

Galaktomannan, 1,3-β-D-Glukan ve PCR Testlerinde Bronkoalveoler Lavaj Örneğinin Önemi*

The Importance of Bronchoalveolar Lavage Sample for Galactomannan, 1,3-β-D-Glucan and PCR Tests

Hafize SAV¹, Mustafa Altay ATALAY¹, Ekrem ÜNAL², Nedret KOÇ¹

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma, I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2011, Antalya)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.12.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.06.2012

ÖZET

Fırsatçı mantar enfeksiyonları özellikle immünyetmezlikli hastalarda önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir. Erken ve doğru tanı, antifungal tedavinin zamanında başlanması ve antifungal ajanların gereksiz kullanımını azaltmak için son derece önemlidir. Son yıllarda invazif mantar enfeksiyonlarının daha hızlı ve daha duyarlı saptanabileceği antijenlerin, özgül antikorların, fungal metabolitlerin ve DNA'nın tespitine yönelik çabalar artmıştır. Bu raporda, daha önceden kistik fibrozis ve difüz büyük B hücreli lenfoma tanısı olan, ateş, kusma ve öksürük şikayetleriyle başvuran yedi yaşındaki bir erkek hasta sunulmaktadır. Hastanın toraks bilgisayarlı tomografisinde, sağ akciğer alt lobda yaygın parankimal infiltrasyon ve alveoler opasiteler, her iki akciğerde de değişik segmentlerde yamalı alveoler fokal infiltrasyonlar izlenmiştir. Bronkoskopiye takiben mikoloji laboratuvarına gönderilen bronkoalveoler lavaj (BAL) örneğinin direkt incelemesinde *Aspergillus* ile uyumlu görünümde hifler belirlenmiş; kültüründe de *Aspergillus fumigatus* üremiştir. Hastanın BAL örneğinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR), galaktomannan (GM = 1.08 ng/ml) ve 1,3-β-D-Glukan (BG > 523 pg/ml) test sonuçları pozitif iken, eş zamanlı serum örneğinde PCR, GM (0.13 ng/ml) ve BG (< 7 pg/ml) sonuçları negatif olarak saptanmıştır. Hastaya vorikonazol tedavisi başlanmış; 45 gün tedaviye devam edilmiş ve genel durumu düzelen hasta taburcu edilmiştir. Sonuç olarak, immünsüpresif hastalarda invazif mantar enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisinin, prognozu ciddi düzeyde etkilemesi nedeniyle, serum örneklerinden çalışılan GM, BG ve Rt-PCR testleri yanında, BAL örneklerinden de GM, BG ve Rt-PCR çalışılmasının faydalı olacağı ve bunun ileri ve daha fazla olgu ile yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Aspergilloz; bronkoalveoler lavaj; galaktomannan; 1,3-β-D-Glukan; PCR.*

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Mustafa Altay Atalay, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039 Talas, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 4374937-20204, **E-posta (E-mail):** altayatay@gmail.com

ABSTRACT

Opportunistic fungal infections are life threatening especially for immunosuppressed patients. Early and accurate diagnosis is very important for the prompt initiation of treatment and to reduce unnecessary use of antifungal drugs. In recent years, efforts providing more rapid and more sensitive diagnosis of invasive fungal infections have been increasing. These methods include detection of fungal antigens, specific antibodies, fungal metabolites and DNA in the clinical samples. In this case, we report a seven year-old male patient with cystic fibrosis and diffuse large B-cell lymphoma, who presented with fever, vomiting and chronic cough. Diffuse parenchymal infiltrations and alveolar opacities in the inferior lobe of right lung and focal patchy alveolar infiltrates in different segments in both lungs were seen in thoracic CT scanning. Bronchoalveolar lavage (BAL) sample obtained by bronchoscopy was sent to the mycology laboratory and hypha elements that were compatible with *Aspergillus* were seen in direct examination. *Aspergillus fumigatus* was isolated from the culture of BAL sample. Real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR), galactomannan (GM = 1.08 ng/ml) and 1,3-β-D-Glukan (BG > 523 pg/ml) tests in BAL sample yielded positive results, however simultaneously performed PCR, GM (0.13 ng/ml) and BG (< 7 pg/ml) tests in serum sample were found to be negative. Treatment with voriconazole was started and continued for 45 days. The patient was discharged after improvement of his general state. It was concluded that PCR, GM and BG tests performed both in sera and BAL samples might aid to the early diagnosis and treatment of patients with invasive fungal infections in immunosuppressed patients. These data should be supported with further larger scale studies.

Key words: *Aspergillosis; bronchoalveolar lavage; galactomannan; 1,3-β-D-Glukan; PCR.*

GİRİŞ

Aspergillus türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar immün sistemi baskılanmış hastalarda morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir¹. Bu hastalarda klinik bulguların belirgin olmaması ve kültür sonucu çıkana kadar geçen süre, tedavide önemli gecikmelere neden olmaktadır. Erken ve doğru tanı, antifungal tedavinin zamanında başlanması ve bu ajanların gereksiz kullanımını azaltmak için son derece önemlidir². Son yıllarda invazif mantar enfeksiyonlarının daha hızlı ve daha duyarlı saptanabileceği antijenlerin, özgül antikörlerin, fungal metabolitlerin ve DNA'nın tespitine yönelik çabalar artmıştır^{3,4}. Serumda galaktomannan (GM) ve 1,3-β-D-Glukan (BG) testleri erken tanıya yardımcı olması amacıyla rutinde uygulanmakta iken, bu testlerin bronkoalveoler lavaj (BAL) için uygulanması henüz araştırma safhasındadır. Bu raporda, BAL sıvı kültüründen *Aspergillus fumigatus*'un izole edildiği, eş zamanlı olarak BAL örneğinden yapılan BG, GM ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) testlerinin pozitif, serum örneğinden yapılan BG, GM ve Rt-PCR testlerinin ise negatif olduğu immünsüpresif bir olgunun sunulması amaçlanmıştır.

OLGU SUNUMU

Daha önceden kistik fibrozis ve difüz büyük B hücreli lenfoma tanısı olan, bir hafta önce pediatrik hematoloji onkoloji servisinden taburcu olan yedi yaşındaki erkek hasta Nisan 2009 tarihinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Polikliniğine ateş, kusma ve öksürük şikayetleriyle başvurdu. Laboratuvar incelemelerinde, lökosit sayısı 19.540 mm³, C-reaktif protein 47.3 mg/L olarak bulundu. Toraks bilgisayarlı tomografisi

(BT)'nde sağ akciğer alt lobda yaygın parankimal infiltrasyon ve alveoler opasiteler, her iki akciğerde de değişik segmentlerde yamalı alveoler fokal infiltrasyonlar izlendi. Bronkoskopiye takiben mikoloji laboratuvarına gönderilen BAL örneğinden direkt mikroskopik inceleme yapıldıktan sonra antibiyotiksiz ve antibiyotikli Sabouraud dekstroza agar (Oxoid, İngiltere) ekildi; 37°C ve 25°C'de inkübe edildi. Eş zamanlı olarak serum ve BAL örneklerinden GM testi (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad, Fransa) çalışıldı. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda optik okuyucuda (EL X 808, BioTek, ABD) okundu. Kontrol serumları kullanılarak, hastanın serum ve BAL örnekleri için indeks değeri hesaplandı ve ≥ 0.5 ng/ml olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi. Aynı örneklerden bir başka serolojik test yöntemi olan BG testi (Fungitell, Associates of Cape Cod, ABD) çalışıldı. 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. Örneklerinden nükleik asit eldesi için Heliosis DNA izolasyon sistemi (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanıldı. Elde edilen DNA'lar *A.fumigatus* için seçilen hedefleri çoğaltmak üzere Rt-PCR (Light Cycler-Roche, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Reaksiyon karışımı için "LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Kit" ve özgül primer-prob karışımı (TibMolbiol, Almanya) kullanıldı. Her bir reaksiyon için kapillere (Light Cycler 1.5/2.0) 15 µl karışımı 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 izlendi. Olgumuzun BAL Rt-PCR, GM ve BG sonuçları pozitif (1.08 ng/ml ve > 523 pg/ml) iken, eş zamanlı serum Rt-PCR, GM ve BG sonuçları negatifti (0.13 ng/ml ve < 7 pg/ml).

Kültürde üreme görüldükten sonra tür düzeyinde tanımlama yapmak için mısır unlu agar kullanılarak lam kültürü yapıldı. Tür tayini yapıldıktan sonra RPMI 1640 (Sigma, İngiltere) besiyerine ekilerek antifungal duyarlılık testi yapıldı. BAL örneğinin direkt incelemesinde *Aspergillus* ile uyumlu olabilecek görünümde hifler belirlendi (Resim 1). Kültürde başlangıçta beyaz renkli olan, zamanla yeşile dönen koloniler görüldü. Lam kültürüyle yapılan mikroskopik incelemede ise septalı hifalar, kubbe şeklinde vezikül, üst kısmın yarısını kaplayan fiyalidler ve sütun şeklinde dizilmiş konidyumlar görüldü ve suş morfolojik olarak olası bir *A.fumigatus* izolatu olarak tanımlandı¹. Moleküler düzeyde tanımlama yapılmadı. İzolatın antifungal duyarlılığı, amfoterisin B ve vorikonazol için hem mikrodilüsyon hem de E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle, kaspofungin için ise sadece E-test yöntemi ile çalışıldı⁵. Mikrodilüsyon ve E-test yöntemiyle amfoterisin B için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri sırasıyla 0.50 µg/ml ve 0.50 µg/ml, vorikonazol için 0.25 µg/ml ve 0.35 µg/ml, kaspofungin için 0.25 µg/ml olarak bulundu. Hastaya vorikonazol başlandı (ilk gün 2 x 6 mg/kg, sonra 2 x 4 mg/kg intravenöz) ve 45 gün devam edildi. Genel durumu düzelen hasta önerilerle taburcu edildi.



Resim 1. Bronkoalveoler lavaj örneğinde hif görünümü.

TARTIŞMA

A.fumigatus başta olmak üzere, *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum* ve *Exophiala dermatitidis* kistik fibrozisli hastaların solunum salgılarından en sık izole edilen mantarlardır⁶. Kistik fibrozis ve B hücreli lenfoma tanısı alan olgumuzda da etkenin *A.fumigatus* olduğu saptanmıştır. İlginç olarak kistik fibrozisli küçük çocuklarda *A.fumigatus*'un neden olduğu solunum yolu enfeksiyonları bakteriyel etkenler kadar yaygın değildir. Yayınlarda kistik fibrozisli hastaların solunum sekresyonlarından *A.fumigatus* ve *S.apiospermum*'un ilk izole edilme yaşlarının sırasıyla ortalama 12.3 ve 14.1 yıl olduğu, diğer taraftan *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için ise sırasıyla ortalama 5.4 ve 8.1 yıl olduğu belirtilmektedir⁷. Olgumuzun yaşı yedi olup, *A.fumigatus* izole edilme yaş ortalamasından düşüktür.

İnvazif aspergillozlu olgularda doku örneklerinin zor alınması, diğer klinik örneklerin (sürüntü, balgam ve kan) tanıda duyarlılık ve özgüllük açısından yetersiz kalması ve toraks BT'nin tanıda oldukça yararlı olması ancak özgül olmaması yeni arayışları gündeme getirmiştir. GM ve BG antijen tarama testleri ve hasta kanında *Aspergillus*'a özgül nükleik asit testleri son yıllarda kullanılmaya başlayan invazif olmayan tanı yöntemleridir⁸. Kültür dışındaki bu tanı yöntemlerinden en çok kullanılan ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından 2003 yılında onaylanmış olan, *Aspergillus* cinsine özgül GM antijeninin enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ile gösterildiği, Platelia *Aspergillus* (Bio-Rad, Marnes La-Coquette, Fransa) testidir^{4,9}.

GM antijen testi serum örnekleri dışında BAL, trakeal salgılar ve beyin omurilik sıvısı gibi çeşitli örneklerde de bakılabilmektedir. Günümüzde genel olarak testin BAL'da duyarlılığının %80'e, özgüllüğünün %94'e ulaştığı ve yanlış pozitiflik oranının %8 olduğu bildirilmiştir¹⁰. Luong ve arkadaşları¹¹, 145 hematolojik maligniteli hastadan alınan 173 BAL örneği ile yaptıkları çalışmada; GM indeks eşik (cut-off) değerinin ≥ 0.5 alındığında, BAL GM testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD)'nin sırasıyla %100, %75, %26 ve %100 olduğunu, diğer taraftan GM indeks eşik değerinin ≥ 2.0 alındığında duyarlılık ve NPD'nin değişmediğini (%100), özgüllük ve PPD'nin ise arttığını (sırasıyla %93, %50) bildirmişlerdir. Hsu ve arkadaşları¹², BAL GM testinin inva-

zif pulmoner aspergilloz tanısında güvenli ve yararlı bir yardımcı test olduğunu, ancak aşırı invazif pulmoner aspergilloz tanısından kaçınmak için BAL GM eşik değerlerinin serum GM eşik değerleri ile karşılaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir. GM indeks eşik değerinin ≥ 0.5 ng/ml alındığı olgumuzun BAL GM değeri 1.08 ng/ml, serum GM değeri ise 0.13 ng/ml olarak bulunmuştur.

Bazı antibiyotiklerin (piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asit, tikarsilin) kullanımının; bazı mantarlar (*Penicillium*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*) ile oluşan enfeksiyonların ve ayrıca ticari bir elektrolit replasman solüsyonunun (Plasmalyte, Baxter Healthcare Corporation) kullanımının, serum veya BAL örneklerinde GM yalancı pozitifliğine neden olabileceği bildirilmiştir¹³. Bazı çalışmalarda, GM testinin duyarlılığının çocuklarda ve erişkinlerde farklılıklar gösterdiği ve ayrıca aspergillozlu erişkin ve çocuk hastalardaki yalancı pozitiflik oranlarının sırasıyla %3-10 ve %10-44 olduğu bildirilmektedir¹⁴. Diğer taraftan Hayden ve arkadaşları¹⁵, GM yalancı pozitifliğinin çocuklarda daha sık olduğu görüşünün doğru olmadığını, GM varlığının pediatrik onkoloji hastalarının çoğunda invazif aspergilloz göstergesi olduğunu belirtmişlerdir.

Bir fungal hücre duvarı bileşeni olan BG, zigomiçetler ve kriptokoklar hariç panfungal bir tarama testi olarak tanıda kullanılmaktadır². Aspergilloz, fusariyoz, kandidiyaz ve trikosporoz gibi invazif mantar enfeksiyonlarını klinik tanıdan ortalama 10 gün önce yüksek bir duyarlılık (%97) ve özgüllükle (%93) saptadığı bildirilmektedir¹⁶. Invazif pulmoner aspergillozlu hastalarda BG testinin, serumda ardışık GM pozitif sonuçlarını doğrulayan bir test olduğu ve her iki testin pozitifliğinin PPD'yi artırdığı, yalancı pozitif sonuçları ise azalttığı belirtilmiştir¹⁷. Daha önce laboratuvar sonuçlarımızın değerlendirildiği, invazif pulmoner aspergillozlu hastalarda, BG testinin tanısal duyarlılık değerinin optimal eşik değerine odaklanarak araştırıldığı bir çalışmada, yüksek eşik değerlerinin özgüllüğü artırmasına rağmen, duyarlılığı kabul edilemez düzeylere düşürdüğü ve üretici firma tarafından önerilen eşik değerinin (80 pg/ml) uygun olduğu bildirilmiştir¹⁸. BG testinin BAL örnekleri için uygulanması ise, henüz daha çok deneysel özelliindedir ve araştırılmaktadır. BG testi < 60 pg/ml negatif, ≥ 80 pg/ml pozitif, 60-79 pg/ml arası şüpheli sonuç olarak yorumladığımız olgumuzda, BAL BG sonucu > 523 pg/ml, eş zamanlı serum BG sonucu ise < 7 pg/ml olarak bulunmuştur.

BAL, pulmoner enfeksiyon durumunda mantar DNA'sını saptamak üzere uygun bir örnektir; ancak BAL ile çalışılan PCR sonuçları invazif enfeksiyonla kolonizasyon ayırımını yapmakta yetersiz kalabilmektedir¹⁹. Aydoğan ve arkadaşları⁴, deneysel olarak akciğer aspergillozu geliştirdikleri nötropenik sıçan modeli çalışmalarında, aspergilloz grubundan alınan BAL örneklerinin %58.3 (7/12)'ünde, kan örneklerinin ise %36.8 (7/19)'ünde *Aspergillus* DNA'sını Rt-PCR ile göstermişler; bu grupta GM antijenini, 20 serum örneğinin 7 (%35)'sinde; BG antijenini ise 22 serum örneğinin 11 (%50)'ünde, 17 BAL örneğinin 9 (%52.9)'unda saptamışlardır. Ayrıca, kültür referans yöntem olarak alındığında, BAL örneklerine uygulanan Rt-PCR testinin diğer yöntemlere göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu vurgulamışlardır⁴. Ahmad ve arkadaşları²⁰, *Aspergillus terreus* ile enfekte ettikleri immünsüpresif sıçanlarla yaptıkları çalışmada, serum örneklerinde BG, GM

ve “nested” PCR pozitiflik oranlarını sırasıyla %43, %78 ve %73 olarak bulmuşlar; BAL’da ise GM ve “nested” PCR pozitifliğinin sırasıyla %80 ve %81 olduğunu bildirmişlerdir. Olgumuzda da, eş zamanlı olarak BAL örneğinden yapılan BG, GM ve Rt-PCR testleri pozitif iken, serum örneğinden yapılan BG, GM ve Rt-PCR testleri negatif bulunmuştur.

MİK değerlerinin belirlenmesinde kullanılan E-test yöntemi, kolay uygulanabilir olması ve özel bir ekipmana ihtiyaç göstermemesi nedeniyle tercih edilmekle birlikte referans yöntem değildir. Yapılan çalışmalarda, E-test ile mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyumun amfoterisin B için %88.5, vorikonazol için %97.6 olduğu bildirilmiştir^{21,22}. Guinea ve arkadaşları²³ ise vorikonazol için E-test yönteminin *A.fumigatus*’un duyarlılığını test etmede uygun bir alternatif olduğunu, ancak amfoterisin B aktivitesinin, E-test yöntemiyle saptanmasından kaçınılması gerektiğini vurgulamışlardır. Martos ve arkadaşları²⁴ *Aspergillus niger* ve *Aspergillus glaucus* türleri hariç, tüm *Aspergillus* türlerinde kaspofungin E-test ve mikrodilüsyon yöntemlerinin uyumunun iyi olduğunu ve %82.4-100 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. *A.fumigatus* olarak tanımlanan izolatımızın, mikrodilüsyon ve E-test yöntemleriyle amfoterisin B için MİK değerleri sırasıyla 0.50 µg/ml ve 0.50 µg/ml, vorikonazol için 0.25 µg/ml ve 0.35 µg/ml olarak bulunmuş; kaspofungin için E-test ile saptanan MİK değeri 0.25 µg/ml olarak izlenmiştir. Azol türevi bir antifungal olan vorikonazol invazif aspergilloz ve yaygın kandidiyaz tedavisinde ilk seçenek ilaçtır²⁵. Olgumuzda da antifungal tedavi olarak vorikonazol (ilk gün 2 x 6 mg/kg, sonra 2 x 4 mg/kg intravenöz) başlanmış ve 45 gün devam edilmiştir. Genel durumu düzelen olgumuz önerilerle taburcu edilmiştir.

Sonuç olarak; immünsüpresif hastalarda invazif mantar enfeksiyonlarının erken tanı ve tedavisinin prognozu ciddi düzeyde etkilemesi nedeniyle, serum örneklerinden çalışılan GM, BG ve PCR testleri yanında, BAL örneklerinden de GM, BG ve PCR çalışılmasının faydalı olacağı ve bunun ileri ve daha fazla olgu ile yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sigler L, Verweij PE. *Aspergillus*, *Fusarium*, and other opportunistic moniliaceous fungi, pp: 1726-60. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
2. Kiraz N. Mantar enfeksiyonlarında etiyolojik tanı konvansiyonel ve serolojik yöntemler. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 7-11 Kasım 2010, Girne, KKTC. Program ve Bildiri Kitabı, s: 126-7.
3. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. Br J Haematol 2004; 126(3): 289-97.
4. Aydoğan S, Kuştimur S, Kalkancı A. İnvazif aspergilloz oluşturulan sıçanlarda gluklan ve galaktomannan testleri ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarının karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2010; 44(3): 441-52.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard. Document M38-A2. 2008, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA.
6. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2010; 23(2): 299-323.
7. Pihet M, Carrere J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis-a review. Med Mycol 2009; 47(4): 387-97.

8. Ener B. Fırsatçı mikozların tanısında yeni gelişmeler. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Eylül 2006, Belek, Antalya. Kongre Kitabı, s: 9-12.
9. 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(12): 1813-21.
10. Hummel M, Buchheidt D. Molecular and serological diagnosis of invasive aspergillosis: new answers to old questions. Mycoses 2007; 50(Suppl 1): 18-23.
11. Luong ML, Filion C, Labbe AC, et al. Clinical utility and prognostic value of bronchoalveolar lavage galactomannan in patients with hematologic malignancies. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68(2): 132-9.
12. Hsu LY, Ding Y, Phua J, et al. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. BMC Infect Dis 2010; 10: 44.
13. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. Clin Chest Med 2009; 30(2): 367-77.
14. Steinbach WJ. Invasive aspergillosis in pediatric patients. Curr Med Res Opin 2010; 26(7): 1779-87.
15. Hayden R, Pounds S, Knapp K, et al. Galactomannan antigenemia in pediatric oncology patients with invasive aspergillosis. Pediatr Infect Dis J 2008; 27(9): 815-9.
16. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-D-glucan 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(2): 199-205.
17. Racil Z, Kocmanova I, Weinbergerova B, et al. Detection of 1,3-beta-D-glucan for diagnosis of invasive fungal infection in hematooncological patients: usefulness for screening of invasive mycosis and for confirmation of galactomannan positive results. Klin Mikrobiol Infekc Lek 2009; 15(2): 48-57.
18. Metan G, Koc AN, Atalay A, et al. 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(5): 330-6.
19. Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, et al. Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. Am J Hematol 2003; 72(1): 27-30.
20. Ahmad S, Khan ZU, Theyyathel AM. Diagnostic value of DNA, (1-3)-beta-D-glucan, and galactomannan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with *Aspergillus terreus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59(2): 165-71.
21. Martin-Mazuelos E, Peman J, Valverde A, Chaves M, Serrano MC, Canton E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and E test with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. J Antimicrob Chemother 2003; 52(3): 365-70.
22. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of E-test and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1126-9.
23. Guinea J, Pelaez T, Alcalá L, Bouza E. Correlation between the E-test and the CLSI M-38 A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(3): 273-6.
24. Martos AI, Romero A, Gonzalez MT, et al. Evaluation of the E-test method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. Med Mycol 2010; 48(6): 858-61.
25. Kuştimur S. Antifungaller. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 21-25 Ekim, Bodrum, Muğla. Kongre Kitabı, s: 381-5.