sevecen ve destekleyici bir çalışma ortamı kurduğumuz tüm asistan arkadaşlarıma da uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmalarında olan yardım ve katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Son olarak hayatımdaki en büyük şansım ve destekçim olan eşim Emrah KILIÇ'a ve bugünlere gelmemde en çok katkısı olan değerli annem Leyla ÖKSÜZ'e ve babam Yunus ÖKSÜZ'e, ömrüm boyunca desteklerini hissettiğim sevgili kardeşlerim Hilal ÖKSÜZ, Mahmuthan ÖKSÜZ ve Eminegül ÖKSÜZ'e en içten sevgilerimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

KISALTMALAR

ABPA	Allerjik bronkopulmoner aspergilloz
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AM	Alveoler makrofaj
AML	Akut miyeloid lösemi
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BDG	(1-3)- β -D-Glukan
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BT	Bilgisayarlı tomografi
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)
EORTC/MSG	European Organisation for Research on Treatment of Cancer- Mycoses Study Group
ETA	Endotrakeal aspirat
GM	Galaktomannan
GMS	Gomori methenamin gümüşleme boyası
GVHD	Graft versus host hastalığı
HRP	Horseradish peroxidase
HSCT	Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
HSCT	Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
IL	İnterlökin
İA	İnvazif aspergilloz
İM	İnvazif mikozlar
İPA	İnvazif pulmoner aspergilloz
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KOH	Potasyum hidroksit
KOH	Potasyum hidroksit
KPA	Kronik pulmoner aspergilloz
MM	Multipl myelom
NET	Nötrofil dışı tuzak

OD	Optik dansite
PAMP	Patojen ilişkili moleküler paternler
PAS	Periyodik asid Schiff
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	Patojen tanıma reseptörleri
PTX-3	Pentraksin-3
ROS	Reaktif oksidan metabolitler
SP	Sümfaktan protein
TLR	Toll benzeri reseptör
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekroz faktör α

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. İnvazif fungal enfeksiyondaki risk faktörleri.....	5
Tablo 2. En sık görülen <i>Aspergillus</i> türlerinin morfolojik özellikleri.....	10
Tablo 3. İnvaziv pulmoner aspergilloz EORTC/MSG 2020 tanı kriterleri	25
Tablo 4. Hasta gruplarına ait yaş ortalaması	50
Tablo 5. Hasta gruplarına ait cinsiyet dağılımı	50
Tablo 6. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar.....	51
Tablo 7. Yüksek olası İM tanılı hasta grubuna ait risk faktörleri	51
Tablo 8. İnvazif mikoz olmayan hasta kontrol grubuna ait risk faktörleri	52
Tablo 9. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag ve Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testlerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 10. Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri.....	53
Tablo 11. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag ve CLIA GM testlerinin karşılaştırılması	54
Tablo 12. CLIA GM testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	55
Tablo 13. Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag ve CLIA BDG testlerinin karşılaştırılması	56
Tablo 14. CLIA BDG testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	56
Tablo 15. ROC Eğrisi Altındaki Alan (Area Under Curve - AUC).....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Aspergillus</i> türlerinin SDA üreme şekilleri.....	7
Şekil 2. Konidyofor oluşumu.....	8
Şekil 3. <i>Aspergillus</i> türleri mikroskopik görünüşleri.....	9
Şekil 4. Konidyum ve hifal hücre duvarlarının şematik temsili	11
Şekil 5. ELISA yöntemiyle GM antijen aranması	33
Şekil 6. Dynamiker GM testinin Platelia GM testi altın standart alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi	54
Şekil 7. CLIA GM testinin Platelia GM testi referans alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi.....	55
Şekil 8. CLIA BDG testinin Platelia GM testi referans alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi.....	57
Şekil 9. Dynamiker GM, CLIA GM ve CLIA BG testinin Platelia GM testi referans alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi.....	58

Bu tez çalışması ‘İnvazif mikozların tanısında serolojik tanı yöntemlerinin yeri’ başlıklı ve TTU-2023-8627 kodlu proje olarak Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri(BAP) tarafından tıpta uzmanlık tez projesi olarak 123.840 TL bütçe ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

İnvazif fungal enfeksiyonlar (İFE) terimi, derin dokularda maya veya küf kaynaklı sistemik mantar enfeksiyonlarını tanımlamak için kullanılır. Yüzeysel mantar enfeksiyonlarının aksine, İFE'ler yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir.(1) Hematolojik malignitesi, kemoterapi kaynaklı nütropenisi veya hematopoietik kök hücre nakli (HSCT) yapılmış hastalar yüksek risk altında bulunmaktadır(2). Buna ek olarak İFE'ler solid organ nakli, otoimmün hastalıklar, konjenital immün yetmezlik veya kronik akciğer hastalıkları gibi altta yatan başka hastalıkları olan popülasyonlarda giderek daha fazla görülmektedir. En sık görülen İFE'ler *Candida* türleri, *Aspergillus* türleri, *Cryptococcus* türleri, *Pneumocystis* türleri tarafından oluşturulmaktadır(3).

Bu enfeksiyonların tanısı için kan veya invazif yöntemlerle alınan doku örnekleri gerekmektedir. Hastaların bazılarında invazif yöntemlerle örnek elde edilmesi zor olduğundan tanıda gecikmeler yaşanabilmektedir. Kültür dışı hızlı tanı testleri, erken tanı konulmasına imkan sağlayarak antifungal tedavinin hızlı bir şekilde başlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması ve kültür sonucu çıkana kadar geçen süre, tanıyı geciktirmekte ve tedaviyi hatalı yönlendirmektedir. Erken ve doğru tanı sayesinde antifungal tedavinin zamanında başlanması kadar gereksiz antifungal kullanımını azaltmak da son derece önemlidir.

Son yıllarda İFE'lerin hızlı ve duyarlı olarak saptanabileceği antijen, antikor, fungal metabolit veya DNA tespitine yönelik çabalar artmıştır. Serumda

Aspergillus galaktomannanı (GM), *Candida* mannanı ve tüm mantarlar için ortak olan 1,3- β -D-Glukan (BG) antijeninin gösterilmesi erken tanıya yardımcı olması amacıyla kullanılmaktadır.

İnvazif mikoz tanısında “European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group (EORTC/MSG)” tarafından oluşturulan kriterler kullanılmaktadır. Bu kriterlere göre invazif mikozlar kesin, yüksek olası ve düşük olası olarak ayrılmaktadır. Mikolojik tanı kriterlerine göre doku kültürü negatif olgularda, serumda GM antijeni saptanması yüksek olasılıklı invazif aspergilloz (İA) tanısı koydurmaktadır. ELISA yöntemi, IA riski taşıyan çok sayıda hastayı test etmek için uygun olsa da tek bir numuneyle kullanımı zor olmaktadır. Son yıllarda İFE tanısı için kemilüminesans immünoanaliz (CLIA) temelli çalışan ve kısa sürede sonuç veren tam otomatize kapalı sistemler kullanılmaya başlanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı ticari olan bulunan *Aspergillus* Galactomannan Detection Kit (CLIA), Fungus (1-3)- β -D-Glukan Tespit Kit (CLIA) testlerinin ve Dynamiker *Aspergillus* Ag Kit (ELISA) testinin IA tanısındaki duyarlılıklarını FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi(ELISA) ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

İnvaziv Fungal Enfeksiyonlar (İFE) çok geniş yelpazede immün sistemi baskılanmış hastalarda görülen fırsatçı mantar enfeksiyonlarıdır. Azol profilaksisi ile yüksek risk grubunda *Candida* enfeksiyonlarının büyük oranda engellenmesi ile başta *Aspergillus* olmak üzere tüm küf enfeksiyonları ön plana çıkmıştır(4). Klinik pratikte *Aspergillus* enfeksiyonlarının daha sık rastlanması nedeniyle aşağıda genel bilgiler bölümünde ağırlıklı olarak bu mantar enfeksiyonuna yönelik bilgiler verilmiştir.

2.1. Tarihçe

Aspergillus türleri ilk kez 1729 yılında İtalyan papaz ve biyolog Pietro Antonio Micheli tarafından tanımlanmıştır. Mikroskop altında bu mantarların görünümü, kutsal su serpmeye yarayan aspergillumun şeklini andırdığı için bu genus'a *Aspergillus* adı verilmiştir(5). İnsanlarda bilinen ilk aspergilloz olgusu 1842'de Edinburgh'da Bennett tarafından tanımlanmıştır. Aynı yıl Rayer tarafından plevrada tanımlanamayan bir küf enfeksiyonu bildirilmiştir. Gairdner tarafından 1853'te *Aspergillus*'lara bağlı plevra enfeksiyonu bildirilmiştir(6).

Virchow 1856'da bronşial ve pulmoner aspergilloz, Henrici 1939 yılında *Aspergillus*'ların ürettikleri toksinler ile apse ve nekroz, Kirschstein ve ark 1945'de ilk *Aspergillus* endokarditini, Katzenstein ve ark'da 1983 yılında allerjik fungal sinüzit olgularını bildirmişlerdir(5).

İlk kültür 1944 yılında Culture Collection Unit, Northern Utilization Research Branch laboratuvarlarında yapılmıştır. Tür tanımında kültür özellikleri ve detaylı morfolojik yapılarının görülebildiği Czapek solüsyonu, arpa özlü agar ve mısır unlu agar kullanılmaya başlanmıştır(7).

2.2. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Aspergillus türleri bitkilerde, çürüten organik maddelerde, toprakta, havada, tatlı su ve deniz habitatlarında olmak üzere çevrede yaygın olarak bulunmakla beraber kapalı ortamlarda (binaların yüzeyleri, hava, ev aletleri vb.) ve içme sularında da bulunmaktadır. *Aspergillus* cinsini oluşturan çeşitli türler, çok çeşitli organik ürünleri kullanabilir ve farklı çevresel koşullara uyum sağlayabilir(8).

Aspergillus cinsinde yüzlerce tür bulunmasına rağmen, insan veya hayvanlarda enfeksiyon yapan birkaç tür bulunmaktadır. Enfeksiyonların %70'inden fazlasına *Aspergillus fumigatus* neden olurken, bunu takiben *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* türleri diğer enfeksiyonlara neden olmaktadır(9).

Hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) alıcılarında sitopeni ve Graft-versus-host hastalığı (GVHH) gelişmesini önlemek amacıyla verilen bağışık sistemi baskılayıcı tedaviler sonucunda İFE riski yükselmektedir. *Candida albicans* enfeksiyonunu önlemek amacıyla uygulanan flukonazol profilaksisi de küf enfeksiyonlarını daha yaygın hale getirmiştir(10).

Tablo 1. İnvazif fungal enfeksiyondaki risk faktörleri(11)

Konağa ait risk faktörleri
1. Yakın zamandaki nötropeni öyküsü ($<0,5 \times 10^9$ nötrofil/L [<500 nötrofil/mm ³] >10 gün boyunca)
2. Allojenik kök hücre nakli
3. Solid organ nakli
4. Hematolojik malignite nedeniyle yakın zamanda tedavi almış olmak
5. Son 60 gün içinde ≥ 3 hafta boyunca ≥ 0.3 mg/kg terapötik dozda kortikosteroidlerin uzun süreli kullanımı
6. Son 90 gün boyunca kalsinörin inhibitörleri, TNF- α blokerleri, lenfosit özgü monoklonal antikorlar veya immünosüpresif nükleosit analogları gibi diğer tanınmış T hücre immünosüpresanlarıyla tedavi
7. Bruton'un tirozin kinaz inhibitörleri, örn. ibrutinib gibi tanınmış B hücreli immünosüpresanlarla tedavi
8. Kalıtsal şiddetli immün yetmezlik (kronik granülomatöz hastalık, STAT 3 eksikliği veya ciddi kombine immün yetmezlik gibi)
9. Steroidlerle birinci basamak tedaviye refrakter olan bağırsak, akciğer veya karaciğeri içeren akut greft-versus-host hastalığı derece III veya IV

2.3. Sınıflandırma

Aspergillus türleri taksonomik olarak; mantarlar (fungi, kingdom) aleminde, *Dikarya* alt aleminde, *Ascomycota* şubesinde, *Pezizomycotina* alt şubesinde, *Eurotiomycetes* sınıfında yer almaktadır. *Aspergillus* türlerinin teleomorfları(eşeyli=seksüel form) *Ascomycota* şubesinin *Eurotiales* takımında sınıflandırılırken, anamorfik formları (eşeysiz=aseksüel form) *Deuteromycota* şubesinin *Hyphomycetes* sınıfında *Trichocomaceae* ailesi içinde yer almaktadır(12).

İlk kez 1965'te Raper ve Fennel, morfolojik özelliklerine göre 132 *Aspergillus* türünü 18 alt grup ve 18 varyete içinde sınıflandırmıştır. İkibinli yıllara

kadar, *Aspergillus* türlerinin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması geleneksel olarak eşeysiz üreme şekillerinin makroskopik ve mikroskopik morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Bu amaçla; koloninin rengi, gelişme hızı ve sıcaklık toleransı gibi kültür özellikleri yanında mikroskopik olarak konidyoforların uzunluğu ve genişliği, vezikülün büyüklüğü ve şekli, fiyalitlerin dizilimi, konidyumların rengi, büyüklüğü ve zincir uzunluğu gibi özellikler kullanılmıştır.

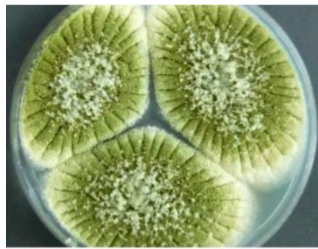
Son on yılda *Aspergillus* cinsinin tanımlanma, sınıflandırma ve terminolojisine ilişkin çalışmalar hızla artmıştır. DNA dizisi ve beta tubulin, kalmodulin, ribozomal RNA gen bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik araştırmalarda; fenotipik olarak birbirine çok benzeyen eşeysiz türlerin filogenetik ağaçta birbirinden çok uzakta ve farklı yerlerde, buna karşılık fenotipik özellikleri birbirinden çok farklı olan türlerin filogenetik olarak birbirine çok yakın olduğu saptanmıştır. Son taksonomi araştırmaları ile günümüzde ; *Aspergillus* cinsi içindeki eşeysiz türler dokuz eşeyli cins (*Chaetosartoria*, *Dichotomomyces*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Neocarpenteles*, *Neopetomyces*, *Neosartorya* ve *Petromyces*) ile ilişkilendirilmiştir.

2011 ve 2012 yılında ‘One Fungus – One Name’ prensibi kabul edilerek eşeyli ve eşeysiz şekillerin tek bir ad altında toplanması, çift (çoklu) adlandırılmadan kaçınılması ve şimdilik adlandırmada mantarların eşeysiz isimlerinin kullanılması kararlaştırılmıştır(13).

2.4. Genel Özellikler

2.4.1. Makroskobik özellikler

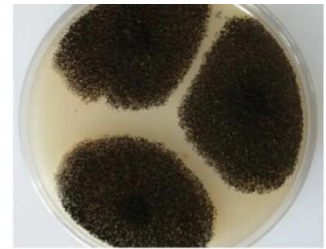
Aspergillus türleri, hiyalen küf mantarlarıdır. Koloniler genellikle 48-90 saat içinde seçici agarda (Sabouraud dekstroza agar-SDA, mısır unu agar) ürer. Koloni yüzeyleri başlangıçta beyaz olup sonrasında türlere göre sarı, yeşil, kahverengi veya siyah gibi renklere dönüşebilmektedir. Koloni yüzeyi pamuğumsu veya kadifemsi görünümde olabilir. Koloni tabanı da beyaz, sarı, kahverengi olabilmektedir. Ayrıca kolonilerin hava ile temas eden kısımlarının rengi ve koloni arkasının pigmentasyonu farklı olabilir. *Aspergillus* türleri arasında koloni görünimleri yönünden farklılıklar vardır. Koloni görünümü, *Aspergillus* türü hakkında fikir verse de kesin tanımlama hif ve konidyal baş yapısının mikroskobik incelenmesi ile olmaktadır.



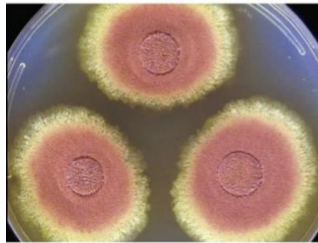
Aspergillus flavus



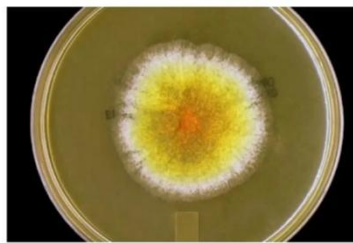
Aspergillus fumigatus



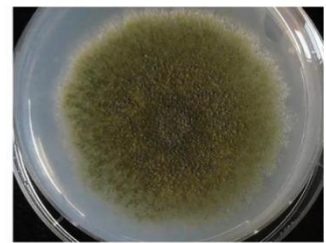
Aspergillus niger



Aspergillus terreus



Aspergillus glaucus



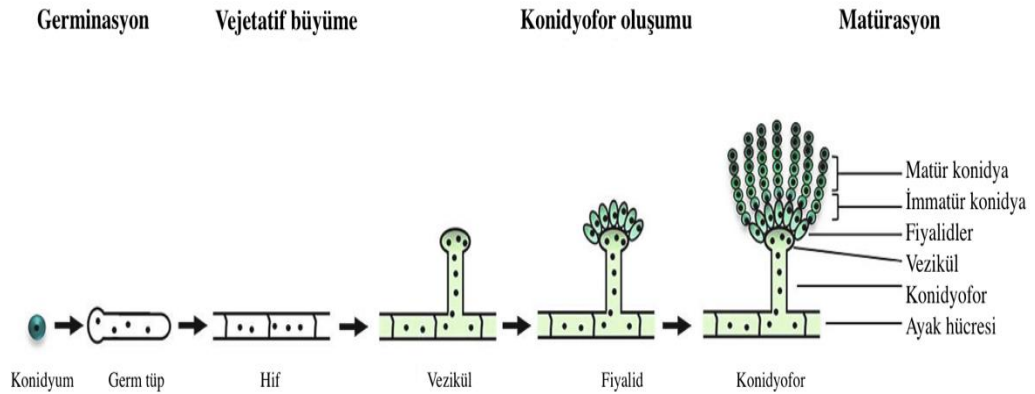
Aspergillus nidulans

Şekil 1. *Aspergillus* türlerinin SDA üreme şekilleri

2.4.2. Mikroskopik özellikler

Aspergillus cinsinde sınıflandırılan mantarlar, konidya olarak adlandırılan aseksüel sporlar aracılığıyla çoğalan anamorfik (aseksüel) filamentli organizmalardır.

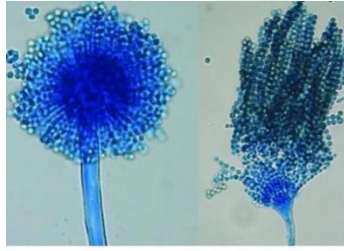
Tüm *Aspergillus* türlerinin ayırt edici özellikleri arasında mikroskopik olarak 4-6 µm'lik hiyalen, paralel duvarlı ve septalı hif oluşturmaları bulunur. Düzenli dallanmaları 45 derecelik bir açı ile çıkar. Bu özellik diğer hifalı mantarlardan ayırımında önemlidir. Belirli bir vejetatif büyüme döneminden sonra, uygun koşullar altında, hifal hücreler normal büyümeyi durdurur ve birden fazla konidya zinciri taşıyan konidyoforu oluşturur(14).



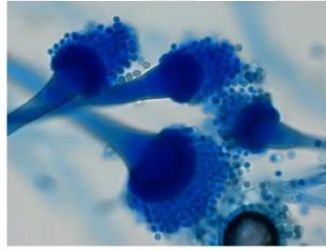
Şekil 2. Konidyofor oluşumu(15)

Konidyoforlar ayak hücresi olarak bilinen özelleşmiş bir hif segmentinden köken alırlar ve şişkin bir vezikül olarak sonlanırlar. Vezikülün yüzeyinde bir (uniseriate) ya da iki (biseriate) sıra fiyalid hücresi bulunmaktadır. Uniseriate konidyoforda fiyalidler direkt olarak vezikülden çıkarken, biseriate konidyoforda

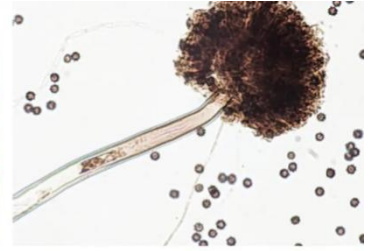
vezikülden yükselen ve metül adı verilen bir iç hücre dizisi fiyalidleri oluşturmaktadır. Fiyalidler, pigmente konidyum zincirleri oluşturan konidyagenöz hücrelerdir. Konidyoforların uzunluk, genişlik ve yapısal özellikleri (pürüzlü ya da pürüzsüz), vezikülün büyüklük ve kontürü, metülün varlığı/yokluğu (uniseriate ya da biseriate), fiyalidlerin düzeni ve konid yumların renk ve boyutu tür tanımlamada kullanılan özelliklerindendir. Bazı *Aspergillus* türleri tarafından üretilen özel yapıların varlığı, bu türlerin tanımlanmasında yarar sağlamaktadır. Bunlara örnek olarak Hülle hücreleri, allenid ve kleistotesya verilebilir(16).



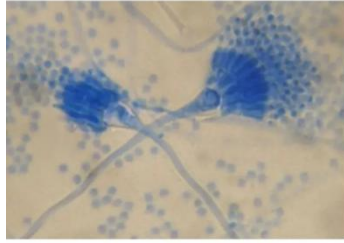
Aspergillus flavus



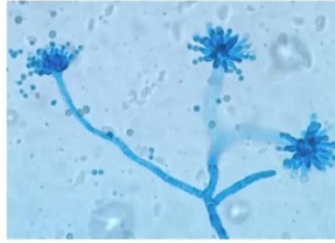
Aspergillus fumigatus



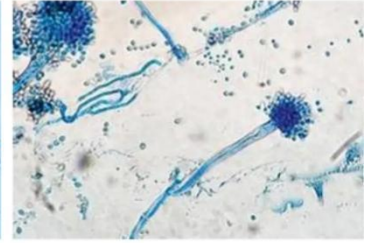
Aspergillus niger



Aspergillus terreus



Aspergillus glaucus



Aspergillus nidulans

Şekil 3. *Aspergillus* türleri mikroskobik görünimleri

Tablo 2. En sık görülen *Aspergillus* türlerinin morfolojik özellikleri

Türler	Makroskobik Görünüm		Mikroskobik Görünüm		
	Yüzey	Taban	Konidyofor	Fiyalid	Vezikül
<i>A. fumigatus</i>	Gri, mavi yeşil	Bronzdan beyaza	Kısa (<300µm), düz, renksiz veya yeşil	Tek sıralı	Yuvarlak, kolumnar baş
<i>A. flavus</i>	Sarı-yeşil	Sarıdan kırmızı kahverengiye	Renksiz, pürüzlü	Tek sıralı veya iki sıralı	Yuvarlak, radyal baş
<i>A. niger</i>	Siyah	Beyazdan sarıya	Uzun, düz, renksiz veya kahverengimsi	İki sıralı	Yuvarlak, radyal baş
<i>A. terreus</i>	Tarçın, kahverengine	Beyazdan kahverengine	Kısa (<300µm), düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, sıkı kolumnar
<i>A. versicolor</i>	Başlangıçta beyaz, sonra sarı, bronz, soluk yeşil veya pembe	Beyazdan sarıya veya kırmızı mor	Uzun, düz, renksiz	İki sıralı	Yuvarlak, dağınık radyal baş

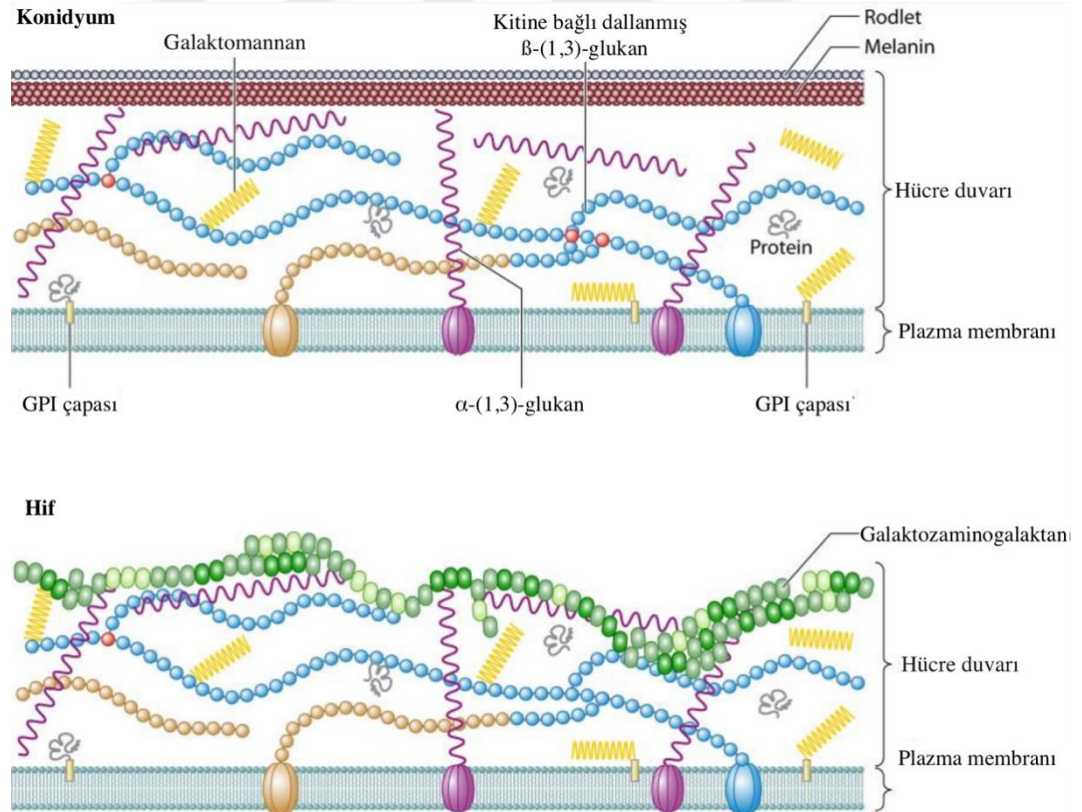
2.4.3. Hücre duvar yapısı

Hücre duvarı: Hücre duvarı mantar hücrelerini dış etkilerden koruyan önemli bir organeldir. Özellikle *Aspergillus* gibi patojen mantarlar söz konusu olduğunda, konak tepkisini etkileyen virülans faktörleri içerdiği için enfeksiyonda da aktif rol oynamaktadır.

Son yirmi yılda yapılan genetik, biyokimyasal ve immünolojik çalışmalar sayesinde *Aspergillus fumigatus*, filamentli bir mantarın doğal ortamında veya patojenik olarak büyümesinde hücre duvarının rolünü anlamak için bir model haline gelmiştir. *A. fumigatus*'un hücre duvarının %90' ından fazlası polisakkaritlerden oluşur (17). Çekirdek iskelet, kitin, galaktomannan ve β -1,3- β -1,4 glukanolara bağlı dallı bir β -1,3 glukandan oluşmaktadır. Diğer polisakkaritler (α -1,3 glukanol ve

mannanlar) ise fibriler polisakkaritlerin arasını dolduran bir çimento görevi görmektedir.

Konidyumun ve hifal yapının hücre duvar yapıları arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Konidyumun dış tabakası havada hareket yeteneği için hidrofobik özellikler kazandıran bir rodlet tabakasıyla kaplıdır. Bu rodlet tabakası *RODA* geni tarafından kodlanan hidrofobinlerden oluşmaktadır. Rodlet tabakasının altında yine konidyumlara özgü olarak hücre duvarının yapısı ve sertliği için önemli olan melanin tabakası bulunmaktadır. Hifal yapının hücre duvarı ise konidyumdan farklı olarak glikozaminogalaktanla kaplanmıştır(18).



Şekil 4. Konidyum ve hifal hücre duvarlarının şematik temsili(19)

2.5. Antijenik Özellikleri

2.5.1. Galaktomannan

Galaktomannan (GM), 1970'lerin başında keşfedilen ve İA tanısı için en sık kullanılan antijendir. Galaktomannan biyolojik ve immünolojik özelliklere sahip bir galaktoz polimeridir. Galaktomannan ayrıca *A. fumigatus*'ta bu heksozun beş üyeli halka formu olan galaktofuranoz (Galf) şeklinde de bulunabilir. Galaktomannan, glikozilfosfatidilinositol (GPI) ile plazma membranına sabitlenir ve hücre duvarındaki kısa bir β -1,3-glukan zincirinin indirgeyici olmayan ucuna kovalent olarak bağlanır(20).

2.5.2. β -(1,3)- D-Glukan

β -(1,3)-D-Glukan (BDG), *Cryptococcus* ve *Zygomycetes* hariç birçok mantar türünün hücre duvar yapısında bulunan β -1,6 dallanmalara sahip β -1,3 zincirlerinden oluşan D-glukoz homopolimeridir(23). İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Serolojik olarak β -(1,3)-D-Glukanın tespiti, atnalı yengeçleri (horseshoe crab) olarak bilinen *Limulus polyphemus* ve *Tachypleus tridentatus* amebositlerinden elde edilen faktör G'nin BDG tarafından aktive edilerek koagülasyon kaskadını başlatması esasına dayanmaktadır (21).

2.6. Virülans Faktörleri

2.6.1. Adhezyon (Yapışma)

Aspergillus konidyumları solunum yolu aracılığıyla alındığı için bu konidyumların konak dokularına yapışabilme yeteneği patojenite için önemli olmaktadır. Rodlet tabakası konidyuma hidrofobik bir yapı kazandırarak konak hücreye yapışmasından sorumludur(22). AspF2, CspA, AfCalAp proteinleri de adezin olarak tanımlanan proteinler arasındadır. Bu proteinlerinde delesyon olan mutantlar *in vitro* ortamda konak hücrelerine kusurlu bağlanma göstermektedir(23, 24). *A. fumigatus* hifleri de bir ekzopolisakkarit olan galaktozaminogalakтан (GAG) salgılayarak konak hücreye yapışabilir. GAG ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olmakla beraber biyofilm oluşumunda, antifungal dirençte ve konağın bağışıklık sisteminden kaçmada rol oynadığı gösterilmiştir(25). Bir çalışmada $\Delta uge3$ ve $\Delta medA$ GAG eksikliği olan mutantların *in vitro* akciğer epitel hücrelerine zayıf adezyon yeteneği olduğu gösterilmiştir(26).

2.6.2. Termotolerans (Isı toleransı)

Aspergillus'un 30 derecenin üzerindeki sıcaklıklarda üreyebilme kapasitesi 5 gen bölgesi ile ilişkili bulunmuştur (*THTA*, *CGRA*, *AFMPT1*, *KRE2* / *AFMNT1* ve *HSP1* / *ASPF12*). *A. fumigatus*, 50°C'ye kadar geniş bir sıcaklık aralığında büyüme yeteneğine sahip termofilik bir organizmadır(27). Fakat *A. fumigatus*'ta hem termotolerans hem de virülans için iki gen bölgesi tanımlanmıştır. Bu genlerden *AFMPT1* geni, *A. fumigatus*'un 37°C'nin üzerinde büyümesi için gerekli olan bir mannosil transferazı kodlamaktadır. Yapılan bir deneyde *AFMNT1* geninin bozulmasıyla α -1,2-mannosiltransferazın silinmesi hücre duvarı hasarına neden

olmuştur ve bu da mutantın 48°C'de büyümesini engellemiştir(28). Benzer şekilde, *CGRA* geninin bozulması, 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda büyüme bozukluğu olan bir kökene yol açmış ve bağışıklık sistemi baskılanmış bir fare modelinde bu köken zayıf virülans göstermiştir(29). *CGRA* nükleolus içinde yer alır ve ribozom biyogenezinde rol oynar; bu da yeni ribozom üretiminin *A. fumigatus* enfeksiyonunun erken evreleri için gerekli olduğunu düşündürmektedir (30).

2.6.3. Enzimler

Aspergillus konak dokuda ilerlemesini ve makromoleküllerden besin ihtiyacını karşılamasını sağlayan nükleaz, fosfotaz, elastaz, peptidaz ve proteaz gibi ekstraselüler enzimlere sahiptir. *Aspergillus* türleri tarafından salgılanan proteolitik enzimler (serin proteaz, metallo proteaz, aspartik proteaz) virülansa yardımcı olmaktadır(31). Fungal serin proteazlar IL-8 salınımını uyarak nötrofillerin toplanmasını ve akciğerde inflamasyonu artırır(32).

2.6.4. Pigmentler

Melaninler, hidrofobik yapıda ve negatif yüklü makromoleküllerdir. *A. fumigatus* konidyuma hidrofobik özellikler kazandıran bir rodlet tabakası ile kaplı melaninden oluşur(33). *Aspergillus*'da bulunan en önemli melanin rodlet tabakasının altında bulunan hidrofobik polimer dihidroksinaftalen (DHN) melanindir. Bir çalışmada melanin kümesindeki genlerin silinmesiyle DHN türündeki melaninin konidyum hücre duvarının yapısı ve sertliği için önemli olduğu gösterilmiştir(34). Bir başka çalışmada, melanin biyosentezinin ilk adımındaki

proteini kodlayan *PKSP* geni silinmiştir ve bu rodlet yüzeyinde glikoproteinler birikerek daha hidrofilik bir yapı oluşmasıyla ve daha düşük virülansa sahip olmasıyla sonuçlanmıştır(35). Melanin aynı zamanda Ca^{2+} /kalmodulin yolunu inhibe ederek LC3 ile ilişkili fagositozun NADPH oksidaz bağımlı aktivasyonunu bloke eder(36).

2.6.5. Toksinler

Aspergillus türleri büyüme sırasında aflatoksin, okratoksin A, fumagilin ve gliotoksin gibi ikincil metabolitler sentezlemektedir. Bu metabolitlerden üzerinde en fazla durulan gliotoksindir. *A. fumigatus* tarafından bol miktarda üretilir ve yapılan deneylerde İA'lu hastaların serumlarından *in vivo* izole edilen tek toksindir(37). *A. fumigatus*'ta gliotoksin üretimi ile bu türün patogenezi arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada *A. fumigatus* izolatlarının %95'inden fazlasının gliotoksin ürettiği bulunmuştur(38). Gliotoksinlerin; fagositozu uyarma, T hücresi proliferasyonu, mast hücresi aktivasyonu, sitotoksik T hücresi yanıtlarının inhibisyonu, siliyer atım sıklığının yavaşlaması ve epitel hücre hasarının indüklenmesi dahil olmak üzere çoklu immünsüpresif fonksiyonları vardır(39).

2.7. Patogenez

Aspergillus enfeksiyonu tipik olarak konidyumlarının solunum yoluyla akciğere alınması sonucunda bulaşır. Nadiren kontamine suyla oral veya aerosol maruziyeti sonucunda da ortaya çıkabilir(40). Konidyumlar sıcaklık, pH ve ozmotik

basınç dahil olmak üzere bir dizi çevresel stres faktörüne karşı dayanıklıdır(41). *A. fumigatus* konidyumlarının küçük boyutu(2–3 µm), akciğer alveollerine derinlemesine nüfuz etmesine yardımcı olur. *A. flavus* gibi diğer *Aspergillus* türleri daha büyük konidyumlar ürettiği için, üst solunum yollarındaki mukosiliyer aktivite aracılığıyla daha kolay uzaklaştırılabilmektedir(42). Bu uzaklaştırma süreci başarısız olursa, konidyumlar morfolojik değişime uğrayarak konak dokularını invaze ederek enfeksiyona neden olan hifler oluşturabilirler.

2.8. Konak Savunması

2.8.1. Doğal immün yanıt

Solunum yoluyla alınan *Aspergillus* konidyumları bağışıklık sistemi tarafından sürekli olarak temizlenmektedir. Akciğer epitel, *Aspergillus* ile karşılaşmada savunmanın ilk hattını oluşturmaktadır(43). Epitel hücreleri fiziksel bir bariyer görevi görmekle birlikte, konidyumların hava yolunu kolonize etmesini önleyen mukosiliyer aktiviteye de katılmaktadırlar(44). Özellikle MUC5AC ve MUC5B başta olmak üzere polimerik mucusların salgılanması ve epitel hücre yüzeyindeki silyaların koordineli hareketiyle konidyumların temizlenmesini sağlamaktadır(45). Bu mekanizmalar sağlıklı bir konakta başarılı olsa da bağışıklık sistemi baskılanmış veya altta yatan bir akciğer hastalığı olan konaklarda etkili olmamaktadır(46). Solunum yoluyla alınan konidyumların bir kısmı küçük boyutları nedeniyle alveolar epitel hücrelerine ulaşabilmektedir(47). *Aspergillus*

türleri epitel hücreleri içinde hayatta kalma yeteneği ile fagositozdan kaçabilmektedir(48).

Akciğer epitel hücreleri tarafından konidyumun tanınması, öncelikle patojen tanıma reseptörlerinin (PRR) ifadesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. PRR'ler tarafından özgül patojen ilişkili moleküler paternlerin(PAMP) tanınması, antimikrobiyal aktivasyonunu tetiklemektedir. Bunlar arasında arasında toll benzeri reseptörler (TLR), dektin-1, sürfaktan proteinleri A ve D (SP-A,SP-D), mannoz bağlayıcı lektin ve pentraksin-3(PTX3) bulunmaktadır(49). TLR'lerin aktivasyonu, genel olarak, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükler. TLR eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalar, spesifik TLR'lerin farklı mantar yapılarını tanıdığını ve aspergillozda inflamatuvar yanıtı düzenlediğini göstermiştir.

Alveolar makrofajlar (AM) *Aspergillus*'un inhale edilmiş konidyumları ile etkileşime giren ilk bağışıklık hücreleridir. AM'ler içinde konidyumların öldürülmesi, LC3 (hafif zincir-light chain3) ile ilişkili fagositozun (LAP) NADPH oksidaz aracılı aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bağışıklık sistemi sağlıklı bir konağın akciğerinde, konidyumlar PTX3, SP-D gibi PRR'ler aracılığıyla yakalanarak alveoler makrofajların fagositozunu artırabilmektedir(50). AM'ler konidyumları TLR'ler ve Dektin-1 aracılığıyla fagosit ederek proinflamatuvar bir yanıtı başlatmaktadır. AM'ler aynı zamanda bağışık cevabın önemli modülatörleridir. Nötrofiller ve dendritik hücreler gibi diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanması ve T yardımcı (Th) hücrelerinin uyarılmasında görevli olan TNF, IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinleri salgılamaktadır.

Dektin-1, makrofajlarda, nötrofillerde ve dentritik hücrelerde yüksek oranda bulunan bir tip II transmembran proteindir. Dektin-1, çimlenen konidyum üzerindeki β -glukanı tanıyabilir(51). Alveoler makrofajlardan kaçan konidyumlar çimlenmeye ve alveoler epitel hücrelerine nüfuz etmeye devam ederler. Nötrofiller, çimlenen konidyumları ve hifleri inaktive etmek için NET (Nötrofil dışı tuzak yapılar) oluşumu, degranülasyon ve laktoferrin üretimi süreçlerini kullanır.

Fagositik hücrelerde NADPH oksidazın aktivasyonu, oksijenin süperoksit anyonuna dönüşümü ve antimikrobiyal aktiviteye sahip reaktif oksidan metabolitlerin (ROS) oluşumu ile sonuçlanır. ROS üretimi, NADPH oksidaz aktivasyonu yoluyla çimlenen konidyumlar üzerinde etkili olmakla beraber, çimlenmeyen konidyumlar için etkisiz kalmaktadır(52). Kronik granümatöz hastalığına sahip hastalar NADPH oksidazı kodlayan genlerdeki mutasyon sonucunda bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara daha duyarlı hale gelmektedirler(53). NET'ler ise esas olarak nötrofillerden çıkan ekstraselüler lif ağlarıdır. IL-8 gibi çeşitli proinflamatuvar mediatörler NET oluşumunu indüklenmektedir. NET oluşumu, *A. fumigatus* hifleri gibi fagosite edilemeyen büyük patojenlere karşı savunma için önemlidir(54). Dentritik hücreler ise çimlenen konidyumları fagosite ederek T hücrelerine sunulmak üzere işlerler. Böylece, *A. fumigatus*'a karşı kazanılmış bağışıklık yanıtı aktive ederler.

2.8.2. Kazanılmış immün yanıt

Solunum yoluyla alınan konidyumların ortadan kaldırılması esas olarak doğal immün yanıtı bağlıdır. Fakat ciddi *Aspergillus* enfeksiyonlarında, doğuştan

gelen bağışık yanıt tarafından üretilen sitokinlerle aktive edilen kazanılmış bağışıklık sistemi aktif rol oynamaktadır. T ve B lenfositler bu savunma sisteminin iki ana bölümünü temsil eder.

T lenfositler mantarların çoğalmasını engelleyerek, hücresel bağışıklık yanıtı doğrudan veya dolaylı olarak kontrol eden temel hücrelerdir (55). T hücrelerini aktive eden antijen sunucu hücrelerin olgunlaşması, PRR aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Aktif T hücreleri, proinflatuvar sitokinleri salgılayarak naif T hücrelerinin CD4 pozitif yardımcı T hücre alt kümelerine farklılaşmasını sağlar. Th1, Th2, Th9, Th17 ve düzenleyici T hücreleri (Treg) gibi bir çok Th alt kümesi vardır. Her alt küme belli bir sitokin kümesi üretmektedir(56). IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α gibi proinflatuvar sitokinler Th1 tarafından üretilen bağışıklık yanıtının baskın sitokinleridir. Th1 tarafından üretilen ve hücresel bağışıklığı uyaran en önemli sitokin ise IFN- γ 'dır(49).

Bir çalışmada, kemik iliği nakli olmuş insanlara ve farelere *A. fumigatus*'a özgü IFN- γ üreten CD4 Th transferinin, invazif mantar enfeksiyonlarında koruyucu olduğu bulunmuştur(57). Th2 immün yanıtının rolü, artan mantar yüküyle ve kliniğin şiddeti ile ilişkilidir. Th2 hücreleri esas olarak IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β ve IL-13 gibi anti-inflatuvar sitokinler üretmektedir. Th2'ye bağlı antikorlar, Th1 bağışıklığını uyarak bir miktar koruma sağlayabilir. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin etkinliği Th1 ve Th2 alt kümeleri arasındaki dengeye bağlıdır. Th17 hücrelerinin ise proinflatuvar genlerin ve antimikrobiyal peptitlerin üretiminde, nötrofillerin aktivasyonunda ve toplanmasında rol oynadığı bulunmuştur(55).

B hücreleri ise antijen sunarak T hücrelerinin aktivasyonunu ve hücre içi patojenlere karşı farklılaşmasını düzenlerler. Mantar enfeksiyonlarında antikorların koruyucu rolü, invazif mantar enfeksiyonu olan hastalarda anti-fungal antikorların varlığı ile kanıtlanmıştır. Glikoproteinler, glikolipidler, peptitler ve polisakkaritlere karşı bazı anti-fungal antikorların konakçıda koruma sağladığı bilinmektedir(55).

2.9. Klinik

Aspergillus türleri, konağın immünolojik yanıtına bağlı olarak alerjik reaksiyonlardan invazif akciğer enfeksiyonuna kadar giden klinik tablolara neden olabilmektedir(19). Üst solunum yolu, bronşlar, akciğer parankimi ve komşu yapılar (örn. plevral veya lenf düğümleri) en sık tutulan bölgelerdir, ancak hastaların %10'luk bir kısmında görülmektedir(58).

2.9.1. Aspergilloma

Aspergilloma, akciğerde bir kavite içinde fibrin, mukus ve hücresel debris ile birlikte *Aspergillus* hiflerinin yoğun bir şekilde toplanması ile oluşan fungus topu denilen bir yapı olarak tanımlanabilir(59). Sıklıkla KOAH, geçirilmiş tüberküloz, sarkoidoz veya diğer yapısal akciğer hastalıklarından kaynaklanan önceki akciğer kavitelerinde oluşur. Bunlar radyolojik görüntülemelerde boşluk içinde serbestçe hareket edebilen bir kitle olarak görülmektedir. Hastalar, sekonder bakteriyel enfeksiyonlara bağlı hemoptizi ile başvurabildiği gibi asemptomatik de seyredebilmektedir. Semptomatik lezyonlar cerrahi olarak rezeke edilebilir. Predispozan konak faktörleri varsa sıklıkla bu tedavi seçeneğini engeller. Bu

nedenle hemoptizi tedavisi için antifungaller ve/veya embolizasyon gerekmektedir(60).

2.9.2. Alerjik Bronkopulmoner Aspergilloz (ABPA)

Alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA), astım ve kistik fibrozlu hastaların hava yollarında kolonize olan *A. fumigatus*'a karşı bağışık yanıtın neden olduğu inflamatuvar bir hastalıktır. Tanı kriterleri arasında; astım, *A. fumigatus*'a karşı deri reaktivitesi, yüksek serum IgE titreleri, pulmoner infiltratlar, merkezi bronşektazi, eozinofili ve *Aspergillus*'a karşı anti IgG antikorlarının varlığı bulunmaktadır.

Kapsamlı bir incelemede dünya çapında yaklaşık beş milyon ABPA olgusu olduğu ve yalnızca Hindistan'ın yaklaşık 1,4 milyon olguya sahip olduğu bildirilmiştir(61, 62). Astımlı hastalarda ABPA görülme sıklığı %13 gibi yüksek bir oranda olabilmektedir. Bu nedenle bronşiyal astımlı bir hastayı tedavi ederken ABPA'dan şüphelenilmelidir. Erken tanı ve uygun tedavi bronşektazinin başlangıcını geciktirmektedir. Bu nedenle bronşiyal astım tanısı alan hastaların ABPA açısından taranması gerekmektedir.

ABPA olgularında Bilgisayarlı Tomografide (BT) göğüste genellikle santral bronşektazi görülmektedir. Fakat uzun süredir devam eden ve tedavi edilmeyen ABPA sonrasında fibroz gelişebilmektedir. Tedavide antifungaller ve kortikosteroidler kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda bu hasta popülasyonunda itrakonazol kullanılması, kortikosteroid kullanımının azalmasına veya kesilmesine yardımcı olmuştur(63). Son zamanlarda, omalizumab gibi yeni ajanların tedavi için

kullanımı araştırılmaktadır. Eğer itrakonazole karşı intolerans ortaya çıkarsa vorikonazol, isavukonazol veya posakonazol gibi diğer triazoller de tedavi seçenekleri arasında yer alabilir(64).

2.9.3. Kronik pulmoner aspergilloz (KPA)

Kronik pulmoner aspergilloz (KPA), çok sayıda kavitasyon ve fungus topundan oluşan kronik kaviter pulmoner aspergillozdan, kronik fibrozan veya nekrotizan aspergilloza kadar birçok farklı klinik tabloyu içermektedir. Ateş, titreme, gece terlemesi ve kilo kaybı gibi semptomlar ile hem tüberkülozu taklit edebilir, hem de öksürük, göğüs ağrısı ve hemoptizi gibi subakut semptomlarla kendini gösterebilir(65). Radyolojik görüntülemelerde kaviter lezyonları çevreleyen ve zamanla ilerleyebilen enflamasyon görülmektedir. Akciğer dokusunun devam eden yıkımı hastanın solunum kapasitesinde düşüşe neden olmaktadır(65). Mortalite oranları ilk yıl %50'yi geçmekle birlikte, antifungal tedavi ile mortalite azalabilir (66).

2.9.4. Akut invazif pulmoner aspergilloz (İPA)

Akut invazif pulmoner aspergilloz (İPA), solunum yolu kolonizasyonundan bronş ve bronşiyollerin hifal invazyonuna ve anjiyo-invazyonuna kadar uzanan bir süreç olarak tanımlanabilir(67). İPA HSCT alıcısı olan hastalarda ilk ay içinde yüksek sıklıkta görülebilmektedir(68). İPA en sık ateş, öksürük, göğüs veya plöritik ağrı, nefes darlığı ve hemoptizi ile ortaya çıkmaktadır. İmmünsüprese veya nötropenik hastalarda İPA, inflamatuvar yanıtın zayıf olması nedeniyle çok az

semptomla veya asemptomatik olarak seyredebilir. Bu nedenle hastalara geç tanı konmaktadır. İPA'dan ancak anjiyoinvazyon belirtileri (göğüs ağrısı veya hemoptizi) görüldükten sonra şüphelenilmektedir(69).

BT'de anjiyo-invazif patern ve hava yolu-invazif patern olmak üzere iki farklı tarama paterni ortaya çıkmaktadır(70). Anjiyo-invazif patern, hiflerin damar duvarına nüfuz etmesinin radyolojik olarak görüntülenmesini tanımlar. Nekroza ve hematojen yayılımına neden olan fungal trombus oluşumuna yol açar. Genellikle buzlu cam opaklığı ile çevrili nodüllerden oluşmaktadır ve şiddetli nötropeni ile ilişkilendirilmiştir. Bu görünüm perilezyonel hemorajiyi yansıtmakta ve halo işaretini oluşturmaktadır (71). Halo işareti nötropeni ile ilişkili İA'yı düşündürse de özgül değildir. Diğer tüm İFE'lerde, bakteriyel enfeksiyonlarda, primer veya metastatik malignitelerde, polianjiitli granüloamatözda, bronşiolit obliteransta veya fokal akciğer hasarı gibi çeşitli durumlarda da görülebilmektedir(72).

Hava yolu invazif paterni ise nötropenik olmayan hastalarda daha sık görülmektedir(73). BT taramasında çok merkezli nodüler yapılar ve kalınlaşmış bronş duvarları görülmektedir. Bu görüntü tomurcuklanmış ağaç işareti olarak adlandırılır. Bu durum hastanın klinik seyrinin kötü gittiğine ve mekanik ventilasyon gereksinimi duyulabileceğine işaret etmektedir(74). Fakat bu bulgular başka enfeksiyonlarda da görülebildiği için İA tanısı için özgül değildir.

2.9.5. Trakeobronşiyal aspergilloz

Trakeobronşiyal alana sınırlanmış olarak görülen bu enfeksiyon, en sık solid organ nakli (özellikle akciğer nakli) olmuş hastalarda görülmektedir(75). Klinik

olarak öksürük, ateş, “wheezing”, hipoksi ve ciddi solunum yetmezliği görülebilir. Bronkoskopide bazen ana bronşu tıkayan mantar kütlesi, trakea ve bronşlarda nodüler plaklar veya psödomembranlar görülebilmektedir(76).

2.10. Tanı Yöntemleri

İA tanısı için tek bir "altın standart" test bulunmamaktadır. Bu nedenle hızlı ve doğru tanı elde etmek için mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemelerin, konak faktörlerinin, klinik ve radyolojik bulguların birlikte değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır(77).

2.10.1. Klinik tanımlama

İFE için klinik tanı kriterleri uluslararası bir çalışma grubu olan EORTC-MSG tarafından tanımlanmıştır. Bu kriterler immün sistemi baskılanmış hastalar ve klinik çalışmalar için ilk 2002 yılında oluşturulmuştur. Sonrasında 2008(78) ve ardından 2020(79) yıllarında kriterlerde revizyona gidilmiştir. Bu kriterlere göre, immün sistemi baskılanmış kanserli hastalar ve hematopoetik kök hücre nakli alıcıları İFE içindeki aspergilloz açısından üç gruba ayırmıştır;

Kanıtlanmış (proven) İA; Steril klinik örneğin histopatolojik, sitopatolojik veya direkt mikroskopik incelemesinde *Aspergillus* hiflerinin görülmesi veya steril vücut bölgelerinden alınan örneğin kültüründe üreme olması

Yüksek olasılıklı (probable) İA; Konak faktörlerinden en az biri, klinik kriterlerden en az biri ve mikolojik kriterlerden en az birinin bulunması

Düşük olasılıklı (possible) İA; Konak faktörlerine ek olarak klinik kriterleri olan ancak mikrobiyolojik kriterlere sahip olmayan olguları ifade etmektedir. EORTC-MSG'nin 2020'de güncellenen invazif fungal enfeksiyon kriterleri Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. İnvaziv pulmoner aspergilloz EORTC/MSG 2020 tanı kriterleri(79)

Konak Faktörleri 1. Nötropeni (<500 nötrofil/mm³, >10 gün) 2. Hematolojik malignite (yakın zamanda tedavi veya remisyon) 3. Allojenik kök hücre naklini 4. Solid organ nakli 5. Uzun süreli kortikosteroid kullanımı (son 60 gün içinde ≥ 3 hafta boyunca $\geq 0,3$ mg/kg) 6. T hücre baskılayan ilaç kullanımı (siklosporin, TNF-α blokörleri) 7. B hücre baskılayan ilaç kullanımı (bruton kinaz inhibitörleri) 8. Kalıtsal şiddetli immün yetmezlik (kronik granülomatöz hastalık, STAT 3 eksikliği veya şiddetli kombine immün yetmezlik gibi) 9. Birinci basamak steroid tedavisine dirençli, III veya IV. Derece bağırsak, akciğer veya karaciğeri etkileyen akut graft-versus-host hastalığı
Klinik kriterler (Akciğer aspergillozu) BT'de aşağıdakilerden birinin varlığı 1. Halo işareti olan ya da olmayan iyi sınırlı lezyonlar 2. Hava-hilal bulgusu 3. Kaviter lezyon 4. Kama biçimli segmenter veya lobüler konsolidasyon (Diğer akciğer küf hastalıkları) Akciğer aspergilloz görüntülerine ek olarak ters halo işareti

Mikolojik kriterler

(Doğrudan test)

1. Balgam, BAL, bronşiyal fırça veya aspirattan kültür yoluyla elde edilen herhangi bir küf, örneğin *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* türleri veya *Mucorales*
2. Balgam, BAL, bronşiyal fırça veya aspiratta küf belirtisi gösteren mantar elementlerinin mikroskopik tespiti

(Dolaylı test)

1. Plazma, serum veya BAL'da galaktomannan antijeni (Aspergilloz)

- Tek serum veya plazma: ≥ 1.0

- BAL sıvısı: ≥ 1.0

- Tek serum veya plazma: ≥ 0.7 ve BAL sıvısı ≥ 0.8

2. *Aspergillus* PCR

- Plazma, serum veya tam kan 2 veya daha fazla ardışık PCR testi

pozitif

- BAL sıvısı 2 veya daha fazla çift PCR testi pozitif

- Plazma, serum veya tam kanda en az 1 PCR testi pozitif ve BAL

sıvısında 1 PCR testi pozitif

2.10.2. Radyoloji

Yetişkinlerde İPA tanısında görüntülemenin rolüyle ilgili son veriler, yüksek çözünürlüklü BT taramasının (HRCT), göğüs radyografileri, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) yerine tercih edildiğini göstermektedir. Bu durumun nedeni HRCT'nin göğüs radyografisinden daha hassas olması ve MRI'dan daha ulaşılabilir olmasıdır(80).

EORTC/MSG 2020 kriterlerinde pulmoner İM'ler radyolojik paternlerine göre anjiyo-invazif ve hava yolu invazif formlar olarak sınıflandırılmıştır. Halo işareti, hava hilal işareti kaviter lezyon ve kama biçimli segmenter veya lobüler konsolidasyon gibi anjiyo-invazif formlar nötropenik hastalarda daha sık gözlenmektedir. BT taramasında, halo işareti olan nodüller veya infiltratlar nötropenik hasta gruplarında İPA için yararlıyken diğer hasta gruplarında nonspesifiktir(81). Nötropenik olmayan hastalarda, bronkopnömoni,

konsolidasyon, kavitasyon, plevral efüzyonlar, buzlu cam opasiteleri, tomurcuklanmış ağaç görünümü (tree-in-bud) ve atelektazi gibi çeşitli nonspesifik bulgular ve çoklu pulmoner nodüller bulunmaktadır(82).

EORTC/MSG 2020 tanımlamalarında pulmoner aspergilloz ve diğer pulmoner küf hastalıkları için klinik kriterler ayrılmıştır. Mukormikoz gibi diğer pulmoner küf hastalıkları için klinik kriter olarak ters halo işareti eklenmiştir. Ters halo işareti pulmoner mukormikozlu hastalarda pulmoner aspergillozlu hastalara göre daha yaygın olarak görülmektedir(83).

2.10.3. Mikroskopik inceleme

Biyopsi veya otopsi materyalinin mikroskopik incelemesi yoluyla hiflerin dokuya yayılımını göstermek, kanıtlanmış İFE tanısı koydurmaktadır. Ancak, mikroskopinin İA için duyarlılığı düşüktür.

2.10.3.1. Native preparat hazırlanması

Tüm mevcut solunum örnekleri (BAL, trakeal aspirasyon veya balgam) üzerinde verimi düşük olmasına rağmen mikroskopik inceleme yapılması önerilmektedir(84). Nativ preparatlar direkt olarak veya örneğin %10'luk potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi içinde bekletilmesiyle hazırlanmaktadır. Steril kabul edilen BAL ve biyopsilerin histolojik kesitlerinde fungal elemanların tanımlanması İFE tanısını koydurmaktadır(85). *Aspergillus* enfeksiyonunu düşündüren morfolojik özellikler, nativ incelmede görülen hiflerin 45 derece açıyla dikotomik dallara sahip, septalı hifler olmasıdır(86). Ancak, sadece bu bulgular ile *Aspergillus*

türlerini diğer küflerden kesin olarak ayırmak mümkün olmamaktadır(85). Direkt incelmede en kesin ayırım *Aspergillus* ile *Mucorales* arasında yapılabilir. Klinik örneğin mikroskopisinde genellikle dikotom ve septatlı hifler görülürse aspergilloz, septasız ve 90 derece açılı dallanan hifler görülürse *Mucorales* lehine kabul edilir. Septalı ve septasız hifler arasındaki ayırım *Mucorales* açısından antifungal tedavi seçimini etkilemesi sebebiyle önemlidir(84).

2.10.3.2. Laktofenol pamuk mavisi ile preparat hazırlanması

Laktofenol pamuk mavisi mantarları boyamak ve incelemek için en yaygın kullanılan yöntemdir ve hazırlanması kolaydır. Laktik asit, fenol ve pamuk mavisi olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır. Laktik asit mantar yapılarını korurken, fenol canlı organizmaları öldürmektedir. Pamuk mavisi ise hücre duvarındaki kitini boyamaktadır(87). Kolonilerin mikroskopik incelemesinde en yaygın olarak laktofenol pamuk mavisi kullanılır.

2.10.3.3. Floresan boyalarla boyama

Floresan mikroskopta kullanılan Calcofluor white™, Uvitex 2B, Blancophor™ gibi boyalar, hücre duvarıyla etkileşerek kullanılan floresan boyalar arasında yer almaktadır. *Aspergillus*'a özgü değildir ancak yüksek duyarlılık ve mantar sınıfı hakkında mikromorfolojik bilgi sağlayabilir. Dondurulmuş kesitlere, parafine gömülmüş dokuya uygulanabilir(88).

2.10.4. Histopatolojik inceleme

En yaygın histopatolojik inceleme türü, hematoksilin ve eozinle (H&E) boyanmış biyopsi dokusu kesitlerinin kullanılmasıdır. Fakat H&E fungal hücre duvarını boyayabilmesine rağmen, arka plan dokusunu da boyayarak belirgin bir boyama farkı oluşturmadığından fungal yapıları gözden kaçırmak kolaydır(89). Bu nedenle Gomori metenamin gümüşü (GMS) ve/veya periyodik asit-Schiff (PAS) olmak üzere ek boyaların kullanımı, fungal enfeksiyonu dışlamak ve morfolojik özelliklerini belirlemek için kullanılabilir. PAS dokulardaki glikojeni tespit eder ve mantar duvarları büyük miktarda glikojen içermektedir. Hem GMS hem de PAS boyaları fungal hücre duvarını vurgulayarak kolaylıkla izlenmelerini sağlar.

2.10.4. Kültür

Kültür yönteminin en önemli avantajı, saf olarak elde edilen koloninin kesin olarak tanımlanmasına ve gerekli durumlarda antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Mikroskopik bulguların kültürde etkenin izole edilmesiyle doğrulanması gerekmektedir. *Aspergillus* kültürü için yaygın olarak kullanılan katı besiyerleri Sabouraud dekstroz agar (SDA), beyin kalp infüzyon agar (BHIA) ve patates dekstroz agar'dır (PDA) (84). Havada çok fazla konidyum bulunduğundan kültürdeki üremeler kontaminasyon riski de göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir(90). Steril olmayan örneklerden *Aspergillus* türlerinin üretilebilmesi için besiyerine kloramfenikol ve sikloheksimid eklenmesi önerilmektedir. Kloramfenikol bakterilerin üremesini engellerken, sikloheksimid de patojenik olmayan çevresel küflerin üremesini engellemektedir. Ancak,

sikloheksimid bazı *Aspergillus* türlerini inhibe eder. Bu nedenle örneklerin sikloheksimidsiz besiyerine de ekilmesi önerilmektedir (91).

Konidumlar inhalasyon yoluyla bulaştığından balgam, BAL, endotrekeal aspirat (ETA) gibi solunum yolu örnekleri tanı için kullanılmaktadır(92). Solunum yolu örneklerinden yapılan kültürlerin duyarlılıkları, bronkoskopi ile elde edilen kültür sonuçlarına göre daha düşüktür. BAL kültürlerinin duyarlılığının %30-60 arasında değiştiği bildirilmiştir(93). Kültür duyarlılığını artırmak için 2 mL'nin üzerindeki hacimlerde gönderilen steril vücut sıvıları ve BAL örneklerinin santrifüj edilerek, dipteki çökelekten ekim yapılması önerilmektedir(94). Şiddetli ve invazif enfeksiyonu olan hastalarda mantar kültürünün duyarlılığı artmaktadır(95). Kültür 37°C'de 72 saat inkübe edilmelidir(88). Kültürün 30°C yerine 35-37°C'de inkübasyonu, bazı *Aspergillus* türlerinin büyümesini hızlandırabilmektedir(96).

Aspergillus'lar besiyeri yüzeyinde, 36-90 saat içinde kadifemsi veya pamuğumsu özellikte beyaz, sarı, sarı-yeşil, kahverengi veya siyah renkte koloniler oluşturmaktadır(97). Koloninin mikroskopik olarak incelenmesiyle tür tayini yapılmaktadır. Eğer kültürdeki koloninin mikroskopik olarak tür tanımlaması yapılamıyorsa kütle spektrometresi tanımlaması (MALDI-TOF) veya genomik dizileme kullanılmaktadır(98, 99).

2.10.5. Serolojik yöntemler

Mikroskopi ve kültürün İA tanısı için altın standart yöntem olmaya devam etmesine rağmen duyarlılık seviyesi düşük olması ve invazif girişim gerektirmesi

nedeniyle kullanımı sınırlı olmaktadır. Bu nedenle, PCR ile DNA'nın tespiti veya kan veya solunum örneklerinde mantar biyobelirteçlerinin ölçülmesi gibi kültür bazlı olmayan yöntemler ön plana çıkmaktadır. GM BDG testleri, EORTC-MSG tarafından İFE tanımlarına mikrobiyolojik kriterler olarak dahil edilmiştir(79). Ancak, bu testlerin çeşitli popülasyonlarda ve klinik ortamlarda İA tanısında rolü ve yorumu, sınırlı duyarlılıkları ve özgüllükleri nedeniyle hala tartışılmaktadır(100).

2.10.5.1. Galaktomannan Antijen Testi

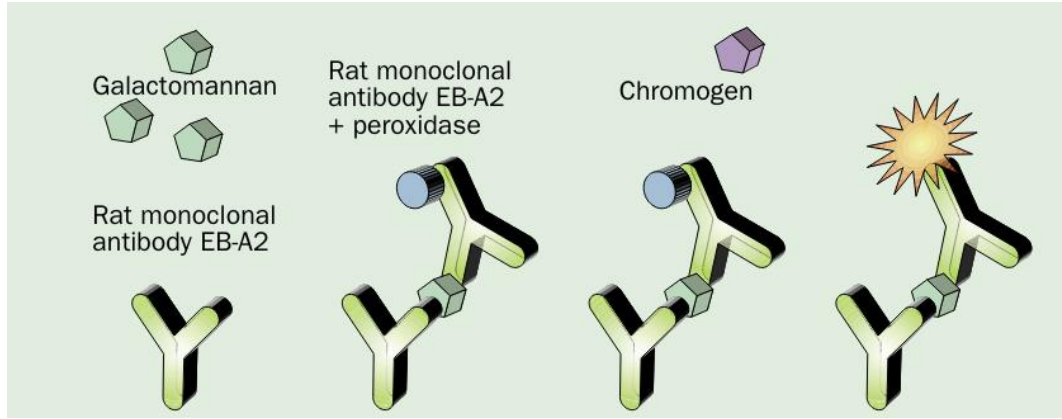
GM, mantar tarafından salgılanan *Aspergillus* hücre duvarlarında bulunan ısıya dayanıklı bir polisakkarit antijenidir. İA erken evrelerinde bile büyüyen hifler ve çimlenen konidyumlar tarafından kan dolaşımına ve diğer vücut sıvılarına salınabilmektedir. Monoklonal anti-galaktomannan antikor EB-A2, *Aspergillus* GM (1→5)-β-D galaktofuranozid yan zincirini tanır. Bir GM molekülünde birçok (1→5)-β-D galaktofuranozid epitopu olmasından yola çıkarak, 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. EB-A2'nin bağlanması dört veya daha fazla galaktofuranozid epitopu gerektirir. Bu nedenle GM analizlerinin analitik duyarlılığı azalabilmektedir(101).

GM ELISA testi plazma/serum, BOS ve BAL sıvısında uygulanabilmektedir. Analiz edilen örneğin ölçülen OD (optik dansite) değeri üretici tarafından sağlanan bir eşik kontrol (cut-off) OD değerine bölünerek bir oran

hesaplanır. Bu orana OD indeksi adı verilir. GM testi için bu indeks yanlış pozitif sonuçları en aza indirmek için başlarda 1.0-1.5 olarak belirlenmiştir(102). 2008 EORTC/MSG tanımlarında 0,5'e düşürülmüştür(78). Düşürülen indeks yetişkin hematoloji hastaları için testin genel performansını iyileştirmiştir(103). Bununla birlikte, 2020 EORTC/MSG tanımlarında, klinik tanıyı kesinleştirmek amacıyla indeks tekrar yükseltilmiştir (Tablo 3).

İA tanısında GM testinin rolünü değerlendiren ilk çalışmalar, esas olarak hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi gören nötroopenik hastalarda veya antifungal profilaksi almayan HSCT alıcılarında yürütülmüştür. Bu çalışmalarda, %67 ila %100 arasında değişen duyarlılık oranları ve %86 ila %99 arasında değişen özgüllük oranları bulunmuştur (104).

Platelia® *Aspergillus* ELISA testi (Bio- Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) yüksek özgüllük göstermesine rağmen, uygulama zorlukları nedeniyle başka yöntemlere gerek duyulmaktadır. ELISA için en büyük zorluk, yanlış sinyallere neden olabilen bağlanmamış ürünleri ortadan kaldırmak için zaman alıcı ve personel bağımlı yıkama basamakları gerekliliğidir. Bu durum yanlış sonuçlara da neden olabileceğinden, GM tespiti için daha stabil ve otomatize bir sisteme gerek duyulmaktadır. Son yıllarda CLIA temelli çalışan otomatize sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerin ELISA yönteminden farkı, kolorimetrik bir substrat yerine bir kemilüminesan bir substratın (luminol) kullanılmasıdır(105). Bu otomatize sistemler tek örnek çalışabilmeleri ve kısa sürede sonuç vermeleriyle avantaj oluşturmaktadır.



Şekil 5. ELISA yöntemiyle GM antijen aranması(101)

2.10.5.2. (1,3)- β -D-glukan (BDG) Antijen Testi

(1,3)- β -D-glukan, çeşitli mantarların hücre duvarında bulunan bir polisakkarittir. Bu antijenik belirtecin tespiti İA, invazif kandidoz ve ayrıca *P. jirovecii* pnömonisi tanısında kullanılabilmektedir(106). (1,3)- β -D-glukan Amerikan at nalı yengecinin amebositlerindeki koagülasyon kaskadını Faktör G olarak adlandırılan proenzim yoluyla tetiklemektedir. Bunun sonucunda açığa çıkan kromojenik pNA'nın kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanan limulus lizat testi ile BDG miktarı ölçülebilmektedir(107).

2020 yılında yayınlanan EORTC/MSG revizyonu ile İA'nın aksine invazif kandidoz ve pnömosistoz için ardışık iki örneğin pozitif olması mikolojik tanı kriterlerinde yer almaktadır(79). Hematolojik malignitesi bulunan İA'lu hastalar için yapılan bireysel çalışmalarda testin duyarlılığı %55 ila %95, özgüllüğü %77 ila %96 arasında değişmektedir. (1,3)- β -D-glukan testi genellikle kültürle birlikte değerlendirildiğinde daha faydalı olmaktadır. (108).

2.10.6. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler immün sistem fonksiyonundan bağımsız olarak fungal DNA'yı saptayarak antikor yanıtı oluşmadan önce erken tanıda kullanılabilir.

2008 EORTC/MSG tanımlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) henüz bir standardı olmadığından mikolojik tanı kriterlerine dahil edilmemiştir. 2020 tanımlarında ise kapsamlı standardizasyon çabalarının ardından, serum, plazma veya BAL kullanılarak yapılan *Aspergillus* PCR testleri mikolojik tanı kriterlerine dahil edilmiştir. PCR ile ilgili 25 çalışmanın incelendiği bir meta-analizde invazif aspergillozu tespit etmek için testin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %84,0 ve %76,0 bulunmuştur. En az iki PCR sonucu aspergilloz açısından tanısal kabul edildiğinde ise, duyarlılık %64'e düşerken, özgüllük %95'e yükselmiştir(109).

Başka bir çalışmada PCR duyarlılığının rutin kan örneklerinde tek başına yapıldığında >%90, BAL örnekleriyle birlikte değerlendirildiğinde ise %96'ya ulaşabildiği bulunmuştur(110).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 31.07.2023 tarihli toplantısında 658 karar numarası ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumunun 22.08.2023 tarih E-68869993-000-1199247 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması 'İnvazif mikozların tanısında serolojik tanı yöntemlerinin yeri' başlıklı ve TTU-2023-8627 kodlu proje olarak Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri(BAP) tarafından tıpta uzmanlık tez projesi olarak 123.840 TL bütçe ile desteklenmiştir.

3.1. Hasta seçimi

Çalışmaya 1 Ekim 2023-1 Haziran 2024 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi hematoloji servisinde yatan 18 yaşından büyük hematopoetik sistem kanserli invazif mikoz şüphesi olan 17 hasta, hematopoetik sistem kanserli invazif mikoz şüphesi olmayan 49 hasta ve 27 sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 93 kişi dahil edilmiştir.

Hastanemizin hematoloji servisinde yatan invazif mikoz şüphesi olan hastalardan alınan serum örneklerinde rutin olarak Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan analizi yapılmaktadır. Bu çalışmada bu rutin sürece ek olarak, Platelia™ *Aspergillus* Ag ELISA Testi ve FACIS-1 cihazı kullanılarak yapılan kemilüminesans (CLIA) metoduna dayalı galaktomannan ve (1-3)- β -D-glukan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait yaş, cinsiyet, altta yatan hastalıklar, kök hücre nakli varlığı, GVHD gelişip gelişmediği, immünsupresif ilaç kullanımı, profilaktik küf etkili antifungal alıp almadığı demografik veri olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Örneklerin Toplanması

93 hastaya ait 93 kan örneğinin gluklan içermeyen tüpler içerisinde mikoloji laboratuvarına ulaştırılması sağlanmıştır. Kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Gluklan içermeyen konik tabanlı santrifüj tüplerine alınan serum örnekleri GM ve BDG çalışılmak üzere - 80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Çalışmada kullanılan cihaz ve sarf malzemeler

3.3.1. Kullanılan cihazlar

- -80°C’lik derin dondurucu (New Brunswick Scientific, ABD)
- +4°C’lik soğutucu (Arçelik, Türkiye)
- Full-Automatic Chemiluminescence Immunoassay System (FACIS-I) (Genobio,Çin)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter, ABD)
- Vorteks (Boeco, Almanya)
- Isı bloğu (Boeco, Almanya)

- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Mikropipet seti (Isotherm, Türkiye)
- Mikroplak okuyucu (Das, İtalya)

3.3.2. Kullanılan sarf malzemeler

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

3.4. Platelia™ *Aspergillus* Ag ELISA Kiti

3.4.1. Test prensibi

Platelia™ *Aspergillus* Ag testi serum ve BAL sıvısı örneklerinde *Aspergillus* galaktomannan antijeni aranmasında kullanılan sandviç ELISA yöntemidir. Mikroplak kuyucukları GM yapısındaki $\beta(1,5)$ galaktofuranozu tanıyan sıçan monoklonal (IgM) EB-A2 antikorları ile kaplıdır. Monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara eş zamanlı konjugat ve serum örneği konulur. Konjugat,

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

3.4.2. Testin uygulanışı

1. Kontrol ve serum/BAL sıvısı örneklerinden 300'er µL alınarak 1.5 mL'lik ependorflara konulmuştur.
2. Üzerlerine 100 µL sample treatment solüsyon eklenmiştir.
3. Vorteks yapılarak 120°C'de 6 dakika ısıtıcı bloğa konulmuştur.
4. Isıtıcı bloktan çıkartılan ependorflar 10,000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ELISA basamağında kullanılmak üzere ayrılmıştır.
5. Yıkama solüsyonu hazırlanmıştır.
6. Üretici firma önerileri doğrultusunda bir kuyucuk negatif kontrol, iki kuyucuk cut-off kontrol ve bir kuyucuk pozitif kontrol olarak belirlenmiştir.

7. 50 µL konjugat kuyucuklara dağıtılmıştır. Kontrol ve serum/BAL sıvısı süpernatantlarından 50 µL alınarak konjugat içeren kuyucuklara eklenmiştir.
8. Mikroplak yapışkan film ile kaplanarak 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile beş kez yıkama yapılmıştır.
10. Hızlı bir şekilde her kuyucuğa 200 µL kromojen TMB solüsyonu eklenmiştir.
11. Mikroplak karanlık bir alana konularak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
12. Süre sonunda her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklenmiştir.
13. Mikroplak optik okuyucuda 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboyunda okutulmuştur.

3.4.3. Sonuçların yorumlanması

1. Ortalama cut-off kontrol değeri, cut-off kontrol serum optik dansiteleri toplamının ikiye bölünmesi ile bulunmuştur.
2. Testin geçerli sayılabilmesi için şu kriterler kontrol edilmiştir. $0.3 \leq \text{Her bir cut-off kontrol serum OD} \leq 0.8$

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

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

3. Her bir serum için indeks hesaplanmıştır:

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

İndeks ≥ 0.5 olması pozitif sonuç kabul edilmiştir.

İndeks ≤ 0.5 olması negatif sonuç kabul edilmiştir.

3.5. Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan kiti

3.5.1. Test prensibi

Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi serum ve BAL sıvısı örneklerinde *Aspergillus* galaktomannan antijeni aranmasında kullanılan sandviç ELISA yöntemidir. Galaktomannan antikorları ile kaplı kuyucuklara serum/BAL sıvısı örnekleri konularak mikropalak inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara konjugat eklenir. Konjugat, peroksidaz bağlı GM antikorlarıdır. Galaktomannan antijeni varlığında galaktomannan antikoru-galaktomannan antijeni-peroksidaz bağlı galaktomannan antikoru birleşerek kompleks oluşturur. Yıkama basamağı ile bağlı olmayan moleküller uzaklaştırılır. TMB solüsyonu eklenmesiyle Ab-Ag-Ab kompleksi varlığında enzimatik reaksiyon gerçekleşerek mavi renk oluşumu gözlenir. Sülfirik asit eklenerek enzimatik reaksiyon

durdurulur. Sülfirik asit ilavesi ile kuyucuklardaki mavi renk sarı renge dönüşür. Kuyucuk absorbansları 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboylarında spektrofotometrede ölçülür.

3.5.3. Testin uygulanışı

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

8. Mikroplak yapışkan film ile kaplanarak 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
9. Süre sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile bir kez yıkama yapılmıştır.
10. Her kuyucuğa 100 µL konjugat eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
11. Süre sonunda kuyucuk içerikleri aspire edilerek yıkama solüsyonu ile üç kez yıkama yapılmıştır.
12. Her kuyucuğa 100 µL TMB solüsyonu eklenmiştir.
13. Mikroplak karanlık bir alanda 37°C’de 25 dakika inkübe edilmiştir.
14. Süre sonunda her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenmiştir.
15. Mikroplak optik okuyucuda 450 nm (referans filtre 620/630 nm) dalgaboyunda okutulmuştur.

3.5.4. Sonuçların yorumlanması

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

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

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

3. Her bir serum için indeks hesaplanmıştır.

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

İndeks ≥ 0.5 olması pozitif sonuç kabul edilmiştir.

İndeks ≤ 0.5 olması negatif sonuç kabul edilmiştir.

3.6. Fungus (1-3)- β -D-Glukan Tespit Kiti (CLIA)

3.6.1. Test prensibi

Fungus (1-3)- β -D-glukan Kiti serum ve BAL sıvısındaki (1-3)- β -D-glukanın kantitatif tespiti için kullanılmaktadır.

Çalışma prensibinin ELISA ile temel farkı kolorimetrik bir substrat yerine kemilüminesan bir substratın (luminol) kullanılmasıdır. HRP (horseradish peroxidase) işaretli anti (1-3)- β -D-glukan antikoru, numune ve (1-3)- β -D-glukan antikoruyla kaplı manyetik boncuk, reaksiyon kabında karıştırılır ve inkübe edilir. Serumda antijen varlığında HRP etiketli anti (1-3)- β -D-glukan antikor – antijen – antikor kaplı manyetik boncuk bir kompleks oluşturur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan çökelti bir manyetik alanın etkisi ile tekrar tekrar yıkanır. Kromojen solüsyonunu eklenir ve kemilüminesans reaksiyonundan sonra aydınlık şiddeti değeri okunur. Işık sinyalinin yoğunluğu, BDG içeriği ile pozitif olarak ilişkilidir. Test edilecek numunedeki BDG konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplanır ve

kantitatif tespiti gerçekleştirilir. Tüm bu işlemler tam otomatize kapalı bir sistemde gerçekleşmektedir.

3.6.2. Testin uygulanışı

Bu test serum ve BAL numunelerinde kullanılmaktadır. Numuneler 2-8 °C'de saklanmalıdır. Örnekler 24 saat içinde test edilemeyecekse - 20 °C'nin altında saklanmalıdır. Büyük ölçüde hemolizli, ikterik veya lipemik numuneler reddedilmelidir.

Optik sinyalin doğru ölçülebilmesi için cihazın bulunduğu oda sıcaklığının $25\pm5^{\circ}\text{C}$ olmasına dikkat edilmiştir. Kullanılacak kit çalışmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Kontrol solüsyonları üreticinin belirlediği şekilde hazırlanıp 60 saniye vortekslenmiştir. Numunenin konacağı bölümün filmi açıldıktan sonra test stribi FACIS'e yerleştirilmiştir. Strip cihaza yerleştirildikten sonra 300 µL numune/kontrol eklenip pipetlenmiştir ve çalışma başlatılmıştır.

Sistem tarafından kaydedilen kalibrasyon verileriyle bir çalışma eğrisi elde edilmiştir. Sistem yazılımı, ağırlıklı dört parametrelili bir yerleştirme yöntemini kullanarak her örneğin antijen konsantrasyonunu otomatik olarak hesaplamıştır. Yaklaşık 1 saat içinde ng/mL biriminde bir sonuç elde edilmiştir.

3.6.3. Sorunların Yorumlanması

Test sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak için her bir kit partisi için en az iki kez kontrol çalışılmıştır ve sonuç belirtilen kontrol aralıkları içinde bulunmuştur.

Pozitif kontrolün referans aralığı 8-12 ng/mL'dir.

Negatif kontrolün referans aralığı 0-0.06 ng/mL'dir.

BDG konsantrasyonunun ≥ 0.1 ng/mL olması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

BDG konsantrasyonunun < 0.06 ng/mL olması negatif sonuç olarak kabul edilmiştir.

BDG konsantrasyonunun 0,06-0,1 ng/mL arasında olması ise şüpheli sonuç olarak kabul edilmiştir.

3.7. *Aspergillus* Galactomannan Detection Kit (CLIA)

3.7.1. Test prensibi

Aspergillus Galactomannan Detection Kit (CLIA), insan serumu ve bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında *Aspergillus* galaktomannan antijeninin kantitatif tespiti için kullanılmaktadır.

Çalışma prensibinin ELISA ile temel farkı kolorimetrik bir substrat yerine kemilüminesan bir substratın (luminol) kullanılmasıdır. HRP işaretli anti-*Aspergillus* GM antikoru, numune ve *Aspergillus* GM antikoruyla kaplı manyetik boncuk reaksiyon kabında karıştırılır ve inkübe edilir. Serumda antijen varlığında HRP etiketli anti-*Aspergillus* galaktomannan antikor – antijen – antikor kaplı manyetik boncuk bir kompleks oluşturur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oluşan çökelti bir manyetik alanın etkisi ile tekrar tekrar yıkanır. Kromojen solüsyonunu

eklenir ve kemilüminesans reaksiyonundan sonra aydınlık şiddetinin değeri okunur. Işık sinyalinin yoğunluğu, GM içeriği ile pozitif olarak ilişkilidir. Test edilecek numunedeki GM konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplanır ve kantitatif tespiti gerçekleştirilir. Tüm bu işlemler tam otomatize kapalı bir sistemde gerçekleşmektedir.

3.7.2. Testin uygulanışı

Bu test serum ve BAL numunelerinde kullanılmaktadır. Numuneler 2-8°C'de saklanmalıdır. Örnekler 24 saat içinde test edilemeyecekse - 20 °C'nin altında saklanmalıdır. Büyük ölçüde hemolizli, ikterik veya lipemik numuneler reddedilmelidir.

Optik sinyalin doğru ölçülebilmesi için cihazın bulunduğu oda sıcaklığının 25±5°C olmasına dikkat edilmiştir. Kullanılacak kit çalışmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Kontrol solüsyonları üreticinin belirlediği şekilde hazırlanıp 60 saniye vortekslenmiştir. Numunenin konacağı bölümün filmi açıldıktan sonra test stribi FACIS'e yerleştirilmiştir. Strip cihaza yerleştirildikten sonra 300 µL numune/kontrol eklenip pipetlenmiştir ve çalışma başlatılmıştır.

Sistem tarafından kaydedilen kalibrasyon verileriyle bir çalışma eğrisi elde edilmiştir. Sistem yazılımı, ağırlıklı dört parametrelili bir yerleştirme yöntemini kullanarak her örneğin antijen konsantrasyonunu otomatik olarak hesaplamıştır. Yaklaşık 1 saat içinde ng/mL biriminde bir sonuç elde edilmiştir.

3.7.3. Sonuçların yorumlanması

Test sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak için her bir kit partisi için en az iki kez kontrol çalışılmıştır ve sonuç belirtilen kontrol aralıkları içinde bulunmuştur.

Pozitif kontrolün referans aralığı 8-12 $\mu\text{g/L}$ 'dir;

Negatif kontrolün referans aralığı 0-0.25 $\mu\text{g/L}$ 'dir;

GM konsantrasyonunun $\geq 0,5 \mu\text{g/L}$ olması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

GM konsantrasyonunun $< 0.25 \mu\text{g/L}$ olması negatif sonuç olarak kabul edilmiştir.

GM konsantrasyonunun 0,25-0,5 $\mu\text{g/L}$ arasında olması ise şüpheli sonuç olarak kabul edilmiştir.

3.8. İstatiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Windows için versiyon 25.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler kısmında kategorik değişkenler sayı ve yüzde verilerek, sürekli değişkenler ise ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca (en küçük-en bk değer) ile sunulmuştur. Galaktomannan ve (1-3)- β -D-Glukan testleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer (PPD, NPD) hesaplanmıştır. Testler arası uyum için ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi yapılarak eğri altında kalan alan (AUC)

hesaplanmıştır. Eğri altında kalan alan 0.90-1.00 mükemmel, 0.80-0.90 iyi, 0.70-0.80 orta, 0.60-0.70 zayıf, 0.50-0.60 başarısız bir test olarak değeriendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmamıza 1 Ekim 2023- 1 Haziran 2024 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji servisinde yatan ve 18 yaşından büyük hematopoetik sistem kanserli invazif mikoz şüphesi olan ancak kültür negatif 17 hasta, hematopoetik sistem kanserli İM şüphesi olmayan 49 hasta ve 27 sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 93 kişi dahil edilmiştir. Bu hastalara ait toplam 93 serum çalışmaya alınmıştır. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile GM pozitif sonuç alınan 17 hasta (%18,28) EORTC/MSG kriterlerine göre ‘yüksek olasılıklı’ invazif mikoz olarak sınıflandırılmıştır. Hematolojik malignite nedeniyle hematoloji servisinde yatıp testi negatif sonuçlanan 49 kişi (%52,69) hasta kontrol grubunu oluşturmuştur. Altta yatan herhangi bir malignitesi olmayan 27 kişi (%29,03) ise sağlıklı kontrol grubunu oluşturmuştur.

4.1. Demografik Veriler

EORTC/MSG kriterlerine göre yüksek olasılıklı İM olarak tanımlanan grup 7 (%41,18) kadın, 10 (%58,82) erkek hastadan oluşmaktadır. Bu grupta yer alan hastaların yaş ortalamaları $50,00 \pm 16,82$ ’dir. İM olmayan hasta kontrol grubu 23 (%46,9) kadın, 26 (%53,1) erkek hastadan oluşmaktadır. Bu grubun yaş ortalaması ise $51 \pm 13,4$ ’tür. Sağlıklı kontrol grubunda ise 15 (%55,6) kadın, 12 (%44,4) erkek hasta bulunurken bu grupta yer alan hastaların yaş ortalamaları $50,44 \pm 17,04$ ’tür. Hasta gruplarına ait yaş ve cinsiyet dağılımı tablo ’da gösterilmiştir.

Tablo 4. Hasta gruplarına ait yaş ortalaması

		İM olan hasta grubu n (%) n=17	İM olmayan hasta kontrol grubu n (%) n=49	Sağlıklı kontrol grubu n (%) n=27
Yaş	(x±SD)	50±16,82	51±13,4	50,44±17,04
	Ortanca	53 (26-78)	53 (22-72)	50(18-77)

Tablo 5. Hasta gruplarına ait cinsiyet dağılımı

		İM olan hasta grubu n (%) n=17	İM olmayan hasta kontrol grubu n (%) n=49	Sağlıklı kontrol grubu n (%) n=27	p değeri
Cinsiyet	Kadın	7 (41,18)	23 (46,9)	15 (55,6)	>0,05
	Erkek	10 (58,82)	26 (53,1)	12 (44,4)	

Yüksek olasılıklı İM olan hasta grubunda en sık altta yatan hastalığın AML (%52,94) ikinci sırada lenfoma (%23,53), üçüncü sırada ise ALL (%17,65) olduğu görülmüştür. İnvazif mikoz olmayan hasta kontrol grubuna bakıldığında ise en sık altta yatan hastalık AML (%46,94) ikinci sırada ALL (%16,33), üçüncü sırada ise lenfoma (%14,29) olduğu görülmüştür. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar tablo 6’da gösterilmiştir. Hasta gruplarına ait risk faktörleri ise tablo 7 ve tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 6. Hasta gruplarına ait altta yatan hastalıklar

Altta yatan hastalık	İM olan hasta grubu n (%) n=17	İM olmayan hasta kontrol grubu n (%) n=49	p değeri
ALL	3 (17,65)	8 (16,33)	>0,05
AML	9 (52,94)	23 (46,94)	
KLL	1 (5,88)	2 (4,08)	
KML	0 (0)	2 (4,08)	
Multiple Myelom	0 (0)	6 (12,24)	
Lenfoma	4 (23,53)	7 (14,29)	
Bifenotipik akut lösemi	0(0)	1 (2,04)	

Tablo 7. Yüksek olası İM tanılı hasta grubuna ait risk faktörleri

	KESİN TANI	HSTC	GVHD	STERÖİD	T HÜCRE BASKILAYICI İLAÇ	KÜF ETKİLİ AF	NÖTROPENİ	ÖLÜM
Hasta 1	AML	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 2	LENFOMA	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 3	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR
Hasta 4	AML	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 5	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	YOK
Hasta 6	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 7	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR
Hasta 8	ALL	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 9	LENFOMA	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR
Hasta 10	LENFOMA	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 11	KLL	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 12	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 13	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 14	ALL	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 15	LENFOMA	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 16	ALL	ALLOJENİK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK
Hasta 17	AML	ALLOJENİK	VAR	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR

Tablo 8. İnvazif mikoz olmayan hasta kontrol grubuna ait risk faktörleri

	KESİN TANI	HSTC	GVHD	STEROİD	T HÜC BASKILAYICI İLAÇ	KÜF ETKİLİ AF	NÖTROPENİ	ÖLÜM
Hasta 1	MM	ALLOJENİK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK
Hasta 2	AML	VAR	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK
Hasta 3	LENFOMA	OTOLOG	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 4	LENFOMA	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	VAR
Hasta 5	AML	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 6	AML	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 7	LENFOMA	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK
Hasta 8	MM	ALLOJENİK	YOK	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 9	KML	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR
Hasta 10	ALL	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK
Hasta 11	ALL	VAR	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 12	AML	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR	YOK
Hasta 13	ALL	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR	VAR
Hasta 14	ALL	ALLOJENİK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK
Hasta 15	AML	ALLOJENİK	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 16	AML	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	VAR	YOK
Hasta 17	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 18	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 19	AML	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK	VAR
Hasta 20	ALL	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 21	KML	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 22	LENFOMA	ALLOJENİK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 23	KLL	OTOLOG	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 24	AML	ALLOJENİK	YOK	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK
Hasta 25	AML	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 26	MM	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK
Hasta 27	AML	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 28	LENFOMA	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 29	MM	OTOLOG	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK
Hasta 30	ALL	ALLOJENİK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
Hasta 31	KLL	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK	VAR	VAR
Hasta 32	AML	ALLOJENİK	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR	YOK
Hasta 33	ALL	ALLOJENİK	VAR	YOK	VAR	YOK	VAR	YOK
Hasta 34	ALL	ALLOJENİK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR	YOK
Hasta 35	MM	OTOLOG	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 36	AML	ALLOJENİK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR
Hasta 37	LENFOMA	OTOLOG	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR
Hasta 38	LENFOMA	ALLOJENİK	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 39	MM	ALLOJENİK	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 40	BAL	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK
Hasta 41	AML	ALLOJENİK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 42	AML	ALLOJENİK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 43	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 44	AML	ALLOJENİK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 45	AML	ALLOJENİK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 46	AML	ALLOJENİK	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 47	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR
Hasta 48	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
Hasta 49	AML	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK

4.1. Dinamiker *Aspergillus* Galaktomannan Testi

Çalışmamızda toplamda 93 hasta serumu test edilmiştir. Dinamiker *Aspergillus* GM testinin Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif bulunan 17

örneğin 17 tanesinde pozitiflik yakaladığı tespit edilmiştir. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testi toplamda 19 örnekte pozitiflik saptamıştır.

Tablo 9. Platelia™ *Aspergillus* Ag ve Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testlerinin karşılaştırılması

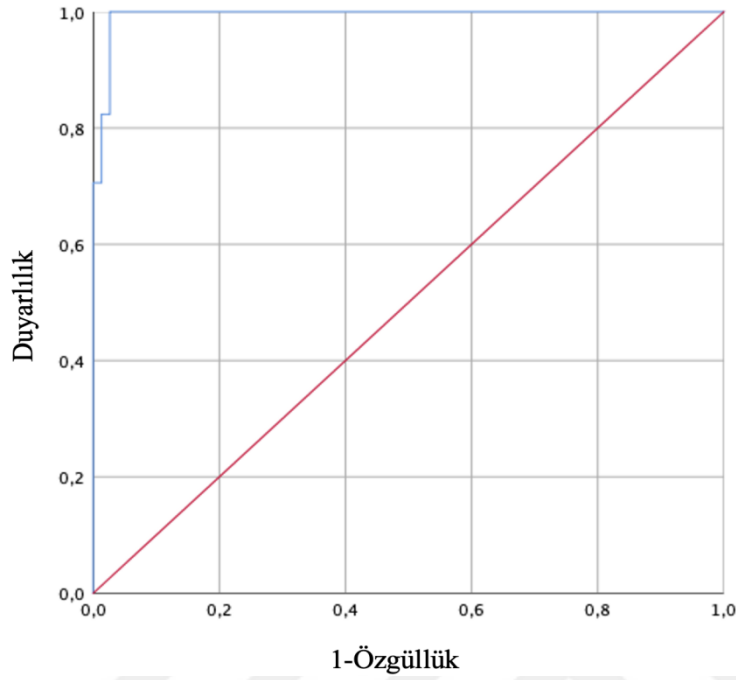
		PLATELIA GM		Toplam
		Pozitif	Negatif	
DYNAMİKER GM	Pozitif	17	2	19
	Negatif	0	74	74
Toplam		17	76	93

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* GM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,4, pozitif prediktif değeri (PPD) %89,5, negatif prediktif değeri (NPD) %100 olarak bulunmuştur.

Tablo 10. Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	<i>p</i> değeri
Dynamiker <i>Aspergillus</i> galaktomannan testi	%100	%97,4	%89,5	%100	<0,001

Platelia GM testi altın standart alınarak Dynamiker GM testi için ROC analizi yapılmıştır. ROC eğrisinin AUC değerlerine göre Dynamiker GM testi %99,4 oranında başarılı bulunmuştur.



Şekil 6. Dynamiker GM testinin Platelia GM testi altın standart alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi

4.2. Kemilüminesans İmmünoanaliz Temelli *Aspergillus* Galaktomannan Testi

Aspergillus Galactomannan Detection Kit (CLIA GM) ile toplamda 93 hasta serumu test edilmiştir. CLIA GM testinin Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif bulunan 17 örneğin 12 tanesinde pozitiflik yakaladığı tespit edilmiştir. CLIA GM testi toplamda 18 örnekte pozitiflik saptamıştır.

Tablo 11. Platelia™ *Aspergillus* Ag ve CLIA GM testlerinin karşılaştırılması

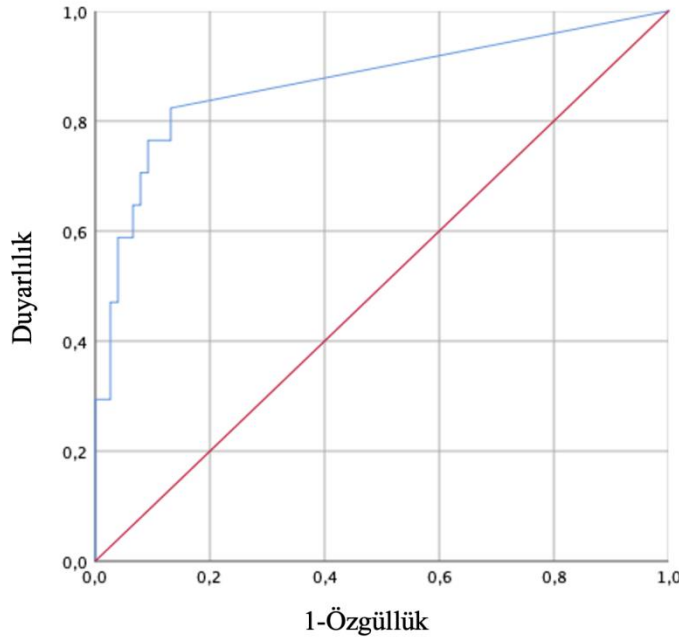
		PLATELIA GM		Toplam
		Pozitif	Negatif	
CLIA GM	Pozitif	12	6	18
	Negatif	5	70	75
Toplam		17	76	93

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre CLIA GM testinin duyarlılığı %70,6, özgüllüğü %92,1, pozitif prediktif değeri (PPD) %66,7, negatif prediktif değeri (NPD) %93,3 olarak bulunmuştur.

Tablo 12. CLIA GM testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	<i>p</i> değeri
CLIA GM	%70,6	%92,1	%66,7	%93,3	<0,001

Platelia GM testi referans alınarak CLIA GM testi için ROC analizi yapılmıştır. ROC eğrisinin AUC değerlerine göre CLIA GM testi %86,9 oranında başarılı bulunmuştur.



Şekil 7. CLIA GM testinin Platelia GM testi referans alınarak oluşturulmuş ROC analizi

4.3. Kemilüminesans İmmünoanaliz Temelli Fungus (1-3)- β -D-Glukan Testi (CLIA BDG)

Fungus (1-3)- β -D-Glukan Tespit Kiti (CLIA BDG) ile toplamda 93 hasta serumu test edilmiştir. CLIA BDG testinin Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile pozitif bulunan 17 örneğin 15 tanesinde pozitiflik yakaladığı tespit edilmiştir. CLIA BG testi toplamda 29 örnekte pozitiflik saptamıştır.

Tablo 13. Platelia™ *Aspergillus* Ag ve CLIA BDG testlerinin karşılaştırılması

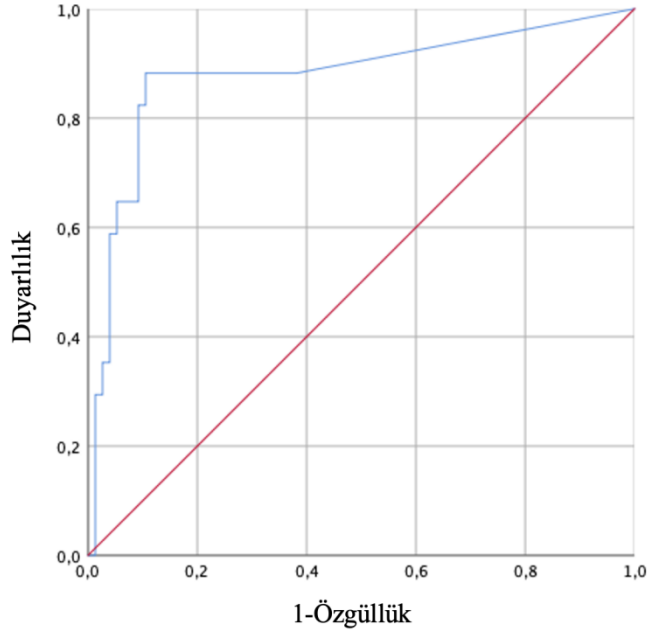
		PLATELIA GM		Toplam
		Pozitif	Negatif	
CLIA BDG	Pozitif	15	14	29
	Negatif	2	62	64
Toplam		17	76	93

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde CLIA BDG testinin duyarlılığı %88,2, özgüllüğü %81,6, pozitif prediktif değeri (PPD) %51,7, negatif prediktif değeri (NPD) %96,9 olarak bulunmuştur.

Tablo 14. CLIA BDG testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

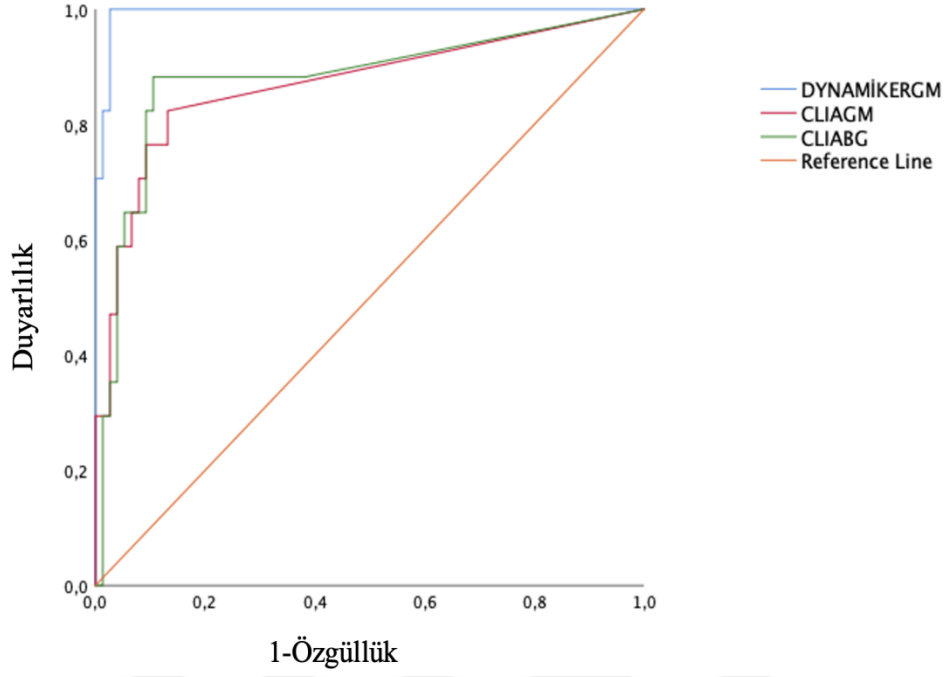
	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	<i>p</i> değeri
CLIA BDG	%88,2	%81,6	%51,7	%96,9	<0,001

Platelia GM testi referans alınarak CLIA BG testi için ROC analizi yapılmıştır. ROC eğrisinin AUC değerlerine göre CLIA BG testi %87,8 oranında başarılı bulunmuştur.



Şekil 8. CLIA BDG testinin Platelia GM testi referans alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi

Üç test için birlikte ROC analizi yapılmıştır. Referans yönteme göre, ROC eğrisinin AUC değerlerine göre DYNAMİKER ELISA (0.994), CLIA BDG (0.878) ve CLIA GM (0.869) olarak başarı sıralaması yapılmıştır.



Şekil 9. Dynamiker GM, CLIA GM ve CLIA BG testinin Platelia GM testi referans alınarak alınarak oluşturulmuş ROC analizi

Tablo 15. ROC Eğrisi Altındaki Alan (Area Under Curve - AUC)

	Alan	Std Hata	Asimptotik Anlamlılık (p)	Asimptotik 95% Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
DYNAMİKER ELISA	0.994	0.005	0.000	0.983	1.000
CLIA GM	0.869	0.058	0.000	0.755	0.983
CLIA BDG	0.878	0.056	0.000	0.768	0.989

5. TARTIŞMA

İnvazif fungal enfeksiyonlar derin dokularda maya veya küf kaynaklı sistemik mantar enfeksiyonlarını kapsamaktadır. Bu enfeksiyonların kesin tanısı için kan veya invazif yöntemlerle alınan doku örnekleri gerekmektedir. Hastaların bazılarında invazif yöntemlerle örnek elde edilmesi zor olduğundan tanıda gecikmeler yaşanabilmektedir. Kültür dışı hızlı tanı testleri, erken tanı konulmasına olanak sağlayarak antifungal tedavinin hızlı bir şekilde başlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle invazif olmayan serolojik tanı testleri ön plana çıkmaktadır(111).

Galaktomannan, İFE tanısında kullanılan, büyüyen hifler ve konidyumlar tarafından salınan, serumda, BAL'da veya BOS'da tespit edilebilen hücre duvarı antijenidir. Galaktomannan antijeni immün yetmezliği olan nötropenik hastalarda ve anjiyo-invazif karakterdeki enfeksiyonlarda daha sık tespit edilmektedir(112).

Platelia *Aspergillus* ELİSA testi (Bio-Rad Laboratories, Redmond, Washington) serumda ve BAL sıvısında *Aspergillus fumigatus* GM antijeninin tespiti için FDA tarafından onaylanmıştır. Yetişkinlerde ve çocuklarda $\geq 0,5$ 'lik bir optik yoğunluk indeksi pozitif kabul edilmiştir(113).

Bağıışıklık sistemi baskılanmış ve nötropenik hastaların dahil edildiği bir metaanalizde GM ELISA'nın OD indeksi 0,5 olarak kabul edildiğinde duyarlılığı %78 (70% ila 85%) ve özgüllüğü %85 (78% ila 91%) olarak bulunmuştur. Optik dansite indeksi 1,0 olarak kabul edildiğinde ise duyarlılık %71 (63% ila 78%) ve özgüllük %90 (86% ila 93%) olarak bulunmuştur(114). Optik dansitenin

artırılmasıyla duyarlılık düşerken özgüllük yükselmiştir. Bizim çalışmamızda Platelia™ *Aspergillus* Ag testi referans test olarak alındığında Dynamiker *Aspergillus* GM testinin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD ve doğruluk sırasıyla %100, %97,4, %89,5, %100, %97,85 olarak bulunmuştur(114). Optik dansite için sınır değeri Platelia™ *Aspergillus* Ag testi için 0,5, Dynamiker *Aspergillus* GM testi için 0,5 olarak alınmıştır.

Çuhadar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Dynamiker *Aspergillus* Galaktomannan ve Dynamiker Fungus (1-3)- β -D-Glukan testlerinin İPA enfeksiyonlarındaki tanısal duyarlılıklarını FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ile karşılaştırılmıştır. Toplam 62 hastanın dahil edildiği çalışmada 32 (%51,6) hasta İPA olarak tanımlanmış, İPA olmayan 30 (%48,4) hasta ise kontrol grubunu oluşturmuştur. İPA tanısı alan 32 hastanın 11 (%34,4) tanesi yüksek olasılıklı İPA, 21'i (%65,6) ise düşük olasılıklı İPA olarak sınıflandırılmıştır. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi referans alındığında Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan testinin duyarlılığı %77,8, özgüllüğü %93,7, PPD'si %63,6, NPD'si %96,7 ve doğruluk %91,7 bulunmuştur($p < 0,001$)(115). Bizim çalışmamızda FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* GM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,4, PPD'si %89,5, NPD'si %100 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızın daha yüksek duyarlılığa sahip olması, yüksek olasılıklı İM grubumuzun hematolojik maligniteli hastalardan oluşmasına bağlanmıştır.

Hematolojik malignitesi olan 82 hasta serumunda (28 yüksek olası, 23 düşük olası İFE, 30 negatif) Dynamiker *Aspergillus* galaktomannan kiti ile yapılan

retrospektif bir çalışmada duyarlılık %79,3, özgüllük %83, PPD %71,9, NPD %88 bulunmuştur(116).

Guo ve arkadaşları tarafından 228 hasta serumu ile yapılan çalışmada EORTC/MSG kriterleri referans alındığında Dynamiker *Aspergillus* GM testinin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD sırasıyla %80,73, %97,48, %96,70, %84,67 olarak hesaplanmıştır. ROC eğrisi altında kalan alan ise 0,901 bulunmuştur(117). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak Dynamiker *Aspergillus* GM testi için AUC değeri 0,994 bulunmuştur.

Hematolojik malignitesi olan pediatrik hastalarda Platelia GM testinin kullanımı için yapılan bir çalışmada OD indeksi $\geq 0,5$ olarak alındığında duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD ve doğruluk sırasıyla %87,1, %86,8, %91,5, %80,5 ve %87,0 bulunmuştur. En yüksek doğruluk oranını tespit etmek için ROC analizi yapılarak ideal OD indeksinin 0,67 olduğu bulunmuştur. Optik dansite indeksi 0,67 olarak alındığında ise duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD ve doğruluk oranları sırasıyla %82,3, %97,4, 98,1, %77,1, %88,0 olarak bildirilmiştir(118).

(1-3)-beta-D-glukan, İFE tanı ve tedavisinin izlenmesi için serum belirteci olarak kullanılabilen bir fungal hücre duvarı bileşenidir (119). Galaktomannan büyük ölçüde *Aspergillus*'a özgü olsa da, BDG panfungal bir biyobelirteçtir. *Aspergillus* enfeksiyonlarını, *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi veya kandidoz gibi diğer fungal enfeksiyonları birbirinden ayırt edemez (120).

Yoğun bakım ünitesinde sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisinin sınıflandırılmasında serum BDG düzeyi yol gösterici olsa da İA tanısı

için belirsizliğini korumaktadır. (1–3)-beta-D-glukan düzeyleri *Candida* türlerinin bağırsaktan fungal translokasyonu sonucu da yükselebilmektedir. Bu nedenle hava yolu invazyonu olan İPA enfeksiyonunu göstermeyebilir(121).

Dichtl ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada EORTC/MSG kriterlerine göre 47 kanıtlanmış, 7 yüksek olası İA tanılı hasta ve 154 sağlıklı kontrol grubu serum örnekleri Platelia™ *Aspergillus* Ag testi ve BDG ELISA testiyle çalışılmıştır. Hasta grubundan farklı zamanlarda 4 kez, kontrol grubundan ise tek seferlik serum örneği alınarak toplamda 380 serum örneği test edilmiştir. Galaktomannan ve BDG testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %48 ve %56 özgüllükleri %99 ve %93 bulunmuştur. Tüm ölçüm sonuçları kullanılarak bir ROC eğrisi çizilmiştir. Eğri altında kalan alan (AUC) GM ELISA için 0,76 ve BDG ELISA testi için 0,81 olarak bulunmuştur. Hasta grubundan farklı zamanlarda alınan örneklerin analizinde BDG testinin GM testine göre daha erken pozitifleştiği bulunmuştur. Enfeksiyonun prognozu açısından tedavinin erken başlaması önemli olmaktadır(122).

Başka bir çalışmada Weinbergerova ve arkadaşları BDG'nin serum ve BAL'dan test edildiğinde İPA tanısının konmasındaki etkinliğini incelemiştir. Yapılan BDG testinin BAL için duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif öngörü değeri ve doğruluk oranı sırasıyla %56,5, %83,2, %34,2, %92,5 ve %79,7, serum için sırasıyla %56,5, %82,6, %33,3, %92,5 ve %79,1 olarak birbirine yakın değerler bulunmuştur(123).

Hematolojik maligniteleri veya solid organ tümörleri olan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yapılan bir metaanaliz çalışmasında İM tanısında Fungitell BDG testinin kullanımı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %80 ve %63 olarak bulunmuştur. Yapılan ROC analizinde ise AUC değeri 0,81 olarak hesaplanmıştır(124).

Karageorgopoulos ve arkadaşlarının 16 çalışmayı değerlendirildiği bir metaanalizde BDG ELISA analizlerinin duyarlılığı %76,8 (%67,1-%84,3) ve özgüllüğü %85,3 (%79,6-%89,7) olarak bulunmuştur. EORTC/MSG tanı kriterlerinin altın standart olarak alındığı çalışmada ROC eğrisi altında kalan alan 0,89 olarak hesaplanmıştır(125). Bizim çalışmamızda BDG CLIA testi için ROC eğrisi altında kalan alan bu çalışmayla korele şekilde 0.878 olarak hesaplanmıştır.

Başka bir çalışmada hematolojik maligniteleri olan hastalarda İA tanısı için BDG testinin performansı incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda BDG testinin kanıtlanmış veya yüksek olası İA tanısı olan hastalar için GM testinden daha duyarlı olduğu fakat GM testine kıyasla daha düşük özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur. İnvazif aspergilloz tanısı için GM testinin BDG testinden daha özgül olduğu (sırasıyla %97'ye karşı %82) ve BDG testinin GM testinden daha duyarlı olduğu (sırasıyla %81'e karşı %49) bulunmuştur. Genel olarak BDG testi GM testinden daha iyi performans göstermiştir. İki testin birbirini tamamlayacak şekilde kullanılması önerilmiştir (126). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak GM testinin BDG testinden daha özgül olduğu (sırasıyla %92,1'ye karşı %81,6) ve BDG testinin GM testinden daha duyarlı olduğu (sırasıyla %88,2'e karşı %70,6) bulunmuştur.

Lahmer ve arkadaşları tarafından yapılan gözlemsel bir çalışmada hematolojik maligniteleri ve septik şoku olan kritik hastalarda İPA erken tanısı için serum GM ve BDG ELISA testleri karşılaştırılmıştır. Galaktomannan Platelia testi için genel duyarlılık %30 (%26-38) ve özgüllük %98 (%94-100), BDG Fungitell testi için genel duyarlılık %90 (%86-96) ve özgüllük %85 (%79-86) olarak bulunmuştur(127).

European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group (EORTC/MSG) 2020 tanımlamalarında mikolojik kriter olarak antijen ELISA testleri önerilmektedir. ELISA testlerinin toplu olarak çalışılması, tek örnek çalışmak için ekonomik olmaması, sonuç verme süresinin uzun olması ve uzun manuel basamaklardan oluşması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, tek bir numuneyle maliyet açısından verimli bir şekilde çalışabilen GM ve BDG testleri, İFE tanısını hızlandırma ve mortaliteyi azaltma potansiyeline sahiptir. Son yıllarda İFE tanısı için kemilüminesans immünoanaliz (CLIA) temelli çalışan ve kısa sürede sonuç veren tam otomatize kapalı sistemler kullanılmaya başlanmıştır.

Troncoso ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Platelia™ *Aspergillus* Ag testiyle *Aspergillus* GM testi (CLIA) karşılaştırılmıştır. İki yöntem serum örnekleri için %85,7 uyumlu bulunmuştur. *Aspergillus* GM testi (CLIA) Platelia™'ya göre yaklaşık %16 daha yüksek bir duyarlılığa sahipken, Platelia™ ELISA, GM CLIA'ya göre %11 daha fazla özgüllük göstermiştir(128). Çalışmamızda Platelia™ ELISA referans alındığında, *Aspergillus* GM testinin (CLIA) testinin duyarlılığı %70,6, özgüllüğü %92,1 olarak bulunmuştur.

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 126 İA (43 kanıtlanmış, 83 yüksek olası) ve 195 negatif serum örneği toplanmıştır. İnvazif aspergilloz tanısı EORTC/MSG kılavuzuna göre konulmuştur. Toplanan 326 serum örneği hem Platelia™ *Aspergillus* Ag testiyle hem de *Aspergillus* GM testi (CLIA) ile çalışılmıştır. Platelia™ *Aspergillus* Ag testine göre *Aspergillus* GM testinin (CLIA) duyarlılık %83,33 ve özgüllük %82,05 olarak bulunmuştur(129). Bizim çalışmamızda ise Platelia™ *Aspergillus* Ag testi referans alındığında GM CLIA testinin duyarlılığı %70,6, özgüllüğü %92,1 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda duyarlılık oranının daha düşük bulunması, İA tanılı hasta sayısının daha az olmasına bağlanmıştır.

Küpper ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada allojenik kök hücre nakli olan 101 hastadan (kanıtlanmış/yüksek olası İA 4 hasta) oluşan bir grupta *Aspergillus* GM Ag testi (CLIA) performansı değerlendirilmiştir. GM CLIA testi için tek serum örneğinde duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD sırasıyla %75.0, %88,7, %21,7, %98,8 olarak bulunmuştur. Yapılan ROC analizinde ise AUC değeri 0,819 olarak hesaplanmıştır(130).

Başka bir çalışmada Calero ve arkadaşları iki farklı *Aspergillus* GM antijen testini karşılaştırmıştır. 327 hastadan *Aspergillus* galactomannan Ag (CLIA) ile Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) testleri çalışılmıştır. Bunlardan 120'si retrospektif olarak (95 kanıtlanmış/yüksek olası, 25 sağlıklı kontrol) 207'si prospektif olarak test edilmiştir. Platelia™ *Aspergillus* Ag testi referans alındığında GM CLIA testi için %93,8 duyarlılık ve %89,5 özgüllük elde edilmiştir. ROC eğrisi altındaki alan 0,97 bulunmuştur. EORTC/MSG kriterleri referans alınarak sadece

retrospektif grup için testler değerlendirildiğinde Platelia™ *Aspergillus* Ag testi için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırasıyla %63,2, %100, %100 ve %41,7 iken *Aspergillus* galactomannan Ag (CLIA) için sırasıyla %80,9, %100, %100 ve %59,5 bulunmuştur. ROC eğrisinin eğrisi altında kalan alanlar ise Platelia™ *Aspergillus* Ag testi için 0,962 ve GM CLIA testi için 0,968 hesaplanmıştır(105).

Albert ve arkadaşlarının çalışmasında serum ve alt solunum yolu örneklerinde Platelia *Aspergillus* Ag testi ve *Aspergillus* GM CLIA testi karşılaştırılmıştır. Toplamda 177 yetişkin hastadan alınan 535 örnek (320 serum, 86 bronşiyal aspirat, 70 BAL ve 59 ETA) her iki yöntemle test edilmiştir. Hasta gruplarında kanıtlanmış İPA tanılı 1 hasta, yüksek olasılıklı İPA tanılı 11 hasta ve düşük olasılıklı İPA tanılı 33 hasta bulunmaktadır. Kanıtlanmış/yüksek olası İPA tanısı için GM CLIA testinin genel duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %65 olarak bulunmuştur. Serum örnekleri için PPD ve NPD sırasıyla %42 ve %92 olarak diğer örneklerle göre daha yüksek hesaplanmıştır. Sadece serum örneklerini içerecek şekilde ROC analizi yapılarak AUC değerleri GM CLIA için 0,80 Platelia GM için 0,87 bulunmuştur(131). Bizim çalışmamızda ise Platelia *Aspergillus* Ag testi referans alındığında GM CLIA testinin duyarlılığı %70,6, özgüllüğü %92,1, PPD %66,7, NPD %93,3 olarak bulunmuştur. ROC analizi sonucunda AUC değeri 0,869 olarak hesaplanmıştır.

β -(1,3)-D-glukanın tespiti, atnalı yengeçleri (horseshoe crab) olarak bilinen *Limulus polyphemus* ve *Tachypleus tridentatus* amebositlerinden elde edilen faktör G'nin BDG tarafından aktive edilerek koagülasyon kaskadını başlatması esasına dayanmaktadır. Limulusun yapay olarak yetiştirilmesi zordur ve büyük ölçekli

yetiştirme hiçbir zaman elde edilememiştir(132). *Limulus* kaynaklarının giderek azalması nedeniyle farklı bir yöntem bulmak için araştırmalar yapılmaktadır. Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada 574 serum rneği çalışılmıştır. Çalışmada 52 rnek İFE hastalarından, 140 örnek yüksek olası İFE hastalarından ve 382 rnek İFE olmayan veya sağlıklı gönüllülerden alınmıştır. Örnekler CLIA ve ELISA yöntemi kullanılarak (1-3)- β -D-glukan antijen tespiti için eş zamanlı olarak test edilmiştir. Her iki test için de ROC analizi yapılmıştır. Eğri altında kalan alan 0,905 bulunmuştur. Kemilüminesans yöntemle çalışılan BDG antijen testi için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %83,33 ve %89,76 olarak hesaplanmıştır(133). Bizim alışmamızda Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum rneğinde CLIA BDG testinin duyarlılığı %88,2, özgüllüğü %81,6, PPD'si %51,7, NPD'si %96,9 olarak bulunmuştur. ROC analizi sonucunda AUC değeri 0,878 olarak hesaplanmıştır.

Literatüre göre; İA için GM testinin genel duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %67-%100 ve %86-100 arasında değişmektedir. Galaktomannan tespiti için en sık kullanılan ticari test, FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi olarak bilinmektedir. Çeşitli alışmalarla Platelia™ *Aspergillus* Ag testi %44 ile %100 arasında değişen duyarlılık değerleri ve %78,6 ile %100 arasında değişen özgüllük değerlerine sahip olarak bulunmuştur. Galaktomannan İA tanısı ve tedavi takibi için iyi bir biyobelirteç olmasına rağmen, bazı yayınlarda *A. fumigatus*'a karşı düşük duyarlılık göstermesi ve erken tanı için yetersiz kalması dezavantaj olarak bildirilmiştir. Buna rağmen riskli hasta popülasyonunda invazif örnek alınması zor olduğu için serolojik teslerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Serum örneklerinde

Çalışılan (1-3)- β -D-glukan testi, İFE'lerin taranmasında ve tanısında yardımcı olan etkili bir panfungal belirteçtir. Bazı çalışmalarda %75 oranında yanlış pozitif sonuç bildirilmiştir. Fakat BDG testinin NPD'si %90,57-99,8 aralığında olduğu için bu antijenin daha çok İFE dışlanması için kullanılması önerilmiştir(134).



6. SONUÇLAR

İnvazif fungal enfeksiyonlar immün sistemi baskılanmış hematolojik maligniteli hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Hematolojik malignitesi, kemoterapi kaynaklı nötropenisi veya hematopoietik kök hücre nakli (HSCT) yapılmış hastalar yüksek risk altındadır.

İnvazif fungal enfeksiyonların tanısı için kan veya invazif yöntemlerle alınan doku örnekleri gerekmektedir. Kültür dışı hızlı tanı testleri, erken tanı konulmasına imkan sağlayarak antifungal tedavinin hızlı bir şekilde başlanmasına yardımcı olmaktadır.

Çalışmamızda GM ve BDG testlerinin İA için tanısal duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Kemilüminesans analiz yöntemiyle yapılan BDG testinin GM testine göre daha yüksek duyarlılığa fakat, düşük özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur. İnvazif aspergilloz tanısı için Platelia™ *Aspergillus* Ag testini referans kabul ederek, CLIA temelli yöntemleri karşılaştırdığımızda, bu testlerin hızlı tanıda kullanılabileceği, ancak daha geniş hasta gruplarını içeren ek çalışmalarla bu bulguların doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Hızlı tanı konmasıyla uygun tedaviye erken başlanması, mortalitenin düşürülmesi için faydalı olmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Pagano L, Mayor S. Invasive fungal infections in high-risk patients: report from TIMM-8 2017. Future Sci OA. 2018;4(6):FSO307.
2. 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.
3. Malcolm TR, Chin-Hong PV. Endemic mycoses in immunocompromised hosts. Curr Infect Dis Rep. 2013;15(6):536-43.
4. Kume H, Yamazaki T, Abe M, Tanuma H, Okudaira M, Okayasu I. Increase in aspergillosis and severe mycotic infection in patients with leukemia and MDS: comparison of the data from the Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan in 1989, 1993 and 1997. Pathol Int. 2003;53(11):744-50.
5. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 1998;26(4):781-803; quiz 4-5.
6. Gairdner WT. Clinical retrospect of cases treated during the session 1855-6 (november to march); including remarks upon the more important fatal cases, and upon the cases of inflammation of the lungs treated during that period. Edinb Med J. 1856;1(11):969-84.
7. Raper KB. FD. The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company 1965.
8. Cray JA, Bell AN, Bhaganna P, Mswaka AY, Timson DJ, Hallsworth JE. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? Microb Biotechnol. 2013;6(5):453-92.
9. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus species* collected for the transplant-associated infection surveillance network. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3138-41.

10. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of multicenter prospective antifungal therapy (path) alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48(3):265-73.
11. Lee SO. Diagnosis and treatment of invasive mold diseases. *Infect Chemother*. 2023;55(1):10-21.
12. Kauffman C, Pappas P, Sobel J, Dismukes W. *Essentials of clinical mycology*. Second edition. ed. New York: Springer2011. 243-4 p.
13. Tümbay E. *Tıbbi Mikoloji*. 1 ed2021. 335-6 p.
14. Yu J-H, Mah J-H, Seo J-A. Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryotic cell*. 2006;5(10):1577-84.
15. Park HS, Yu JH. Developmental regulators in *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol*. 2016;54(3):223-31.
16. Procop G. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Seventh ed2017. 1345 p.
17. Latge JP. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*. 2010;12(7):863-72.
18. Henry C, Latgé J-P, Beauvais A. α 1, 3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*. 2012;11(1):26-9.
19. Latge JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev*. 2019;33(1).
20. Komachi Y, Hatakeyama S, Motomatsu H, Futagami T, Kizjakina K, Sobrado P, et al. GFSA encodes a novel galactofuranosyltransferase involved in biosynthesis of galactofuranose antigen of O-glycan in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 2013;90(5):1054-73.
21. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):5957-62.

22. Valsecchi I, Dupres V, Stephen-Victor E, Guijarro JI, Gibbons J, Beau R, et al. Role of hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi (Basel)*. 2017;4(1).
23. Levdansky E, Romano J, Shadkchan Y, Sharon H, Verstrepen KJ, Fink GR, et al. Coding tandem repeats generate diversity in *Aspergillus fumigatus* genes. *Eukaryot Cell*. 2007;6(8):1380-91.
24. Upadhyay SK, Mahajan L, Ramjee S, Singh Y, Basir SF, Madan T. Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 6):714-22.
25. Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, Howell PL, Sheppard DC. Galactosaminogalactan (GAG) and its multiple roles in *Aspergillus* pathogenesis. *Virulence*. 2019;10(1):976-83.
26. Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, et al. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal beta-glucan from the immune system. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003575.
27. Earle K, Valero C, Conn DP, Vere G, Cook PC, Bromley MJ, et al. Pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*. 2023;14(1):2172264.
28. Wagener J, Echtenacher B, Rohde M, Kotz A, Krappmann S, Heesemann J, et al. The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AFMNT1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell*. 2008;7(10):1661-73.
29. Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, Boettner D, Fortwendel J, Panepinto JC, et al. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CGRA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun*. 2004;72(8):4731-40.
30. Bhabhra R, Askew DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1:S87-93.

31. Bergmann A, Hartmann T, Cairns T, Bignell EM, Krappmann S. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infect Immun*. 2009;77(9):4041-50.
32. Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(1):1-23.
33. Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 2009;460(7259):1117-21.
34. Latge JP, Beauvais A, Chamilos G. The Cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71:99-116.
35. Bayry J, Beaussart A, Dufrene YF, Sharma M, Bansal K, Kniemeyer O, et al. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infect Immun*. 2014;82(8):3141-53.
36. Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I, Gresnigt MS, Samonis G, Drakos E, et al. *Aspergillus* cell wall melanin blocks LC3-associated phagocytosis to promote pathogenicity. *Cell Host Microbe*. 2016;19(1):79-90.
37. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):6120-2.
38. Kupfahl C, Michalka A, Lass-Flörl C, Fischer G, Haase G, Ruppert T, et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(3-4):319-27.
39. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):447-65.
40. Anaissie EJ, Costa SF. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1546-8.

41. Baltussen TJH, Zoll J, Verweij PE, Melchers WJG. Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus spp.* Microbiol Mol Biol Rev. 2020;84(1).
42. Binder U, Lass-Flörl C. New insights into invasive aspergillosis--from the pathogen to the disease. Curr Pharm Des. 2013;19(20):3679-88.
43. Bertuzzi M, Hayes GE, Icheoku UJ, van Rhijn N, Denning DW, Osherov N, et al. Anti-*Aspergillus* activities of the respiratory epithelium in health and disease. J Fungi (Basel). 2018;4(1).
44. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax. 2015;70(3):270-7.
45. Ridley C, Thornton DJ. Mucins: the frontline defence of the lung. Biochem Soc Trans. 2018;46(5):1099-106.
46. Heinekamp T, Schmidt H, Lapp K, Pahtz V, Shopova I, Koster-Eiserfunke N, et al. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. Semin Immunopathol. 2015;37(2):141-52.
47. Kerr SC, Fischer GJ, Sinha M, McCabe O, Palmer JM, Choera T, et al. FleA Expression in *Aspergillus fumigatus* is recognized by fucosylated structures on mucins and macrophages to prevent lung infection. PLoS Pathog. 2016;12(4):e1005555.
48. Wasylnka JA, Moore MM. Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and nonphagocytic cells in vitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. Infect Immun. 2002;70(6):3156-63.
49. Segal BH. Aspergillosis. N Engl J Med. 2009;360(18):1870-84.
50. Smole U, Kratzer B, Pickl WF. Soluble pattern recognition molecules: Guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces. Eur J Immunol. 2020;50(5):624-42.
51. Dutta O, Espinosa V, Wang K, Avina S, Rivera A. Dectin-1 promotes type i and iii interferon expression to support optimal antifungal immunity in the lung. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:321.

52. Khani S, Seyedjavadi SS, Hosseini HM, Goudarzi M, Valadbeigi S, Khatami S, et al. Effects of the antifungal peptide Skh-AMP1 derived from *Satureja khuzistanica* on cell membrane permeability, ROS production, and cell morphology of conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Peptides*. 2020;123:170195.
53. Henriët SS, Verweij PE, Warris A. *Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction. *J Infect Dis*. 2012;206(7):1128-37.
54. Li T, Zhang Z, Li X, Dong G, Zhang M, Xu Z, et al. Neutrophil extracellular traps: signaling properties and disease relevance. *mediators inflamm*. 2020;2020:9254087.
55. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2020;130:110550.
56. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
57. Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol*. 2000;165(1):381-8.
58. Cadena J, Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):125-42.
59. Fraser R, Pare, J., Pare, P., Frasier, R., Genereux, G.,. *Diagnosis of diseases of the chest*. third ed. ed1998.
60. 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.
61. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol*. 2013;51(4):361-70.

62. Agarwal R, Denning DW, Chakrabarti A. Estimation of the burden of chronic and allergic pulmonary aspergillosis in India. *PLoS One*. 2014;9(12):e114745.
63. Stevens DA, Schwartz HJ, Lee JY, Moskovitz BL, Jerome DC, Catanzaro A, et al. A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *N Engl J Med*. 2000;342(11):756-62.
64. Greenberger PA, Bush RK, Demain JG, Luong A, Slavin RG, Knutsen AP. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2(6):703-8.
65. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus spp*. *Med Mycol*. 2005;43 Suppl 1:S207-38.
66. Felton TW, Baxter C, Moore CB, Roberts SA, Hope WW, Denning DW. Efficacy and safety of posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2010;51(12):1383-91.
67. Fung M, Babik JM. COVID-19 in immunocompromised hosts: what we know so far. *Clin Infect Dis*. 2021;72(02):340-50.
68. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Annals of Internal Medicine*. 1984;100(3):345-51.
69. Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis: recent advances. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(6):673-81.
70. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2012;119(8):1831-7; quiz 956.
71. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis*. 2007;44(3):373-9.

72. Ledoux MP, Herbrecht R. Invasive pulmonary aspergillosis. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(2).
73. Prasad A, Agarwal K, Deepak D, Atwal SS. Pulmonary aspergillosis: what ct can offer before it is too late! *J Clin Diagn Res*. 2016;10(4):TE01-5.
74. Munoz P, Vena A, Ceron I, Valerio M, Palomo J, Guinea J, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in heart transplant recipients: two radiologic patterns with a different prognosis. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(10):1034-40.
75. Fernandez-Ruiz M, Silva JT, San-Juan R, de Dios B, Garcia-Lujan R, Lopez-Medrano F, et al. *Aspergillus* tracheobronchitis: report of 8 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(5):261-73.
76. Muñoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12:24-39.
77. Kanaujia R, Singh S, Rudramurthy SM. Aspergillosis: an update on clinical spectrum, diagnostic schemes, and management. *Curr Fungal Infect Rep*. 2023;1-12.
78. 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.
79. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-76.
80. Sharma P, Mukherjee A, Karunanithi S, Bal C, Kumar R. Potential role of 18F-FDG PET/CT in patients with fungal infections. *American Journal of Roentgenology*. 2014;203(1):180-9.
81. Park S, Kim SH, Choi SH, Sung H, Kim MN, Woo J, et al. Clinical and radiological features of invasive pulmonary aspergillosis in transplant

- recipients and neutropenic patients. *Transplant Infectious Disease*. 2010;12(4):309-15.
82. Lim C, Seo J, Park S-Y, Hwang H-J, Lee H, Lee S-O, et al. Analysis of initial and follow-up CT findings in patients with invasive pulmonary aspergillosis after solid organ transplantation. *Clinical radiology*. 2012;67(12):1179-86.
 83. Jung J, Kim M, Lee H, Park Y, Lee S-O, Choi S-H, et al. Comparison of computed tomographic findings in pulmonary mucormycosis and invasive pulmonary aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(7):684. e11-. e18.
 84. Lass-Flörl C. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2019;57(Supplement_2):S155-S60.
 85. Lass-Flörl C, Aigner M, Nachbaur D, Eschertzhuber S, Bucher B, Geltner C, et al. Diagnosing filamentous fungal infections in immunocompromised patients applying computed tomography-guided percutaneous lung biopsies: a 12-year experience. *Infection*. 2017;45:867-75.
 86. Zarrinfar H, Saber S, Kordbacheh P, Makimura K, Fata A, Geramishoar M, et al. Mycological microscopic and culture examination of 400 bronchoalveolar lavage (BAL) samples. *Iranian journal of public health*. 2012;41(7):70.
 87. Leck A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health*. 1999;12(30):24.
 88. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdoglu S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24 Suppl 1:e1-e38.
 89. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):247-80.
 90. Beirao F, Araujo R. State of the art diagnostic of mold diseases: a practical guide for clinicians. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(1):3-9.
 91. Sutton DA. Specimen collection, transport, and processing: mycology. 2006.

92. Karthaus M. Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011;16(4):145-52.
93. Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, Haydour Q, et al. Microbiological laboratory testing in the diagnosis of fungal infections in pulmonary and critical care practice. an official american thoracic society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(5):535-50.
94. Walsh TJ, Hayden RT, Larone DH. *Larone's medically important fungi: A guide to identification*: John Wiley & Sons; 2018.
95. Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, Cleverley JR, Lucas SB, Kibbler CC, et al. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(4):461-74.
96. Brakhage AA, Jahn B, Schmidt A. *Aspergillus Fumigatus*: Biology, clinical aspects, and molecular approaches to pathogenicity: Karger; 1999.
97. Baniya S. *Aspergillus*: morphology, clinical features, and lab diagnosis. *microbeonline. Microbe Online*; 2023.
98. Walsh TJ, Wissel MC, Grantham KJ, Petraitiene R, Petraitis V, Kasai M, et al. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus species* by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4150-7.
99. Chalupova J, Raus M, Sedlarova M, Sebel M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv.* 2014;32(1):230-41.
100. Lamoth F. Galactomannan and 1,3-beta-d-Glucan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Fungi (Basel).* 2016;2(3).
101. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet infectious diseases.* 2004;4(6):349-57.

102. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;34(1):7-14.
103. Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meersseman W, Lagrou K, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2007;44(10):1329-36.
104. Miceli MH, Maertens J. Role of non-culture-based tests, with an emphasis on galactomannan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(5):650-61.
105. Calero AL, Alonso R, Gadea I, Vega MDM, Garcia MM, Munoz P, et al. Comparison of the performance of two galactomannan detection tests: Platelia *Aspergillus* Ag and *Aspergillus* Galactomannan Ag Virclia Monotest. *Microbiol Spectr*. 2022;10(2):e0262621.
106. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):490-526.
107. Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S. A new (1→3)-β-D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus ameobocytes*. *FEBS letters*. 1981;129(2):318-21.
108. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1→3)-β-d-glucan assay for invasive fungal disease. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1650-9.
109. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3731-42.
110. Cruciani M, Mengoli C, Barnes R, Donnelly JP, Loeffler J, Jones BL, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;9(9):CD009551.

111. Fernandez-Cruz A, Magira E, Heo ST, Evans S, Tarrand J, Kontoyiannis DP. Bronchoalveolar lavage fluid cytology in culture-documented invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases: Analysis of 67 Episodes. *J Clin Microbiol.* 2018;56(10).
112. Eigl S, Prattes J, Lackner M, Willinger B, Spiess B, Reinwald M, et al. Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients. *Crit Care.* 2015;19(1):178.
113. Mercier T, Guldentops E, Lagrou K, Maertens J. Galactomannan, a surrogate marker for outcome in invasive aspergillosis: finally coming of age. *Frontiers in microbiology.* 2018;9:661.
114. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(12):CD007394.
115. Cuhadar T, Kalkanci A, Tunccan Guzel O, Yegin ZA, Ozkurt ZN, Kokturk N, et al. [Comparison of the results of galactomannan and beta glucan antigen tests in the suspicion of invasive pulmonary aspergillosis]. *Mikrobiyol Bul.* 2023;57(2):274-82.
116. Xiao C, Han L, Ni Y, Guo X. Correlation between dynamic monitoring of serum galactomannan antigen and anti fungal treatment in adult hematologic patients at risk of invasive aspergillosis. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy.* 2015:364-7.
117. Guo J, Xiao C, Tian W, Lv L, Hu L, Ni L, et al. Performance of the *Aspergillus* galactomannan lateral flow assay with a digital reader for the diagnosis of invasive aspergillosis: a multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2024;43(2):249-57.
118. Das S, Capoor MR, Singh A, Agarwal Y. Diagnostic utility of galactomannan enzyme immunoassay in invasive aspergillosis in pediatric patients with hematological malignancy. *Mycopathologia.* 2023;188(6):1055-63.
119. Alanio A, Dellièrè S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *The Lancet Respiratory medicine.* 2020.

120. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995;345(8941):17-20.
121. Cento V, Alteri C, Mancini V, Gatti M, Lepera V, Mazza E, et al. Quantification of 1,3-beta-d-glucan by Wako beta-glucan assay for rapid exclusion of invasive fungal infections in critical patients: A diagnostic test accuracy study. *Mycoses*. 2020;63(12):1299-310.
122. Dichtl K, Forster J, Ormanns S, Horns H, Suerbaum S, Seybold U, et al. Comparison of beta-D-Glucan and galactomannan in serum for detection of invasive aspergillosis: Retrospective analysis with focus on early diagnosis. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4).
123. Weinbergerova B, Kabut T, Kocmanova I, Lengerova M, Pospisil Z, Kral Z, et al. Bronchoalveolar lavage fluid and serum 1,3-beta-D-glucan testing for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in hematological patients: the role of factors affecting assay performance. *Sci Rep*. 2020;10(1):17963.
124. White SK, Walker BS, Hanson KE, Schmidt RL. Diagnostic accuracy of beta-d-glucan (fungitell) testing among patients with hematologic malignancies or solid organ tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Pathol*. 2019;151(3):275-85.
125. 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(6):750-70.
126. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, et al. Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2328-33.
127. Lahmer T, Rasch S, Schnappauf C, Beitz A, Schmid RM, Huber W. Comparison of serum galactomannan and 1,3-beta-d-glucan determination for early detection of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with hematological malignancies and septic shock. *Mycopathologia*. 2016;181(7-8):505-11.

128. Troncoso CR, Sepulveda FC, Sepulveda PE, Guzman UC, Morales GM, Tapia PC. [Evaluation of the *Aspergillus* galactomannan ag VircliaR Monotest test as an alternative to Platelia *Aspergillus* EIA kit]. Rev Chilena Infectol. 2022;39(3):248-53.
129. Wang H, Liu C, Zhang Y, Sun K, Du J, Su Y, et al. Clinical evaluation of a novel chemiluminescent microparticle immunoassay of *Aspergillus* galactomannan in diagnosis of invasive aspergillosis 2020 [Erişim adresi: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/clinical-evaluation-of-a-novel-chemiluminescent-microparticle-immunoassay-of-aspergillus-galactomannan-in-diagnosis-of-invasive-aspergillosis/].
130. Kupper C, Erb TM, Trager J, Meintker L, Valenza G, Bogdan C, et al. The *Aspergillus* galactomannan Ag VIRCLIA(R) Monotest and the sona *Aspergillus* galactomannan lateral flow assay show comparable performance for the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycoses. 2024;67(8):e13782.
131. Albert E, Alcaraz MJ, Gimenez E, Clari MA, Torres I, Colomina J, et al. Comparative performance of the Platelia *Aspergillus* Antigen and *Aspergillus* galactomannan antigen Virclia Monotest immunoassays in serum and lower respiratory tract specimens: a "real-life" experience. Microbiol Spectr. 2024;12(8):e0391023.
132. Kwan BK, Chan HK, Cheung SG. Habitat use of globally threatened juvenile Chinese horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* under the influence of simulated intertidal oyster culture structures in Hong Kong. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. 2018;28(1):124-32.
133. Liu C, Zhang L, Zhang J, Wang M, You S, Su R, et al. Rational design of antibodies and development of a novel method for (1-3)-beta-D glucan detection as an alternative to Limulus ameobocyte lysate assay. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1322264.
134. Mendonca A, Santos H, Franco-Duarte R, Sampaio P. Fungal infections diagnosis - Past, present and future. Res Microbiol. 2022;173(3):103915.

8. ÖZET

İNVAZİF MİKOZLARIN TANISINDA SEROLOJİK TANI YÖNTEMLERİNİN YERİ

İnvazif mikozlar bağışıklığı baskılanmış hastalarda morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Serolojik testler, erken tanı konulmasına imkan sağlayarak antifungal tedavinin hızlı bir şekilde başlanmasına yardımcı olmaktadır. Serumda galaktomannan, 1,3-β-D-glukan testleri erken tanıya yardımcı olması amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada Platelia™ *Aspergillus* Ag Testi referans alınarak Dynamiker *Aspergillus* Ag Kit (ELISA), *Aspergillus* Galactomannan Detection Kit (CLIA) ve Fungus (1-3)-β -D-Glukan Tespit Kit (CLIA) antijen testlerinin duyarlılıkları bulunmuştur.

Çalışmamıza 1 Ekim 2023- 1 Haziran 2024 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi hematoloji servisinde yatan hematopoetik sistem kanserli invazif mikoz şüphesi olan hastalardan (17 hasta), hematopoetik sistem kanserli invazif mikoz şüphesi olmayan hastalardan (49 hasta) ve sağlıklı gönüllülerden (27 kişi) alınan 93 serum dahil edilmiştir. Tüm örnekler FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag Testi ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda pozitif çıkan 17 hasta EORTC/MSG kriterlerine göre yüksek olasılıklı invazif aspergilloz olarak sınıflandırılmıştır. Toplamda 93 hasta serumu Dynamiker *Aspergillus* Ag Kit (ELISA), *Aspergillus* Galactomannan Detection Kit (CLIA) ve Fungus (1-3)-β -D-Glukan Tespit Kiti (CLIA) kullanılarak test edilmiştir. CLIA testleri FACIS-1(Full-Automatic Chemiluminescence Immunoassay System) cihazında çalışılmıştır. Bu

sonuçlara göre Platelia™ *Aspergillus* Ag Testi referans alınarak özgüllük, duyarlılık, negatif prediktif ve pozitif prediktif değerleri hesaplanmıştır.

FDA onaylı Platelia™ *Aspergillus* Ag testi sonuçlarına göre tek serum örneğinde Dynamiker *Aspergillus* GM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,4, pozitif prediktif değeri (PPD) %89,5, negatif prediktif değeri (NPD) %100 ($p<0,001$), CLIA GM testinin duyarlılığı %70,6, özgüllüğü %92,1, PPD'si %66,7, NPD'si %93,3 ($p<0,001$), CLIA BDG testinin duyarlılığı %88,2, özgüllüğü %81,6, PPD'si %51,7, NPD'si %96,9 ($p<0,001$) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre CLIA BDG testinin CLIA GM testinden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu, CLIA GM testinin ise CLIA BDG testinden daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Platelia™ *Aspergillus* Ag testi referans alınarak yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) Dynamiker ELISA için 0,994 CLIA BDG için 0,878 ve CLIA GM için 0,869 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre invazif aspergilloz tanısında, CLIA temelli yöntemlerin hızlı tanıda kullanılabileceği, ancak daha geniş hasta gruplarını içeren ek çalışmalarla bu verilerin doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Galaktomannan, *Aspergillus*, İnvazif mikoz, CLIA

9. SUMMARY

IMPORTANCE OF SEROLOGICAL METHODS IN THE DIAGNOSIS OF INVASIVE MYCOSES

Invasive mycoses are an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. Serological testing allows early diagnosis and rapid initiation of antifungal therapy. Serum galactomannan and 1,3- β -D-glucan tests are used for early diagnosis.

Our study, was performed by using a total of 93 serum samples from patients with suspicion of invasive mycosis with hematopoietic malignancy (17 patients), patients without suspicion of invasive mycosis with hematopoietic malignancy (49 patients) and healthy volunteers (27 people) who were admitted to the Hematology Department of Gazi University Faculty of Medicine Hospital between October 1, 2023 and June 1, 2024. All samples were tested using the FDA approved Platelia™ *Aspergillus* Ag Test. As a result of this analysis, 17 positive patients were classified as probable invasive aspergillosis according to EORTC/MSG criteria. A total of 93 patient samples were tested using the Dynamiker *Aspergillus* Ag Kit (ELISA), *Aspergillus* Galactomannan Detection Kit (CLIA) and Fungus (1-3) β -D-Glucan Detection Kit (CLIA). CLIA tests were performed on FACIS-1 (Full-Automatic Chemiluminescence Immunoassay System). Specificity, sensitivity, negative predictive value and positive predictive value were calculated according to the reference method Platelia™ *Aspergillus* Ag Test.

According to the results of the FDA-approved Platelia™ *Aspergillus* Ag Test, the sensitivity of the Dynamiker *Aspergillus* GM Test in a single serum sample was 100%, specificity 97.4%, positive predictive value (PPV) 89.5%, negative predictive value (NPV) 100% ($p < 0.001$), the sensitivity of the CLIA GM test was 70.6%, specificity 92.1%, PPV 66.7%, NPV 93.3% ($p < 0.001$), while the sensitivity of the CLIA BDG test was 88.2%, specificity 81.6%, PPV 51.7%, NPV 96.9% ($p < 0.001$). According to these results, the CLIA BDG test has been shown to have higher sensitivity than the CLIA GM test and the CLIA GM test has higher specificity than the CLIA BDG test.

Using the Platelia™ *Aspergillus* Ag Test as a reference, the areas under the curve (AUC) of the ROC curve were 0.994 for Dynamiker ELISA, 0.878 for CLIA BDG and 0.869 for CLIA GM. According to these results, CLIA-based methods can be used for rapid diagnosis of invasive aspergillosis, but these data should be confirmed with further studies in larger patient groups.

Key words: Galactomannan, *Aspergillus*, invasive mycosis, CLIA