

Sistemik Aspergilloz Tanısında Çeşitli Yöntemlerin Araştırılması

Investigation of Various Methods in the Diagnosis of Systemic Aspergillosis

Hafize SAV¹, Nedret KOÇ², Mustafa Altay ATALAY², Orhan YILDIZ³, Gonca DEMİR²

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Giriş: İmmünsüpresif hastalarda *Aspergillus* infeksiyonları sık gözlenir ve yaşamı tehdit eden klinik tablo oluşturur. Bu hastalarda klinik semptom ve bulgular nonspesifik olabilir. Hastayı takip eden klinisyenlerin her zaman kültür sonuçlarını bekleyecek zamanları olmamakta ya da hastanın genel durumu buna izin vermemektedir. Bu durum hedefe yönelik spesifik tedaviden öncelikli olarak ampirik ya da profilaktik uygulamaların tercih edilmesine ve son zamanlarda gündemde olan, serolojik ve moleküler dokümantasyona dayalı preemptif yaklaşımın uygulanmasına yol açmaktadır. Bu çalışmada invaziv aspergilloz hastalarında kültür, galaktomannan (GM), 1,3 β-D glukon (BG) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rtPCR) yöntemlerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu ve Mikoz Çalışma Grubu (EORTC/MSG) kriterlerine göre 42 invaziv aspergilloz ve 37 kontrol hastasını içeren 79 hasta analiz edildi ve bu hastalar üç kesin invaziv aspergilloz, 10 yüksek olasılıklı invaziv aspergilloz, 29 düşük olasılıklı invaziv aspergilloz olarak sınıflandırıldı. Klinik örnekler direkt mikroskopi ve kültürle değerlendirildi. Serum örneklerinde mantar antijeni GM testi (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad) ve BG testi (Fungitell, Associates of Cape Cod, ABD) ile çalışıldı. Serum örneklerinden deoksiribonükleik asit (DNA) belirlenmesi için rtPCR (Light Cycler-Roche, ABD) testi uygulandı.

Bulgular: İnvaziv aspergilloz tanısı için BG testinin (cut-off 80 pg/mL) duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değeri (PPD), negatif prediktif değeri (NPD) sırasıyla %78, %78, %80 ve %76 olarak hesaplandı. İnvaziv aspergilloz olmayan sekiz hastanın en az bir serum örneğinde BG değeri 80 pg/mL ve üzerinde saptandı. Aynı serum örneklerinden GM testi çalışıldı ve testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD değeri sırasıyla (cut-off 0.5 ng/mL) %47, %89, %83 ve %60 olarak belirlendi. Kontrol hastalarının beşinin serumunda GM testi ile pozitiflik saptandı. Serolojik yöntemlerin yanı sıra bu örneklerden moleküler yöntem olan rtPCR çalışıldı ve testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD, NPD'si sırasıyla %30, %86, %72 ve %52 olarak belirlendi. Kontrol hastalarından beş hastanın serumunda rtPCR ile pozitiflik saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada BG, GM, rtPCR testlerinden BG testinin duyarlılığının GM testinin ise özgüllüğünün en yüksek olduğu saptandı. İnvaziv aspergilloz tanısında kültür dışı yöntemlerin anlamlılığını artırmak için bu testlerin klinik ve radyolojik bulgularla birlikte değerlendirilmesi gerektiği vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: Galaktomannan; Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; Aspergilloz

SUMMARY

Investigation of Various Methods in the Diagnosis of Systemic Aspergillosis

Hafize SAV¹, Nedret KOÇ², Mustafa Altay ATALAY², Orhan YILDIZ³, Gonca DEMİR²¹ Department of Mycology, Faculty of Cerrahpasa Medicine, University of Istanbul, Istanbul, Turkey² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Erciyes, Kayseri, Turkey³ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Erciyes, Kayseri, Turkey

Introduction: *Aspergillus* infections are commonly encountered in immunocompromised patients and produce a life-threatening clinical picture. The clinical symptoms and findings may be nonspecific in these patients. The clinicians following the patients may not often find adequate time to wait for culture results or the general condition of the patient does not allow such a delay, resulting in the preference of prophylactic measures rather than specific, targeted therapies and the use of a preemptive approach based on serological and molecular documentation. The aim of the present study was to evaluate invasive aspergillosis (IA) culture, galactomannan (GM) test, 1,3 β -D glucan (BG), and real time polymerase chain reaction (rtPCR).

Materials and Methods: A total of 79 patients, consisting of 42 patients with IA and 37 controls, were analyzed according to the criteria of European Organization for the Research and Treatment of Cancer and Mycoses Study Group (EORTC/MSG). Based on these criteria, three were classified as having proven IA, 10 as probable IA, and 29 as possible IA. The clinical specimens were evaluated with culture and direct microscopic examination. The fungal antigen in serum samples was studied using the GM test (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad) and BG test (Fungitell, Associates of Cape Cod, USA). The rtPCR (Light Cycler-Roche, USA) test was performed to extract deoxyribonucleic acid (DNA) from serum samples.

Results: Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were respectively calculated as 78%, 78%, 80% and 76% for IA diagnosis for BG test (cut-off 80 pg/mL). BG value was detected as 80 pg/mL and over in at least one of the samples of 8 patients without IA. GM test was studied from the same samples and sensitivity, specificity, PPV and NPV were (cut-off 0.5 ng/mL) 47%, 89%, 83% and 60%, respectively. Positivity was detected in the samples of five control patients with GM test. A molecular method, rtPCR, was studied from these samples as well as serological methods and sensitivity, specificity, PPV and NPV of the test were 30%, 86%, 72% and 52%, respectively. Positivity was detected in serum samples of five control patients with rtPCR.

Conclusion: As a result, sensitivity of BG and specificity of GM were detected as the highest ones of all BG, GM, rtPCR tests in this study. For IA diagnosis, it is emphasized that these tests should be evaluated with clinical and radiological findings to increase the significance of the non-cultural methods.

Key Works: Galactomannan; Real-time polymerase chain reaction; Aspergillosis

GİRİŞ

İnvaziv mantar infeksiyonu (İMİ) hematolojik malignitesi olan immünsüpresif pek çok hastada tespit edilen en önemli mortalite ve morbidite sebebidir^[1]. Bu hastaların tedavisinde uygulanan hematopoyetik kök hücre nakli, sitotoksik kemoterapi ajanları ve kortikosteroid, fırsatçı mantar infeksiyonlarının sık görülmesine yol açmaktadır^[2]. İMİ'de en sık etken *Candida* türleri iken, son yıllarda *Aspergillus* türlerinin görülme sıklığının da arttığı bildirilmiştir^[3]. *Aspergillus* türleri içinde en sık izole edilen tür ise *Aspergillus fumigatus*'tur. Kültürde üreyen *Aspergillus* türlerinin tanımlanması antifungal kullanımında amfoterisin B'ye doğal dirençli *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus nidulans* gibi suşlar için son derece önemlidir^[4].

İnvaziv aspergilloz (İA) infeksiyonlarında tanı genelde klinik bulgularla laboratuvar sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine dayanır. Hematolojik malignitesi olan hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması kültür sonuçları çıkana kadar geçen süre tedavide önemli gecikmelere yol açmaktadır. Kültür dışı tanı testleri geleneksel yaklaşımlara yardımcı olabilir. Ayrıca, geliştirilen testler kritik hastalarda tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Erken ve doğru tanı, antifungal ilaçların gereksiz kullanımını azaltmak için de son derece önemlidir. Bu nedenle çoğu araştırmacı çabaları serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve standardizasyonu üzerine odaklanmıştır.

Bu çalışmada; İA infeksiyonlarında kültür, galaktomannan (GM), 1,3 β -D glukoz (BG) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rtPCR)

yöntemlerinin tanı potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Nisan 2009-Eylül 2010 tarihleri arasında hastanemizde takip edilen İA infeksiyonu şüpheli hastaların klinik örnekleri etik kurul kararlarına uygun çerçevede çalışıldı. İA tanısında Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu ve Mikoz Çalışma Grubu (EORTC/MSG) tarafından ortaya konulan tanımlama kriterleri GM ve BG değerlerinden bağımsız olarak kullanıldı ve hastalar kesin, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı İA olarak sınıflandırıldı^[5]. Kontrol hastaları ise nötropenik ya da steroid tedavisi alan, klinik ya da radyolojik bulgusu olmayan İA tanısı almayan hasta grubundan seçildi^[6].

Mikrobiyolojik Tanı

Hastalardan alınan balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), plevral sıvı ve akciğer biyopsi örnekleri değerlendirildi. Bu örneklerden BAL, balgam ve akciğer biyopsi örnekleri %10'luk KOH ile muamele edilip lam-lamel arasında mantar elemanı olup olmadığı direkt mikroskopiyile incelendi. Üreyen küflerin tanımlanmasında geleneksel yöntemler kullanıldı; koloni rengi ve morfolojisi, üreme hızı, mikroskopik özellikleri (konidili başların biçimi ve rengi, sterigmata sayısı, vezikül şekli, konidyoforların yapısı, hülle hücrelerinin varlığı ve şekli)^[7].

Galaktomannan ve Beta-Glukan Antijenlerinin Araştırılması

On günden fazla nötropenisi (< 500 nötrofil) devam eden hastaların serum örneğinden haftada iki kez GM testi (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad, Fransa) çalışıldı. Platelia *Aspergillus* kiti serumda GM antijenini saptayabilen birinci basamak immünoenzimatik sandviç mikro kaplama yöntemidir. GM testinde tavşan monoklonal antikorlar ELISA çukurlarında kaplanmış olarak ve peroksidazla işaretlenmiş olarak bulunur. Test üretici firma önerilerine göre, 300 µL serum örneği kullanılarak uygulandı. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda optik okuyucuda (EL X 808, BioTek, ABD) okundu. Kontrol serumları kullanılarak, indeks değeri hesaplandı ve GM serum değeri ≥ 0.5 ng/mL olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

Aynı örneklerden bir başka serolojik test yöntemi olan BG testi haftada iki defa (Fungitell, Associates of Cape Cod, ABD) çalışıldı. Fungitell test kiti (1 \rightarrow 3)- β -D-Glukan seviyesini ölçen bir testtir. Test kiti içinde Limulus Amebocyte Lysate (LAL) pathway'ın modifiye edilmiş formu bulunmaktadır. Serum örneklerinden 5'er µL kullanıldı. Sonuçlar, inkübatörlü ELISA okuyucusunda (EL X 808, BioTek, ABD) 37°C'de 405 nm dalga boyunda birer dakikalık aralıklarla 40 dakika okunarak elde edildi. Kullanılan kitin saptama aralığı 31.25-500 pg/mL idi. Değerlendirmede, < 60 pg/mL negatif, ≥ 80 pg/mL pozitif, 60-79 pg/mL arası şüpheli sonuç olarak yorumlandı.

Moleküler Tanı

Aynı serum örneklerinden nükleik asit eldesi için Heliosis DNA izolasyon sistemi (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanıldı. Elde edilen DNA'lar *A. fumigatus* için seçilen hedefleri çoğaltmak üzere rtPCR (Light Cycler-Roche, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Reaksiyon karışımı için "LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Kit" ve özgül primer-prob karışımı (Tib Molbiol, Almanya) kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer-prob karışımı 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG, 5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG primer ve 5'-GTTCCCCC-CACAGCCAGTGAAGGC-FL, 5'-LC640-TGAGGT-TCCCCAGAAGGAAAGGGTCCAGC-PH problemleri karıştırılarak oluşturuldu. Her bir reaksiyon için kapillere (Light Cycler 1.5/2.0) 15 µL karışım transfer edildi. Bu karışıma 5 µL örnek ilave edilerek final konsantrasyonunun 20 µL olması sağlandı. Denatürasyon döngüsü 45 kez; 95°C'de 10 saniye, 58°C'de 15 saniye ve 72°C'de 18 saniye olacak şekilde tekrarlandı. Bu basamağı 40°C'den 95°C'ye erime eğrisi analizi izledi^[8].

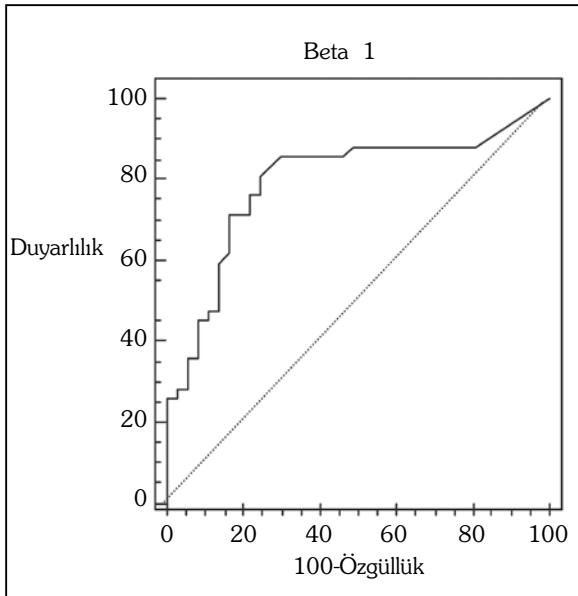
İstatistiksel Analiz

Nitel veriler %100 olarak tanımlandı. Tanı kriteri için duyarlılık ve özgüllük hesaplandı. Testler arasındaki istatistiksel farklılığa McNemar testi kullanılarak bakıldı. Uygulanan tanı testlerinin performansını belirlemek amacıyla ROC (receiver operating characteristic) eğrisi kullanıldı.

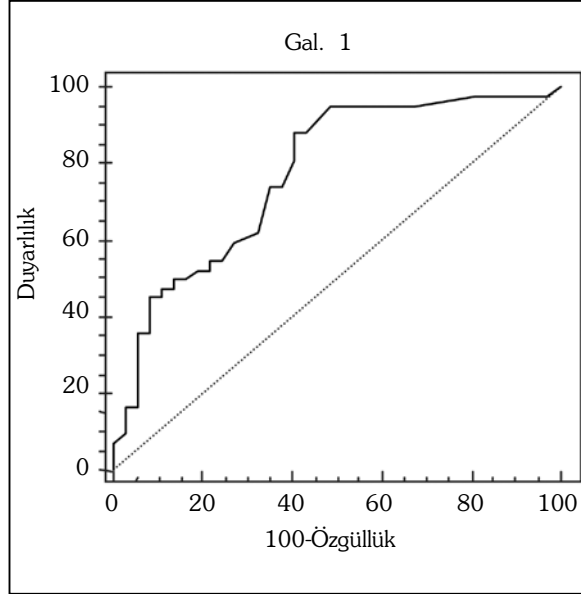
BULGULAR

Bu çalışmada 42 İA ve 37 kontrol hastası içerdiği 79 hasta analiz edildi. EORTC/MSG kriterlerine göre hastaların üçü kesin İA, 10'u

yüksek olasılıklı İA, 29'u düşük olasılıklı İA olarak sınıflandırıldı^[5]. İA tanısı olan hasta grubunun yaş ortalaması 45 yıl, kontrol hastalarının yaş ortalaması ise 57 yıl olarak hesaplandı. İA hasta grubundan 15 hasta akut miyeloid lösemi (AML), dört hasta akut lenfoblastik lösemi (ALL), beş hasta lenfoma, 16 hasta solid organ kanseri, iki hasta multipl miyeloma alt hastalığına sahipti. Ayrıca bu hastalardan 26'sı kemoterapi, altısı kemik iliği transplantasyonu, onu steroid tedavisi almaktaydı. Hastalardan alınan BAL, balgam ve doku örneklerinin kültürleri yapıldı. Kesin hastaların üçünün (beyin, akciğer ve burun sinüs) doku kültüründe, yüksek olasılıklı hastalardan altısının BAL, dördünün (üç ardışık) balgam örneğinde *A. fumigatus* üremesi saptandı. Kesin hastalardan elde edilen bütün serum örneklerinin ardışık GM değeri ≥ 0.5 ng/mL, BG değeri ise ≥ 80 pg/mL olarak saptandı. Yüksek olasılıklı hastaların radyolojik bulgularının yanı sıra beş hastada en az bir serum örneğinde GM ≥ 0.5 ng/mL ve altı hastada BG değeri ≥ 80 pg/mL olarak bulundu. Düşük olasılıklı hastalardan 14 hastanın en az bir serum örneğinde GM ≥ 0.5 ng/mL ve 23 hastanın BG değeri ≥ 80 pg/mL olarak bulundu. BG testinin ROC eğrisi Şekil 1'de, GM testinin ROC eğrisi Şekil 2'de sunulmuştur. Bu hastaların nötropenik dönemlerinde en az bir serum örneğinde *A. fu-*



Şekil 1. Beta-Glukan ROC (receiver operating characteristic) eğrisi.



Şekil 2. Galaktomannan ROC (receiver operating characteristic) eğrisi.

migatus rtPCR çalışıldı. Kesin hastalardan ikisinin, yüksek olasılıklı hastalardan beşinin, düşük olasılıklı hastalardan altısının serumunda pozitiflik saptandı. İA tanısında GM, BG, *A. fumigatus* rtPCR testlerinin duyarlılıkları, özgüllükleri, PPD ve NPD değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. İA tanısı açısından klinik ve radyolojik bir bulguya sahip olmayan kontrol hastalarının sekizinde BG serum değerleri (cut-off 80 pg/mL) pozitif olarak saptandı. Bu hastalarda yanlış pozitiflik için hemodiyaliz, kan ürünleri ve beta-laktam antibiyotik kullanımının olup olmadığı analiz edildi. İki hastada piperasilin-tazobaktam kullanımı, bir hastanın diyaliz hastası, bir hastanın ise trombosit süspansiyonu aldığı tespit edildi. Diğer dört hastanın yanlış pozitifliği herhangi bir nedene bağlanamadı. Bu dört hastanın ikinci serum örneğinde çalışılan BG testinin değerleri "cut-off" 80 pg/mL'nin altında saptandı.

Kontrol hastalarından beş hastanın serum GM (cut-off 0.5 ng/mL) değerlerinde pozitiflik saptandı. Yanlış pozitiflik için subklinik infeksiyon, beta-laktam antibiyotik kullanımı ve diğer nedenler araştırıldı. Bu hastalardaki GM test sonuçlarının yüksek saptanması sefalosporin tedavisi ve subklinik infeksiyona bağlandı.

A. fumigatus rtPCR çalışılan kontrol serumlarda beş pozitiflik saptandı. Çalışmada kullanılan örnekler

Tablo 1. Sistemik aspergilloz tanısında çalışılan testlere ait duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD değerleri

Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
GM	47	89	83	60
BG	78	78	80	76
RtPCR	30	86	72	52

GM: Galaktomannan, BG: Beta-glukan, RtPCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

steril şartlarda alınan serum örnekleri olduğu için yanlış pozitiflikler ortam kontaminasyonuna bağlandı.

TARTIŞMA

Mantar infeksiyonlarının tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür vazgeçilmez konvansiyonel yöntemlerdir. Bu yöntemler için alınacak örnekler invaziv işlem gerektiren biyopsi ve steril vücut sıvılarıdır. Ancak hastaların hematolojik problemleriyle birlikte koagülasyon bozukluklarının olması invaziv işlemleri zorlaştırır. Bu hastalar balgam gibi invaziv işlem gerektirmeyen örnekleri bile verememektedir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı az olmakla birlikte hızlı ve ucuz olması en önemli avantajıdır. Mantar elemanlarının bazı hasta örneklerinde görülmesi patognomonik olup direkt tanıyı koydurabilir^[9]. Son zamanlarda konvansiyonel yöntemlerle birlikte daha kolay, daha hızlı ve erken sonuç verebilecek serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Kültür dışındaki bu tanı yöntemlerinden en çok kullanılan “Food and Drug Administration (FDA)” tarafından 2003 yılında onaylanmış olan, *Aspergillus* türüne özgül GM antijeninin ELISA ile gösterildiği, Platelia *Aspergillus* (Bio-Rad, Marnes La-Coquette, Fransa) testidir^[10].

GM antijen varlığı serum, BAL, plevral sıvı, beyin omurilik sıvısı ve akciğer dokusu gibi pek çok örnek kullanılarak araştırılabilir^[11,12]. Prospektif bir çalışmada GM testinin (cut-off 0.5 ng/mL) duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla %33.3 ve %98.6 olarak bildirilmiştir^[13]. Benzer bir çalışmada Tanase ve arkadaşları serum GM testinin (cut-off 0.5 ng/mL) duyarlılığını ve özgüllüğünü, pozitif prediktif değerini (PPD) ve negatif prediktif değerini (NPD) sırasıyla %85, %91, %46 ve %99 olarak bildirmişlerdir^[14]. Bir meta-analiz çalışmasında GM testinin (“cut-off” 0.5 ng/mL) duyarlılığı %78,

özgüllüğü %81 olarak bulunmuştur. Farklı “cut-off” değerleri alındığında duyarlılığın arttığı, özgüllüğün ise azaldığı tespit edilmiştir^[15]. Bu çalışmada 42 İA ve 37 kontrol hastasının serum örneğinden GM testi çalışıldı ve testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD ve NPD değerleri sırasıyla (“cut-off” 0.5 ng/mL) %47, %89, %83 ve %60 olarak belirlendi.

Testin yalancı pozitifliği de önemli sorun teşkil etmektedir. Bu sorun daha çok subklinik infeksiyon, gastrointestinal bölgede kolonizasyon, antifungal tedaviler ve özellikle yenidoğan ve süt çocuklarındaki beslenmeyle ilişkilendirilmektedir^[16]. Bununla birlikte İMİ düşünülen hastaların beta-laktam antibiyotik kullanımı ve testte kullanılan sıçan monoklonal EB-A2 antikoruyla çeşitli küflerin çapraz reaksiyona girmesi yalancı pozitifliklere neden olmaktadır^[17,18]. Yapılan bu çalışmada, kontrol hastalarının serum örneklerinden çalışılan GM testinde beş hastanın serumunda (cut-off 0.5 ng/mL) pozitiflik saptandı. Bu hastalar antifungal tedavi almıyordu fakat ikisi sefalosporin tedavisi almaktaydı. Diğer üç hastanın GM pozitif sonuçlarının bakteriyel infeksiyonla ilişkili olabileceği düşünüldü.

Diğer bir serolojik test ise *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki küf ve maya mantarlarının hücre duvarında bulunan komponenti saptayan BG testidir^[19]. BG testinin temeli denizde yaşayan Horseshoe crab olarak bilinen bir canlıdan izole edilen faktör G ile beta-glukanın kimyasal etkileşimine dayanmaktadır^[20]. BG testi ile yapılan bir meta-analiz çalışmasında 594 kesin ya da yüksek olasılıklı hastanın serumunda BG çalışılmış ve “cut-off” 80 pg/mL alındığında testin duyarlılığı %76.8, özgüllüğü %85.3 olarak bildirilmiştir^[21]. Akciğer transplant hastalarında yapılan bir çalışmada ise 14 kesin ve yüksek olasılıklı hastanın serumlarında BG testinin “cut-off” değeri 60 pg/mL alındığında duyarlılık %64, özgüllük %9, PPD

%14, NPD %50 olarak bildirilmiştir^[22]. Odabaşı ve arkadaşları İMİ olan 30 hastanın serum örneklerinden çalışılan BG testini değerlendirerek her hastanın en az bir serum örneğinde klinik tanıdan 10 gün önce testin pozitifleştiğini bildirmişlerdir^[23]. Ayrıca testin NPD'si %100, özgüllüğü tek örnekte %96, ardışık örnekte ise %100 olarak saptanmıştır. Lamothe ve arkadaşları üçüncü Avrupa Lösemi enfeksiyonları konferansında 414 İMİ'li (215 kesin ya da yüksek olasılıklı) hastanın ardışık serumunda çalıştıkları BG testinin duyarlılık ve özgüllüğünü, sırasıyla %49 ve %98 olarak bildirmişlerdir^[24]. Testin duyarlılığın yükseltmek için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik bulgularla birleştirilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir. Metan ve arkadaşları invaziv pulmoner aspergilloz (İPA) olarak tanımladıkları 50 (kesin + yüksek olasılıklı) hastada BG testinin ("cut-off" 80 pg/mL) duyarlılık, özgüllük ve PPD, NPD değerlerini sırasıyla %66, %75.6, %63.4 ve %77.6 olarak bildirmişlerdir^[25]. Bu çalışmada İA olarak tanımlanan 42 hastanın serum örneğinden çalışılan BG testinde ("cut-off" 80 pg/mL) duyarlılık, özgüllük ve PPD, NPD değerleri sırasıyla %78, %78, %80 ve %76 olarak bulunmuştur. Testin "cut-off" değeri yükseldikçe duyarlılık oranı düşerken, özgüllük oranının yükseldiği tespit edildi. Yapılan pek çok çalışmada duyarlılığın ve özgüllüğün yüksek olmasından dolayı 2008 EORTC sınıflamasında mikrobiyolojik kriterler arasında yer almakta olan BG testinin sistemik mantar enfeksiyonu olan hastalarda kullanılması gerektiği bildirilmiştir^[5]. Testin dezavantajı beta-glukanın belli bir mantar türüne özgül olmamasıdır^[19]. BG testinde karşılaşılan yalancı pozitiflik durumları mukozit, bakteriyel kolonizasyon, antibiyotik kullanımı eritrosit ve trombosit filtre kan ürünleri, kateter yoluyla tüplere kan toplamaya ilişkilendirilmiştir^[16]. Metan ve arkadaşları İA'lı piperasilin-tazobaktam kullanan hastalarda yaptıkları çalışmada BG testi değerlerinin yüksekliğinin piperasilin-tazobaktam kullanımıyla ilgisi olmadığını bildirmişlerdir^[26]. Diyaliz hastalarında kullanılan selüler membranların serum BG seviyelerini yükselttiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır^[27]. Bu çalışmada kontrol hastalarında BG değeri yüksek olan iki hastanın piperasilin-tazobaktam kullanımı olduğu, bir hastanın diyaliz hastası, bir hastanın ise trombosit süspansiyonu aldığı tespit edildi. Diğer dört hastanın BG testinin yanlış pozitifliği herhangi bir sebeple

ilişkilendirilemedi. Bu dört hastanın ikinci serum örneğinde BG değerleri normal sınırlarda saptandı.

İA hastalıklarının tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerin gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin giderek artan oranlarda uygulanması, bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adımdır. Mantar enfeksiyonlarının moleküler tanısı, ya doğrudan hasta örneği ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilir. Moleküler yöntemlerden rtPCR serum, steril vücut sıvıları ve dokuda da çalışılması kabul gören moleküler yöntemlerdendir^[13,28]. Fakat henüz standardize edilememiştir. Moleküler tanılal yöntemlerin standardize edilmesi ve rutin uygulama alanına sokulabilmesi için çok merkezli çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Klingspor ve arkadaşları İMİ düşünülen hastaların serum ve farklı örneklerinden çalışılan rtPCR testinin konvansiyonel yöntemlerle doğrulanma oranını %50 olarak bildirmişlerdir^[29]. Kami ve arkadaşları 33 İPA'lı hastanın serumunda çalışılan PCR, GM, BG duyarlılığını sırasıyla %79, %58, %67 olarak bildirmişlerdir^[30]. Challier ve arkadaşları 41 İA'lı hastada yaptıkları çalışmada hastaların %84.6'sında *A. fumigatus* PCR pozitif iken %76.9'unda GM testinin pozitif olduğunu rapor etmişlerdir^[31]. Aynı çalışmada PCR'nin GM testine göre daha spesifik olduğunu ve her iki testin kombinasyonunun tanıyı kolaylaştırdığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada 42 İA ve 37 kontrol hastasının serumunda rtPCR çalışıldı. Testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD ve NPD'si sırasıyla %30, %86, %72 ve %52 olarak hesaplandı. rtPCR testinin serolojik yöntemlere göre üstünlüğü saptanmadı. Moleküler tanılal testlerde de yalancı pozitifliğe dikkat etmek gerekir. Yalancı pozitiflik sıklıkla klinik örneğin kontaminasyonundan kaynaklanabilir. Mantar enfeksiyonlarının tanısında önemli bir hasta örneği olan solunum yolu örnekleri ne yazık ki birçok mantar türü ve bakterilerle karışık olan örneklerdir. Dolayısıyla mantar nükleik asitlerini yıkabilecek DNaz ve RNaz'ın bol olabileceği bu örneklerden doğru amplifikasyon kolay değildir^[13]. Bundan dolayı rtPCR testini steril vücut sıvılarında kullanmak gerekir^[28]. Bu çalışmada hastaların serum örnekleri çalışıldı ve beş kontrol hastasının serumunda

pozitiflik saptandı, bu çalışmada saptanan yanlış pozitiflikler örnek kontaminasyonuna değil ortam kontaminasyonuna bağlandı.

Sonuc olarak; İA hastalarında tanıda BG, GM, rtPCR testlerinden BG testinin duyarlılığının, GM testinin ise özgüllüğünün diğer testlere nazaran yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte İA enfeksiyonunun tanısı esas olarak klinik, radyoloji, mikroskopi, kültür, patojene özgü testler (antijen ve antikor testleri gibi) ve moleküler yöntemlerin birlikte yorumlanmasıyla yapılmalıdır. Gelecek dönemlerde serolojik ve moleküler yöntemler ön plana çıkacaktır. Bu testler daha kolay, daha hızlı ve daha standardize olduğunda, İMİ'lerin erken tanısı ve tedavi şansı artacaktır.

KAYNAKLAR

1. 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;50:1091-100.
2. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:909-17.
3. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal at university hospital. *J Infect* 1996;33:23-32.
4. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:497-502.
5. 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;46:1813-21.
6. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:3223-8.
7. Richardson MD. Aspergillosis. In: a Merz WG, Hay RJ (eds). *Topley Wilson's Microbiology & Microbial Infections*. 10th USA: Edward Arnold ASM Press, 2005:687-92.
8. Aydoğan S, Kuştimur S, Kalkancı A. İnvazif aspergilloz oluşturulan sıçanlarda glukan ve galaktomannan testleri ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:441-52.
9. Ener B. Fungal enfeksiyonlarda tanı. *ANKEM* 2011;25:156-61.
10. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004;4:349-57.
11. Ağca H, Ener B, Yılmaz E, Ursavaş A, Kazak E, Özkocaman V, et al. Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients. *Mycoses* 2014;57:169-75.
12. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis* 2004;39:1467-74.
13. Buchheidt Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Schwerdtfeger R, Cornely OA, et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004;125:196-202.
14. Tanase AD, Colita A, Marculescu A, Berteanu C, Streinu Cercel A, Stoica M, et al. Using the galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Rom J Morphol Embryol* 2012;53:379-82.
15. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;8:CD007394
16. Öz Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:289-98.
17. Aubry A, Porcher R, Botter J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorder. *J Clin Microbiol* 2006;44:389-94.
18. Kappe R, Schulze -Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex Aspergillus antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1993;31:2489-90.
19. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, et al. Plasma (1-3)beta d- glukan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:3115-8.
20. Seen L, Robinson JO, Schmitz S, et al (1→3)-β-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 2008;46:878-85.

21. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750-70.
22. Alexander BD, Smith PB, Davis RD, Perfect JR, Reller LB. The (1,3)- β -D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2010;48:3-8.
23. Odabaşı Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta D glukun as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation cut off development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004;39:199-205.
24. Lamoth F, Cruciana M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: A systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 2012;54:633-43.
25. Metan G, Koç AN, Atalay A. What should be the optimal cut-off of serum 1,3- β -D-glucan for the detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies? *Scand J Infect Dis* 2012;44:330-6.
26. Metan G, Ağkuş C, Buldu H, Koç AN. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for *Aspergillus galactomannan* and 1,3- β -D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection* 2010;38:217-21.
27. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1-->3)- β -D-glucan level. *Kidney Int* 2001;60:319-323.
28. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1953-60.
29. Klingspor L, Jalala S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:745-53.
30. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1504-1512
31. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:844-6.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Uzm. Dr. Hafize SAV

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Mikoloji Bilim Dalı

Cerrahpaşa, İstanbul-Türkiye

E-posta: hafize.sav@hotmail.com