

İNVAZİF ASPERGİLLOZ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA GLUKAN VE GALAKTOMANNAN TESTLERİ İLE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI*

COMPARISON OF GLUCAN AND GALACTOMANNAN TESTS WITH REAL-TIME PCR FOR DIAGNOSIS OF INVASIVE ASPERGILLOSIS IN A NEUTROPENIC RAT MODEL

Sibel AYDOĞAN¹, Semra KUŞTİMUR², Ayşe KALKANCI²

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (drsbay@mynet.com)

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Günümüzde, *Aspergillus* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonların görülme sıklığı ve mortalitesi giderek artmakta olup, özellikle immün sistemi baskılanmış ve nötropenik hastalarda invazif aspergilloz (IA) başlıca ölüm sebeplerinden biridir. Bu nedenle, erken ve doğru tanı IA'lı hastalar için hayat kurtarıcı olabilir. Bu çalışmada, deneysel olarak akciğer aspergillozu geliştirilen nötropenik sıçan modelinde, kültür, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RtPCR), galaktomannan (GM) ve glukan (GC) test sonuçlarının karşılaştırılması ve erken tanıya olan katkılarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilen çalışmada, dişi Wistar albino sıçanları, sağlıklı kontrol grubu (n= 6), nötropeni kontrol grubu (n= 10) ve akciğer aspergilloz grubu (n= 35) olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Sıçanlarda nötropeni, 5-florourasil kullanılarak oluşturulmuş ve *Aspergillus fumigatus* konidyumları burundan inokülasyon yoluyla verilmiştir. Enfeksiyonun yedinci gününde hayvanların kan, bronkoalveolar lavaj (BAL) ve akciğer doku örnekleri alınmış ve kontrol grupları ile aspergilloz grubunun enfeksiyon göstergeleri karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda bütün test sonuçları (kültür, PCR, GM ve GC testleri) negatif bulunmuştur. Aspergilloz grubunda, deney sonunda sağ kalan 22 denekten alınan akciğer doku örneklerinin tümünün patolojik preparatlarında hifler görülmüş; 20 (%91)'sinin kültüründe *Aspergillus* kolonileri üretilmiştir. Aspergilloz grubundan alınan 12 BAL örneğinin 7 (%58.3)'sinde, 19 kan örneğinin 7 (%36.8)'sinde ve 22 akciğer doku örneğinin 4 (%18)'ünde *Aspergillus* DNA'sı RtPCR ile gösterilmiştir. Bu grupta GM antijeni, ticari bir kit (Platelia® *Aspergillus* ELISA; BioRad, Fransa) kullanılarak 20 serum örneğinin 7 (%35)'sinde; GC antijeni ise ticari, kantitatif bir kit kullanılarak (Fungitell™; Cape Cod, ABD) 22 serum örneğinin 11 (%50)'inde ve 17 BAL örneğinin 9 (%52.9)'unda gösterilmiştir. Çalışmamızda,

* Bu çalışma, ilk yazarın Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yaptığı tıpta uzmanlık tez çalışması olup, "International Union of Microbiological Societies (IUMS), XII. International Congress of Mycology" (5-8 Ağustos 2008, İstanbul) toplantısında sunulmuştur.

kültür referans yöntem olarak alındığında, BAL örneklerine uygulanan PCR testinin diğer yöntemlere göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu (BAL-PCR %58.3; kan-PCR %41.2; doku-PCR %20; serum GM %38.9; serum GC %55; BAL-GC %52.9) ve serumda GC aranmasının GM aranmasından daha değerli olduğu (serum-GM için duyarlılık %38.9, serum-GC için duyarlılık %55; her ikisi için özgüllük %100) kanısına varılmıştır. Doğrulanmış olguların BAL örneklerinin, kan örneklerinden daha doğru sonuç verdiği görülmüştür. Buna karşın, histopatolojik olarak doğrulanmış olguların bile BAL örneklerinin %41.7'sinde PCR ile, serum örneklerinin %50'sinde GC testi ile ve yine serum örneklerinin %65'inde GM testi ile negatif sonuç alınmıştır. Sonuç olarak, İA patogenezinin tam olarak anlaşılamamış olması kültür dışı tanısal testlerin performansını etkilediğinden, gelecekte yapılacak çalışmalar, kültür dışı farklı tanı yöntemlerinin performanslarının ve birlikte kullanımlarının değerlendirilmesi konusunda olmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Aspergilloz, sıçan, galaktomannan, glukan, polimeraz zincir reaksiyonu.*

ABSTRACT

The incidence of aspergillosis which has high mortality rates, has increased gradually. Since invasive aspergillosis (IA) is one of the leading causes of death in immunocompromized and neutropenic patients, early and accurate diagnosis of IA is of crucial importance. The aims of this study were to compare the results of culture, real-time polymerase chain reaction (RtPCR), galactomannan (GM) antigen and glucan (GC) antigen detection tests and to evaluate their performances in view of rapid and accurate diagnosis of IA in neutropenic rat model. Female Wistar albino rats were included in the study with the consent of Animal Searching Ethical Committee and classified into three groups as healthy controls (n= 6), neutropenic controls (n= 10) and pulmonary aspergillosis (n= 35) groups. Rats were immunosuppressed with 5-fluorouracil and then *Aspergillus fumigatus* conidia were inoculated intranasally. On the seventh day of the infection, blood, bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue samples were collected from the animals, and control and aspergillosis groups were compared in terms of infection markers. All of the tests (culture, RtPCR, GM and BG tests) were found to be negative in controls. At the end of the study 22 rats in aspergillosis group survived. Lung tissue samples from those 22 animals were all positive for the presence of hypha on pathological preparations, while 20 (91%) yielded *Aspergillus* colonies on the cultures. *Aspergillus* DNA was detected in 7 of the 12 BAL samples (58.3%), 7 of 19 blood samples (36.8%) and 4 of 22 lung tissue samples (18%) using RtPCR method. GM antigen was detected in 7 of 20 serum samples (35%) with a commercial kit (Platelia® *Aspergillus* ELISA, BioRad, France). Quantitative detection of beta-glucan levels were investigated by using a commercial kit (Fungitell™, Cape Cod, USA) in serum and BAL samples and positive results were obtained in 11 of 22 serum (50%) and 9 of 17 BAL (52.9%) samples. In this study it was demonstrated that PCR performed in BAL samples is the most sensitive method compared to the others, for the diagnosis of IA in the rat model. The sensitivity rates were as follows when culture method accepted as the gold standard: 58.3% for BAL-PCR, 41.2% for blood-PCR, 20% for tissue-PCR, 38.9% for serum GM, 55% for serum GC and 52.9% for BAL-GC. It was also concluded that detection of GC activity in serum was more sensitive than GM detection in serum (sensitivity of GM was %38.9, sensitivity of GC was %55, while specificities were 100% for both of the tests), for laboratory diagnosis of IA. The BAL samples were evaluated as the most valuable clinical samples to screen the suspected patients. However, even in proven cases, 41.7% of BAL samples were found negative with PCR, 50% of serum samples were found negative with GC test, and 65% of serum samples were found negative with GM test. Since the pathogenesis of IA has not been completely clarified, the performance of non-culture based diagnostic tests exhibit great variability. Future clinical studies are required to compare the performance of different non-culture based diagnostic methods and the optimal combination of these tests for the most accurate laboratory diagnosis of IA.

Key words: *Aspergillosis, rat, galactomannan, glucan, polymerase chain reaction.*

GİRİŞ

İnvazif mikozlar son yıllarda önemli sağlık problemleri içinde ön plana çıkmaktadır. Bu hastalıkların görülme sıklığındaki artış, risk altındaki hastaların artmasına bağlanmıştır. İnvazif mikoz açısından risk grubunu AIDS'li hastalar, solid organ ya da kök hücre nakli alıcıları, hematolojik maligniteli hastalar ve diğer bağışık engelli bireyler oluşturmaktadır¹⁻³. Yoğun bakım ünitelerinde girişimsel izlem yöntemlerinin ve agresif tedavi protokollerinin kullanımının artması ile risk altındaki hastaların yaşam sürelerinde de uzama olmuştur.

Küf enfeksiyonlarına sebep olan türler içinde en yaygını *Aspergillus* türleridir^{2,3}. İnvazif aspergilloz (IA), bağışıklık yetmezliği olan hastalarda gelişen ve tanı konup tedavi başlansa bile ölümle sonuçlanabilen, fırsatçı bir enfeksiyondur⁴. Aspergilloz gelişen konak sayısındaki artış, sorumlu patojenleri daha hızlı şekilde tanımlayacak tanı testlerine ihtiyaç doğurmuştur. Steril doku biyopsi örneklerinde üreme ve histopatolojik değerlendirme, fungal invazyonu göstermede "altın standart" yöntem olarak kabul edilmektedir. Kan kültürü örneklerinde *Aspergillus* türlerinin üretilebilmeleri olguların yarısında mümkün olmaktadır. Bu nedenle özellikle bu grup hastalarda invazif olmayan tanısal yöntemler, fungal enfeksiyonların erken ve hızlı tanısı için çok önemlidir^{3,5-9}. Kültür dışındaki bu tanı yöntemlerinden en çok kullanılan ve FDA (Food and Drug Administration, USA) tarafından 2003 yılında onaylanmış olan, *Aspergillus* cinsine özgül galaktomannan (GM) antijeninin enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ile gösterildiği, Platelia Aspergillus (Bio-Rad, Marnes La-Coquette, Fransa) testidir. GM antijen testinin pozitifliği, "European Organization for Research and Treatment of Cancer-Mycology Study Group (EORTC-MSG)" tarafından geliştirilen invazif fungal enfeksiyon tanı kriterleri içine alınmıştır¹⁰. Tanı amaçlı kullanılan bir diğer yöntem ise glukan (GC) testidir. Zigomiçetler hariç bütün mantarların hücre duvarında bulunan 1,3 beta-glukan, immünojenik bir molekül olmamasına rağmen pan-fungal bir tarama testi olarak (*Cryptococcus* cinsi hariç) tanıda kullanılmaktadır. Ancak, örneklerin alınmasından, testin yapılmasına ve sonuçların okunmasına kadar olan tüm aşamalarda kolaylıkla kontaminasyon oluşabildiği için, rutin tanıda kullanımı GM kadar yaygın değildir.

Bütün enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, mantar enfeksiyonlarında da moleküler yöntemler tanı için yeni olanaklar sunmaktadır. Ancak henüz standardize edilmiş ticari bir sistem bulunmaması nedeniyle nükleik asit testlerinin tekrarlanabilirlik oranı düşüktür. Bu nedenle EORTC-MSG tanı kriterleri içine alınmamıştır. Moleküler tanıda genellikle ribozomal gen bölgeleri tercih edilmektedir¹¹. Yapılan çalışmalarda moleküler testlerin birden fazla ardışık örnekte, haftada iki kez yapılması gerektiği vurgulanmıştır¹².

Bu çalışmada, deneysel hayvan modelinde İA enfeksiyonunun tanısında antijen testleri (GM ve GC), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve lizis santrifüjasyon (LS) kültür sisteminin erken tanıya olan katkılarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İnokulum Hazırlanması, Hayvan Modelinde Akciğer Aspergillozunun Oluşturulması, Örneklerin Alınması

Aspergillus fumigatus ATCC 204305 standart suşu Sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarında 27°C'de 7 gün üretildikten sonra plak yüzeyleri steril fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ile iki kez yıkandı ve elde edilen konidyum süspansiyonları spektrofotometrede sayıldı. Süspansiyona %0.1'lik Tween 80 eklenip vorteksle karıştırıldı¹³.

Deney hayvanı olarak 160-180 g ağırlığında, dişi, Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Deney koşulları, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinde, etik kurul yönergesine uygun şekilde tamamlandı. Denekler, sağlıklı kontrol grubu (6 denek), nötropeni kontrol grubu (10 denek), akciğer aspergilloz grubu (35 denek) olacak şekilde üç gruba ayrıldı.

Hayvanlarda nötropeni oluşturulması için 5-florourasil 200 mg/kg dozunda deri altına verildi¹⁴. Nötropeni oluşturulmasını takip eden beşinci günde, aspergilloz oluşturulması için 1×10^8 konidyum/ml¹⁵ *A.fumigatus* konidyası içeren süspansiyon, tek kullanımlık oksijen maskesinin nebulizatör haznesine yerleştirildi ve beş dakika boyunca deneklerin solunum yolundan verildi¹⁶. Aynı gün bakteriyel süperenfeksiyon gelişimini önlemek için kas içinden 40 mg/kg ampicilin, 6 mg/kg gentamisin enjeksiyonu yapıldı. Nötropeni kontrolü için deney sonunda alınan periferik kan örneklerinde nötrofil arandı.

Enfeksiyonun 7. gününde kas içinden verilen 100 mg/kg ketamin HCl anestezisi altında, deneklerden kalp kanı, akciğer doku örnekleri ve bronkoalveoler lavaj (BAL) örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri, *Aspergillus* DNA'sının PCR ile araştırılması için ayrıldı. Heparinli tüplere alınan kan örneklerinin serumu beta-glukan ve galaktomannan varlığının araştırılması için saklandı. Bazı deneklerden LS kültürü yapılabilmesi için kültür tüplerine kan örnekleri alındı. BAL örnekleri, PCR ve beta-glukan araştırılması için ayrıldı. En son olarak da akciğer dokusu birkaç parçaya ayrılarak, direkt mikroskopi, kültür, patolojik inceleme, kitin düzeyinin belirlenmesi ve dokudan PCR yapılması için paketlenildi. Bütün örnekler uygun ambalajlar içinde, işlem gününe kadar -80°C'de saklandı.

Direkt Mikroskopi, Kültür, Patolojik İnceleme

Doku örneklerinden hazırlanan direkt preparatlarda mantar elemanları arandı. Doku örnekleri ayrıca, periyodik asit shift (PAS) veya gomori gümüşleme boyaları ile boyanarak mantarlara ait hifler arandı. LS sistemiyle (ISOLATOR™10 WAMPOLE, OXOID Blood Culture Systems, İngiltere) alınan kan örnekleri ve akciğer doku örnekleri SDA plaklarına ekilerek 24 ve 37°C'de inkübe edildi.

Galaktomannan ve Glukan Antijenlerinin Araştırılması

GM araştırılmasında, Platelia® *Aspergillus* ELISA kiti (BioRad, Fransa) üretici firma önerilerine göre, 300 µl serum örneği kullanılarak uygulandı. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda optik okuyucuda (El x 800, BioTek, ABD) okundu. Kontrol serumları kullanılarak her serum için indeks değeri (ID) hesaplandı ve ID ≥ 0.7 olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

Beta-glukanın araştırılması için Fungitell™ (Cape Cod, ABD) kantitatif ölçüm kiti kullanıldı. Bu kit proteaz zimojen temelinde dayalı olarak çalışmakta ve kinetik olarak ölçüm yapılabilen kolorimetrik bir prosedürü içermektedir. Standardın dışında hiçbir malzeme glukana içermemektedir. Testte kullanılacak olan diğer malzemelerin glukandan arındırılması amacıyla cam malzemeler 235°C'de 7 saat tutuldu; plastik malzemeler ise kullanımdan önce kite ait RGW solüsyonu ile çalkalandı. Serum ve BAL örneklerinden 5'er µl kullanıldı. Sonuçlar, inkübatörlü ELISA okuyucusunda (Synergy HT, BioTek, ABD), 37°C'de, 405 nm dalga boyunda birer dakikalık aralıklarla 40 dakika okunarak elde edildi. Veriler toplandıktan sonra, 0-40 dakika arasındaki her nokta için optik dansite değişiminin ortalama hızı hesaplandı ve test edilen her örneğin GC konsantrasyonu pg/ml olarak kaydedildi ($R^2 = 0.8982$). Kullanılan kitin saptama aralığı 31.25-500 pg/ml arasında verilmekte idi. Değerlendirmede, < 60 pg/ml negatif, ≥ 80 pg/ml pozitif, 60-79 pg/ml arası şüpheli sonuç olarak yorumlandı.

Gerçek Zamanlı (Real-time) PCR (RtPCR)

Alınan BAL, doku ve kan örneklerinden mantarlara ait DNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edildi. Elde edilen DNA'lar önce sıçan beta-aktin genini hedefleyen primerler kullanılarak çoğaltıldı ve örneklerde DNA varlığı kontrol edildi. *Aspergillus* DNA'sının gösterilmesi için *Aspergillus*'a özgül primer-prob karışımı ile RtPCR yöntemi kullanıldı (Tablo I). İşlem LC 2.0 cihazında (Roche, ABD) gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı için "LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Kit" ve özgül primer-prob karışımı (TibMolbiol, Almanya) kullanıldı. Şablon DNA, 20 µl tepkime karışımına 1 ng konsantrasyonunda (5 µl) eklendi. Denatürasyon döngüsü 45 kez; 95°C'de 30 saniye, 62°C'de 20 saniye ve 72°C'de 25 saniye olacak şekilde tekrarlandı. Bu basamağı 40°C'den 95°C'ye erime eğrisi analizi izledi.

İstatistiksel Değerlendirme

Veriler SPSS 10.0 istatistik paket programına girildi. İstatistiksel karşılaştırmada non-parametrik testler olan dört gözlü düzende (2 x 2) Yates düzeltmeli ki-kare (χ^2) testi ile Fisher kesin ki-kare testi, korelasyon analizi için ise Pearson korelasyon analizi testi kullanıldı. $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo I. PCR İçin Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

Hedef	Primer veya Prob dizisi
Beta-actin	5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3
Beta-actin	5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3
Primer	5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG (F) 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG (R)
<i>Aspergillus</i> 640 florofor prob	5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C
<i>Aspergillus</i> floresan prob	5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

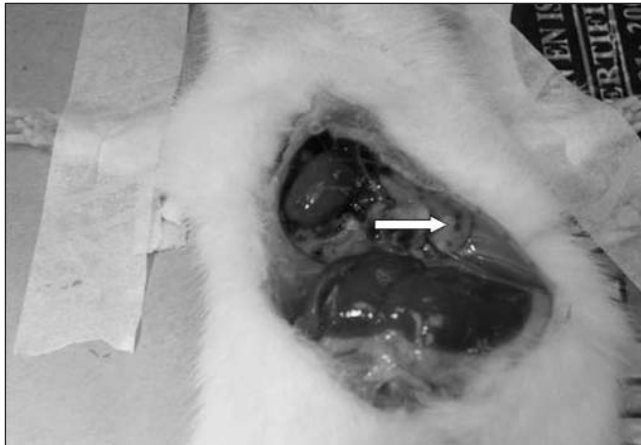
BULGULAR

Çalışmamızda, sağlıklı kontrol grubunda denek kaybı olmamış; ancak nötropeni kontrol grubundan 2 denek 5. ve 6. deney günlerinde kaybedilmiştir. Kontrol gruplardan alınan örneklerde direkt mikroskopide ve patolojik incelemelerde mantar elemanları görülmemiştir. Doku örneklerinden yapılan kültürlerde hiçbir üreme olmamıştır. Her iki grupta PCR uygulanan hiçbir örnekte (doku, kan, BAL) *Aspergillus* DNA'sı saptanmamıştır. GM (serum) ve GC (serum ve BAL) düzeyleri negatif bulunmuştur.

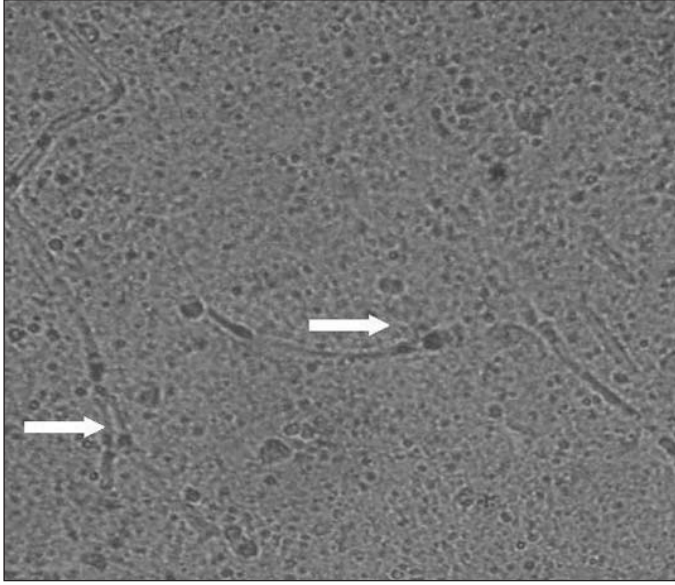
Akciğer aspergillozu oluşturulan 35 sıçandan 13 (%38)'ü deney sırasında kaybedilmiştir. Enfeksiyonun 7. gününde sağ kalan 22 (%62) sıçandan alınan doku örneklerinin 20'sinde *A.fumigatus* kolonileri görülmüştür. Deneyel enfeksiyon oluşturulan bütün deneklerde patolojik olarak aspergilloz varlığı doğrulanmıştır (Resim 1,2). LS yöntemi ile yapılan kan kültüründe örneklerin hiçbirinde üreme görülmemiştir. PCR ile *Aspergillus* DNA'sı 19 tam kan örneğinde çalışılabilmiş, 7 (%36.8)'inde pozitif sonuç alınmıştır. BAL örneği 17 sıçandan alınabilmiş; miktar azlığı nedeniyle PCR testi 12'sinde çalışılmış ve 7 (%58.3)'inde pozitif bulunmuştur. Doku örneklerinin ise %18.1 (4/22)'inde *Aspergillus* DNA'sı pozitif olarak saptanmıştır.

GM antijen testi 20 serum örneğinde çalışılabilmiş ve 7 (%35) 'inde pozitif bulunmuştur. GM İD 0.5 olarak kabul edildiğinde ise sonuçlarda bir değişiklik olmamıştır. Beta-glukan aktivitesi 22 serum ve 17 BAL örneğinde araştırılmış; serum örneklerinin 11 (%50)'inde, BAL örneklerinin 9 (%52.9)'unda pozitif sonuç elde edilmiştir. Aspergillozlu grupta çalışılan tüm testlerin sonuçları Tablo II'de verilmiştir.

Aspergillozlu grupta çalışılan her test, otopsi sonrası alınan doku örneklerinin kültür sonuçları ile karşılaştırılarak özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) hesaplanmıştır. Kan PCR ile kültür arasında, doku PCR ile kültür arasında, GM testi ile kültür arasında ve kültür ile serumda GC testi arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo III).



Resim 1. Akciğer aspergillozu oluşturulmuş deney hayvanında akciğerlerin makroskopik görünümü.



Resim 2. Doku örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde septalı hiflerin varlığı (40x).

Tablo II. Aspergilloz Oluşturulmuş Gruba Ait Test Sonuçları

Sonuç	Yöntem							Kültür
	PCR			Galaktomannan (Serum)	Beta-glukan		Patoloji	
	Kan	BAL	Doku		Serum	BAL		
Pozitif	7 (%36.8)	7 (%58.3)	4 (%18)	7 (%35)	11 (%50)	9 (%52.9)	22 (%100)	20 (%91)
Negatif	12	5	18	13	11	8	-	2
Toplam	19	12	22	20	22	17	22	22

Tablo III. Aspergilloz Grubunda Çalışılan Testlere Ait Özgüllük, Duyarlılık, PPD, NPD ve p Değerleri

Yöntem	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	PPD (%)	NPD (%)	p
Kan-PCR	100	41.2	100	16.7	0.509
BAL-PCR	x	58.3	100	x	x
Doku-PCR	100	20.0	100	11.1	1.000
Serum-GM	100	38.9	100	15.4	0.521
Serum-GC	100	55.0	100	18.2	0.476
BAL-GC	x	52.9	100	x	x

x: Hesaplanamadı, PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, GM: Galaktomannan, GC: β -Glukan, BAL: Bronkoalveoler lavaj sıvısı, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

TARTIŞMA

Nötropenik hastalarda fungal enfeksiyonlarda erken tanı için kullanılacak tanı araçlarının güvenilirliği sınırlıdır. Günümüzde kullanılan mikrobiyolojik, serolojik ve görüntüleme yöntemleri, *Aspergillus* spp. tarafından oluşturulan invazif enfeksiyonların belirlenmesinde olduğu gibi erken tanının konulmasında da yetersiz kalmıştır¹⁷.

İnvazif aspergillozun klinik belirtileri özgül olmayıp değişkenlik gösterebilmektedir. Dolayısıyla olguların büyük bir bölümünde geç tanı konulur ve hatta bazen otopside saptanır. Mevcut yöntemlerin düşük duyarlılık ve özgüllüğünden dolayı, pozitif histopatoloji veya kültür sonuçları kanıtlanmış invazif mikoz olarak kabul edilmiştir¹⁰. Tür düzeyinde tanımlama özellikle *Aspergillus terreus* gibi antifungallere dirençli yeni patojen türlerin saptanması nedeniyle çok önemlidir⁴. Kan ve BAL örneklerinin kültür sonuçları düşük olup özellikle kontaminasyonlar sıklıkla sorun olmaktadır. Çoğunlukla kritik ve trombositopenisi olan bu nötropenik hastalarda doku biyopsi örneklerinin alınması ise nadiren uygulanabilmektedir¹. Dolayısıyla çalışmalar, bu hasta grubunda morbidite ve mortalitenin düşürülmesi için erken tanı ve tedaviyi sağlayabilecek, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır¹.

İnvazif *Aspergillus* enfeksiyonlarının hızlı laboratuvar tanısı, antijen (GM, GC) testleri ve/veya kan ya da diğer vücut sıvılarında nükleik asidin saptanmasına dayanmaktadır⁹. Bu çalışmanın amacı, nötropenik sıçanlarda geliştirilen invazif pulmoner aspergilloz modelinde hızlı tanı yöntemlerinin performanslarının değerlendirilmesidir. Hayvan ve insan çalışmaları, GM değerlerinin *Aspergillus* fungal yükü ile uyumlu olduğunu ve İA prognozunun izlenmesine yardımcı olabileceğini göstermiştir⁸. Bizim çalışmamızda GM antijeni 20 serum örneğinde çalışılabilmiş ve 7 (%35)'sinde pozitif bulunmuştur. Kültür sonuçları altın standart alındığında duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD oranları sırasıyla %38.9, %100, %100 ve %15.4 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda GC antijeni, serum ve BAL örnekleri kullanılarak Fungitell testi ile araştırılmış ve her iki tip örnek için de pozitiflik değeri, Khan ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasına dayanarak ≥ 80 pg/ml olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemle, serum örneklerinin %50 (11/22)'si ve BAL örneklerinin %52.9 (9/17)'u pozitif bulunmuştur (Tablo II). Serum örneği çalışıldığında duyarlılık %55, BAL örneği çalışıldığında ise %52.9 olarak saptanmıştır. PPD oranı her iki tip örnek için de %100 bulunmuştur (Tablo III). Kami ve arkadaşları¹⁹ İA tanısında *Platelia* testinin duyarlılığını (%58), beta-glukan testinden (%67) daha düşük bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, serum örneklerinde *Platelia Aspergillus* testinin duyarlılığı (%38.9) Fungitell testinin duyarlılığından (%55) daha düşük bulunmuştur. GC testi için, selüloz membranla hemodiyaliz altındaki böbrek yetmezlikli hastalarda, intravenöz immünoglobülin ile tedavi görenlerde, gazlı bez gibi glukan içeren materyallerle temas eden hastalarda ya da örneklerde yanlış pozitif sonuçların gelişebileceği ifade edilmektedir¹⁹⁻²¹. Ancak bizim çalışmamızda bir hayvan modeli kullanıldığı için yanlış pozitiflik veya kontaminasyon görülmemiştir.

Pazos ve arkadaşları²⁰, nötropenik 40 erişkin hastada İA tanı ve tedavisinin izlenmesinde GC kromojenik testini (Glucatell), GM testi (Platelia) ile karşılaştırarak değerlendirmişler; her iki testin de kanıtlanmış İA olgularını %100 oranında, yüksek olasılıklı İA olgularını ise %66 oranında saptadığını bildirmişlerdir. Her iki testte de %10 oranında yanlış pozitif sonuç elde edilmiş ve GC testi için elde edilen yüksek duyarlılığın, kullanılan kit ile ilgili olabileceği yorumu yapılmıştır²⁰. Odabaşı ve arkadaşlarının²² çalışması ise, invazif fungal enfeksiyonların tanısında GC tespitinin kullanımı ile ilgili önemli veriler sağlamıştır. Bu araştırmacılar, kandidemili hastalar ve sağlıklı bireylerde değerlendirme için 60 pg/ml eşik (cut-off) değerini kullanmışlar ve her hastanın en az bir serum örneğinde, klinik tanıdan 10 gün önce beta-glukan pozitifliği tespit etmişlerdir²². Çalışmada testin NPĐ oranı %100; özgüllüğü ise, bir hastaya ait tek örnek çalışıldığında %96, ardışık örneklerle çalışıldığında %100 bulunmuştur²².

1990'lı yıllardan başlayarak fungal patojenleri yüksek duyarlılıkla erkenden saptamak amacıyla moleküler yöntemler üzerinde yoğun olarak durulmaktadır¹⁷. Yapılan çalışmalarda, immün sistemi baskılanmış hastalarda PCR'nin en erken invazif fungal enfeksiyon belirleyicisi olduğu ve pulmoner aspergillozun erken tanısında BAL örneklerinin kan örneklerine göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterdiği bildirilmiştir^{17,23-25}. Loeffler ve arkadaşları²⁶, İA tanısında PCR yönteminin duyarlılığını saptamak için enfekte fare ve tavşanların kan ve doku örneklerinde kantitatif kültür, PCR-ELISA ve kantitatif LightCycler testlerini karşılaştırmışlar; 64 kültür negatif akciğer doku örneğini PCR ile pozitif bulurken, sadece iki PCR negatif örnekte *A.fumigatus* üremesi saptamışlardır. Araştırmacılar, PCR yöntemini kültürden 19.4 kez daha duyarlı bulmuşlar ve akciğer biyopsi örnekleri çalışıldığında, özellikle kompleman aktivasyonu ya da yüksek makrofaj/nötrofil aktivitesi gibi immün reaksiyonlarla fungal büyümenin inhibe olduğu durumlarda, PCR'nin kültüre göre yüksek duyarlılıkla daha faydalı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda aspergillozlu farelerden elde edilen 22 doku örneğinin sadece 4 (%18)'ünde *Aspergillus* DNA'sını gösterilmiş, 19 kan örneğinin ise 7 (%36.8)'inde *Aspergillus* DNA'sı saptanabilmiştir (Tablo II). Deneyisel modelimiz kanıtlanmış aspergilloz olarak sınıflandırıldığında, PCR sonuçlarımızın düşük bulunduğu göze çarpmaktadır. PCR'nin kullanımı ile ilgili, örnek tipi (serum, BAL), ekstraksiyon protokolü, amplifikasyon sistemi (nested, konvansiyonel), protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve konvansiyonel) ya da pimer seçimi (*Aspergillus* ya da tüm küflere özgül, panfungal) gibi çok sayıda çözülmemiş sorun bildirilmiştir⁸. Kanıtlanmış aspergillozlu hastalarda standart kan kültürleri sıklıkla negatif sonuç verdiğinden, PCR pozitif sonuçlarla kültür sonuçlarının karşılaştırılması uygun bulunmamıştır. Kandaki lökosit ve eritrositleri parçalayıp koagülasyonu engelleyerek mikroorganizmanın üremesini artıran LS sistemi ile yapılan çalışmalarda, aspergilloz için yararlı olabileceği, ancak diğer kan kültür sistemlerine göre daha üstün olmadığı bildirilmiştir²⁷. Bizim çalışmamızda, aspergillozlu 10 sıçandan alınan kan örnekleri Isolator™ kültür sistemiyle değerlendirilmiş; üç hafta bekletilen kültürlerde herhangi bir kontaminasyon görülmemesine rağmen hiçbir üreme de olmamıştır. PCR sonuçlarıyla karşılaştırma uygun bulunmamakla beraber, bizim çalışmamızda PCR testi ile bu 10 sı-

çandan dördünde pozitif sonuç alınmıştır (Tablo II). Moleküler çalışmalarda esas olarak hastanın durumu örnek seçimini belirler. Klinisyenler kritik hastalarda invazif prosedürlerin uygulanmasını tercih etmez. BAL ve BOS örneğinin alınması genellikle zordur. Klinik uygulamalarda kan alınması kolaydır ve rutin taramada kullanılabilir²⁴. Düşük pozitiflik düzeyi *Aspergillus*'un dolaşımında geçici süre bulunmasına bağlı olabilir. Fazla miktarda (≥ 4 ml) ve sık örnek alınması ile PCR sonuçları arasında bir ilişki bulunmuştur²⁴. Çalışmamızda aspergillozlu deneklerden alınan 12 BAL örneğinin 7 (%58.3)'sinde pozitiflik elde edilmiştir.

Aspergillus PCR ile ilgili en önemli konulardan biri de sonuçların klinik açıdan değerlendirilmesidir. Tek PCR pozitifliğinin fungal hastalıkla ilişkili olamayacağı ve antifungal tedaviye karar verilemeyeceği, seri örneklerin değerlendirilmesinin gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca bir ya da daha fazla sayıda negatif kan PCR sonucunun İA tanısını kesin olarak dışlamayacağı da bildirilmiştir⁸. Mevcut kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisinin İA'lı hastalar için yeterli duyarlılığa sahip olmamalarından ve her testin enfeksiyonun farklı zamanlarında pozitifleşmesinden dolayı, bu testlerin birarada kullanılmasının, performanslarını artıracak düşüncesi kabul görmüştür⁸. Kawazu ve arkadaşları²⁸, hematoloji hastalarında İA tanısında Rt-PCR, GM ve GC testlerinin tanısal değerlerini karşılaştırmışlar ve bu haftalık tarama testleri arasında ELISA testini, eşik optik dansite indeksi değeri 0.6 alındığında en duyarlı test olarak değerlendirmişlerdir. Scotter ve arkadaşları²⁹, GM, PCR-ELISA ve RtPCR testlerini kaspofungin asetate tedavisi alan ve almayan İA'lı sıçanlarda değerlendirmişler ve hayvanları intravenöz yolla konidyum süspansiyonu vererek enfekte etmişlerdir. Bizim çalışmamızda GM testinin duyarlılığı %38.9 iken bu çalışmada %23.5, yine bizim çalışmamızda kan örneklerinde PCR testinin duyarlılığı %41.2 iken bu çalışmada %17.6 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada PCR ile 17 örnekten 3 (%17.7)'ünde pozitiflik, GM testi ile 17 örnekten 4 (%23.5)'ünde pozitiflik elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise GM testi ile %35, PCR testi ile %36.8 pozitif sonuç alınmıştır. Ayrıca bu çalışmada karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında makroskopik olarak gözle görülür lezyonlar olduğu halde sıçanların %24'ünde tüm testler negatif çıkmıştır. Önemli bir nokta olarak bu çalışmada kaspofungin ile tedavi edilmiş hayvanlarda, muhtemelen ilacın hücre duvarı üzerine olan etkisinden dolayı GM düzeyleri yüksek olarak seyretilmiştir.

Çalışmamızda, kültür dışı tanı yöntemlerinin hiçbirisi tek başına İA için yeterli duyarlılık göstermemiştir. Diğer çalışmalarda da İA tanısında standart yöntemlerin bulunmasıyla birlikte hastalığın seyrinin veya profilaktik ya da ampirik antifungal ilaç verilmesinin etkisi sonucunda kültür dışı tanı yöntemlerinin performansı önemli derecede değişkenlik göstermiştir. Sonuçta kültür dışı tanı yöntemlerinin performansını karşılaştırmak için daha ileri tekniklerle en uygun birlikteliğin belirlenmesine ihtiyaç vardır. Testlerin tarama amaçlı birarada değerlendirilebilmesi için kan örneklerinin en uygun örnek olduğu kanısına varılmıştır. Bu sayede daha invazif yöntemlere olan bağımlılık da önlenmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kauffman CA. The changing landscape of invasive fungal infections: epidemiology, diagnosis and pharmacologic options. Clin Infect Dis 2006; 43: S1-2.
2. Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(Suppl 1): 3-6.
3. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. Clin Infect Dis 2006; 43: S3-14.
4. Richardson MD, Kokki M. *Aspergillus*, pp: 273-96. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), Clinical Mycology. 2003. Churchill Livingstone, New York.
5. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. Clin Infect Dis 2006; 43: S15-27.
6. Preuner S, Lion T. Towards molecular diagnostics of invasive fungal infections. Expert Rev Mol Diagn 2009; 9: 397-401.
7. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transplan Infect Dis 2002; 4 (Suppl 3): 32-7.
8. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycol 2006; 44: S163-172.
9. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. Br J Haematol 2004; 126: 289-97.
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MCG) Consensus Group. 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.
11. Hızal K, Kızıltürk N, Kalkancı A, Öztürk C, Kuştımur S, Tufan M. Polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycoses 2004; 47: 338-42.
12. Saraçlı MA. Aspergilloz tanısında moleküler yöntemler, s: 195-201. Ener B (ed), *Aspergillus*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 2006, No: 56, İstanbul.
13. Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 376-80.
14. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. Infect Immun 2005; 73: 494-503.
15. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-50.
16. Steinbach WJ, Benjamin DK, Trasi SA, et al. Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. Med Mycol 2004; 42: 417-25.
17. Buchheidt D, Hummel M. *Aspergillus* polymerase chain reaction (PCR) diagnosis. Med Mycol 2005; 43: S139-45.
18. Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM. Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DNA, (1-3)- β -D-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens of experimentally infected rats. Mycoses 2008; 51: 129-35.
19. Kami M, Fukuti T, Ogawa S. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1504-12.
20. Pazos C, Ponton J, Palacio AD. Contribution of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-Glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. J Clin Microbiol 2005; 43: 299-305.
21. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1 $\rightarrow$ 3) beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 1995; 345: 17-20.

22. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. beta-D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Infect Dis 2004; 39: 199-205.
23. Hebart H, Loeffler J, Meisner C, et al. Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infect Dis 2000; 181: 1713-9.
24. White PL, Barnes RA. *Aspergillus* PCR-Platforms, strengths and weaknesses. Med Mycol 2006; 44: 191-8.
25. Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P. Detection of *Aspergillus* spp. in biological samples by real-time PCR. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2006; 150: 245-8.
26. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, et al. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. J Infect Dis 2002; 185: 1203-6.
27. Creger RJ, Weeman KE, Jacobs MR, et al. Lack of utility of the Lysis-Centrifugation blood culture method for detection of fungemia in immunocompromised cancer patients. J Clin Microbiol 1998; 36: 290-3.
28. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-beta-D-Glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. J Clin Microbiol 2004; 42: 2733-41.
29. Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. Clin Diag Lab Immunol 2005; 12: 1322-7.