



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

İNVAZİF ASPERGİLLOZ TANISINDA GALAKTOMANNAN,
BETA-GLUKAN ve PCR ile ÖZGÜL DNA ARANMASININ
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Gülçin BÖLÜK

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2013



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**İNVAZİF ASPERGİLLOZ TANISINDA GALAKTOMANNAN,
BETA-GLUKAN ve PCR ile ÖZGÜL DNA ARANMASININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Gülçin BÖLÜK

Danışman: Prof. Dr. Beyza ENER

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2013

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	13
Bulgular.....	17
Tartışma ve Sonuç.....	25
Kaynaklar.....	32
Teşekkür.....	40
Özgeçmiş.....	42

ÖZET

Aspergillus türleri insanlarda farklı klinik tablolar oluşturmaktadır. İnvazif aspergillozun (IA) klinik bulgular özgül olmayıp, konvansiyonel yöntemler hastalığı belirlemede yeterli değildir. Bu nedenle hasta örneklerinde *Aspergillus*'a özgü galaktomannan (GM) ve beta glukan (BG) ve özgül DNA'nın aranması yeni tanı yaklaşımları olup, bu çalışmada hematolojik malinitesi olan hastalarda bu testlerin tanı değeri araştırılmıştır.

Uludağ Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Kliniği'nde yatırılarak takip edilen ve IA açısından riskli 70 hastanın, GM ve/veya BG bakılmış ve -80°C'da saklanmış serumlarında özgül DNA aranmıştır. Hasta grubuna ait örneklerinin direkt mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları, GM indeksleri ve BG düzeyleri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. GM ve/veya BG pozitif hastaların seri örneklerden ilk pozitif olanı, negatif hastaların seri örneklerinden ise ortanca olanı, "real-time polimerase chain reaction" (RT-PCR) yöntemiyle DNA düzeyini tespit etmede kullanılmıştır. Direkt mikroskopik inceleme, kültür, GM ve BG sonuçlarına göre hastalar, "European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group" (EORTC/MSG) kriterlerine göre gruplandırılmış ve gruplara göre *Aspergillus* DNA testinin özgüllük ve duyarlılığı diğer testlerle karşılaştırılmıştır.

Çalışma grubunu oluşturan 70 hastanın, 57 tanesinde IA açısından klinik bulgular varken, 13 tanesinde herhangi bir klinik bulgu tespit edilmemiştir. Klinik bulgusu olan hastaların 21'i (%36,8) direkt mikroskopik inceleme ve kültür ile kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı IA olarak değerlendirilirken, GM ve BG testlerinin eklenmesi ile bu sayı 40'a (%70,2) çıkmıştır. Sonuçta, IA açısında 40 hasta gerçek grup, 17 düşük olasılıklı IA ve 13 non-IA olmak üzere toplam 30 hasta IA olmayan olarak alındığı zaman GM, BG ve özgül DNA testinin duyarlılığı sırasıyla %90, %68,4, %90; özgüllüğü ise sırasıyla %100, %92,6, %73,3 olarak bulunmuştur.

IA tanısı güç olan bir hastalık olup, bu çalışmada RT-PCR ile GM testi kadar yüksek duyarlılık elde edilebilmiş ve GM ve BG testleri ile beraber tanıyı güçlendirecek test olduğu sonucunda varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Galaktomannan, beta-glukan, real-time PCR

SUMMARY

Comparison of Galactomannan, Beta-glucan and Specific DNA Search with PCR in Invasive Aspergillosis

Aspergillus species, generate different clinical pictures in humans. Clinical findings of invasive aspergillosis (IA) are not specific and conventional methods are not sufficient to detect the disease. Thus, searching for *Aspergillus* specific galactomannan (GM), beta glucan (BG) and DNA constitute new approaches for treatment and in this study, the diagnostic value of these tests were analyzed in patients with hematological malignancy.

GM and/or BG were searched in 70 patients who were followed in Uludag University Hospital, Hematology Clinic and who were at high risk for IA and specific DNA was looked after in sera that were kept at -80°C in the Medical Microbiology Department. Results of direct microscopic examination and culture of samples, GM indices and BG levels were evaluated retrospectively by abstracting from laboratory records in the patient group. The first positive sample of GM and/or BG positive patients and median sample of those with negative GM and/or BG were used to detect the DNA level by “real-time polimerase chain reaction” (RT-PCR) method. Patients were grouped according to the “European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group” (EORTC/MSG) criteria and specificity and sensitivity of the *Aspergillus* DNA test was compared to the other tests.

Fifty-seven out of the 70 patients in the study group had clinical findings corresponding to IA, whereas no clinical findings were detected in 13 cases. While 21 of (36,8%) the patients with clinical findings were evaluated as proven or probable IA using microscopic examination and culture, this number reached to 40 (70,2%) by adding the GM and/or BG tests. When 40 patient who were considered-real-group and 30 patients (17 patients with

possible IA and 13 patients with non-IA) who were considered without IA, were taken into account, sensitivity of the GM, BG and specific DNA test was 90%, 68,4% and 90%, respectively, and specificity was 100%, 92,6%, 73,3%, respectively.

IA is a difficult disease to diagnose and in this study, it has been possible to assess high sensitivity with the RT-PCR and GM test and it was concluded that, together with GM and BG tests, it can enhance the diagnosis.

Key words: galactomannan, beta-glukan, real-time PCR

GİRİŞ

Kingdom fungi içinde yer alan mantarlar, doğada yaygın olarak bulunan ökaryotik yapıda ve klorofil içermeyen canlılar olup, fotosentez yapamama özellikleri ile bitkilerden, hücre duvar yapıları ile hayvanlardan ayrılırlar. Zorunlu aerob ya da fakültatif anaerob organizmalardır. Antijenik özelliğe sahip hücre duvarı, hücreye şeklini verip hücreyi dış etkenlerden korur. Hücre zarı fosfolipit, protein ve sterolden zengin olmakla birlikte, kolesterol yerine ergosterol ve zimosterol içermesi ile memeli hücre zarından farklılık gösterir. Hücre zarı sitoplazmayı korur, madde alışverişini düzenler ve ayrıca kapsül ve hücre duvarının sentezine yardımcı olur (1-3). Doğada >250 000 mantar türü olduğu tahmin edilmektedir. Genellikle toprakta yaşayan, eşeyli ve eşeysiz sporları ile çoğalan canlılar olup, sporların hava akımı ile yer değiştirmesi sonucu dağılırlar. En önemli işlevleri organik atıkların parçalanması ve yapı taşlarının doğaya tekrar kazandırılmasıdır. Esas olarak fitopatojen olan mantarların çok az bir kısmı insanda hastalık oluşturur ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açar (3,4). İnsanlarda fırsatçı enfeksiyon oluşturan mantarlar arasında *Candida* ve *Aspergillus* türleri ilk sıraları almaktadır.

I. *Aspergillus* Türlerinin Taksonomideki Yeri

Mantarların sınıflandırılmasında eşeyli üreme (biyolojik sınıflama) esastır. Eşeyli üreme şekillerine göre yapılan sınıflamada mantarlar *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota* olmak üzere dört bölümde incelenir. *Aspergillus* türleri, teleomorfları (eşeyli üreyen şekilleri) *Ascomycota* bölümünde yer alan küf morfolojisine sahip mantarlardır. Bununla beraber in vitro koşullarda eşeyli üreme sporlarını göstermek kolay olmamakta ve sınıflamada mantarların eşeysiz üreme morfolojilerinden yararlanılmaktadır. Eşeysiz üreme morfolojilerine göre mantarlar; mayalar, hyphomycetes ve coelomycetes olmak üzere üç

kısımdan oluşmaktadır. Mayalar tek hücreli, tomurcuklanarak çoğalan ve yalancı hifler oluşturan mantarlarken, diğer iki grup gerçek hif yapan küf mantarlarıdır. Coelomycetes mantarlarında, sporları taşıyan özelleşmiş kese benzeri yapılar görülürken, hyphomycetes mantarlarında bu tarz özelleşme yoktur. *Aspergillus* türlerinin eşeysiz üreyen şekilleri hyphomycetes grubunda toplanmıştır ve 180-200 civarında tür olduğu düşünülmektedir (2).

Tablo-1'de *Aspergillus* türlerinin eşeyli (biyolojik) ve eşeysiz (yapay) üreme özelliklerine göre oluşturulmuş sınıflaması görülmektedir. Biyolojik sınıflama esas olmakla beraber, bahsedildiği gibi eşeyli üremeyi sağlamak kolay olmadığından ve eşeyli üremede kullanılan isimler (*Aspergillus* yerine *Emericella* veya *Eurotium* gibi) yaygın olarak bilinmediğinden tercih edilmez. Eşeysiz üreme morfolojisine dayanan yapay sınıflamada ise tür düzeyinde tam tanımlama sağlanamaz ve Tablo-1'de de görüldüğü gibi seksiyonlar şeklinde ifade edilir. Herhangi bir seksiyonda morfolojik olarak birbirinden iyi ayrılamayan birden fazla tür olabilir. Örneğin *Fumigati* seksiyonunda bulunan *A. fumigatus* ile *A. clavatus* arasında %80 ve *A. fumigatus* ile *N. fischeri* arasında %94 oranında benzerlik vardır. Tam ayırım moleküler yöntemlerle ve özellikle rDNA, translasyon faktör ve elongasyon 1 α gibi gen dizilerini karşılaştırarak yapılmaktadır (2-6). Çok sayıda *Aspergillus* türü olmakla beraber insanda hastalık oluşturan türler sınırlıdır ve *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* sıklıkla karşımıza çıkan türlerdir (6-8).

Tablo-1: *Aspergillus* türlerinin sınıflaması.

Biyolojik sınıflama	Yapay sınıflama
Kingdom Fungi	Hyphomycetes sınıfı
<i>Ascomycota</i> bölümü	• <i>Fumigati</i> seksiyonu
<i>Euascomycetes</i> sınıfı	– <i>A. fumigatus</i>
<i>Eurotiales</i> takımı	– <i>N. fischerii</i>
<i>Trichocomaceae</i> ailesi	– <i>A. lentilus</i>
– <i>Emericella</i> cinsi	• <i>Flavi</i> seksiyonu
– <i>Eurotium</i> cinsi	– <i>A. flavus</i>
– <i>Fennellia</i> cinsi	• <i>Nigri</i> seksiyonu
– <i>Neosartorya</i> cinsi	– <i>A. niger</i>
– <i>Petromyces</i> cinsi	• <i>Terrei</i> seksiyonu
	– <i>A. terreus</i>
	• <i>Nidulantes</i> seksiyonu
	– <i>A. nidulans</i>

II. *Aspergillus* Türlerin Morfolojik Özellikleri

Aspergillus türleri birçok besiyerinde 20-40°C'da, 48-72 saat içinde kolaylıkla üreyebilen küf mantarlarıdır. Tür ve üreme şartlarına bağlı olarak siyah, kahverengi, yeşil, sarı, kırmızı veya diğer renklerde pamuksu, yünsü, kadifemsi yaygın koloniler oluşturur (3, 9-12).

Septalı hiyalen hifler (3-6µm genişliğinde) ve eşeysiz ve eşeyli sporları mikroskopik morfolojiyi oluşturur. Spor oluşturmak üzere özelleşen hiflere konidyafor denir ve uç kısmında genişleyerek *Aspergillus* türlerine özgü olan vezikülü oluşturur. Vezikülden, tek sıralı (uniseriate) olanlarda direkt fialidler, çift sıralı (biseriate) olanlarda ise metula ve üzerinde fialidler gelişir. Fialidler konidya (2-5µm) adı verilen eşeysiz sporları doğuran yapılardır. Fialidlerden basipedal (en yenisi en altta) tarzda konidyalar oluşur ve zincir şeklinde uzar. (Şekil-1) Eşeyli sporlarına askospor denir ve özel bir hifin üzerindeki askus denen keselerde yer alır. Çoğu türde askus içinde sekiz spor bulunur (3, 11, 12).



Şekil-1: *Aspergillus* başının mikroskopik görünümü.

Aspergillus türlerinin tanımlanmasında üreme hızı, üreme ısısı gibi fizyolojik özellikler ve koloni görünümü ve mikroskopik yapılar gibi morfolojik özelliklerden yararlanır. Koloninin rengi, yaygınlığı ve dokusu, koniyaforun uzunluğu ve dokusu, vezikülün şekli ve büyüklüğü, tek sıralı ya da çift sıralı başın olması, konidyalardan boyutu ve dokusu tanımlamada kullanılan özelliklerdir.

III. *Aspergillus* Türlerinin Yaygınlığı

Aspergillus türleri doğada en yaygın bulunan mantarlar olup, endemik bölgeleri yoktur. Doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyali olup karbon ve nitrojen döngüsünde önemli rol alırlar. Topraktan havalanan sporlar asılı olarak kalır ve hava akımı ile yayılır. Havadaki yoğunlukları değişken olup, mevsimsel farklılıklar olabilir. Yapılan bir çalışmada, dış havadaki konidya sayısının ortalama $45/m^3$ olduğu saptanmıştır (13). Bursa'da ev dışı havada *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise hava örneklerden üretilen tüm

mantarlar içerisinde *Aspergillus* türlerinin %3,7 oranında bulunduğu bildirilmiştir (14). *Aspergillus* türleri içerisinde özellikle *A. fumigatus* yüksek (45°C) ve düşük (2-8°C) sıcaklıklara dayanıklı bir türdür ve yüksek sıcaklıklara çıkılan gübre yapım yerlerindeki konsantrasyonu 10⁶ CFU/m³'e kadar yükselebilir (15). Ayrıca buzdolabında üreme yeteneği ile gıda maddelerini kontamine eder. İkinci sıklıkta karşılaşılan tür olan *A. flavus*, esas olarak bitki patojenidir ve zirai kayıplara yol açabilir. Karsinojen etkili aflotoksini gıdalar ile alındığında tehlike oluşturabilir (3,16).

IV. *Aspergillus* Türlerinin Oluşturduğu Klinik Tablolar

Aspergillus türleri toksik-alerjik hastalıklardan yaygın invazif hastalıklara kadar çok değişik klinik tablolarasebep olabilir. Toksik-alerjik hastalıklar dışındakiler aspergilloz olarak adlandırılır. Tablo-2'de *Aspergillus* türleri tarafından oluşturulan hastalıklar özetlenmiştir. En önemli ve mortal olan invazif enfeksiyonlar daha çok genel durumu bozuk bağımsızlığı baskılanmış hastalarda görülürken diğer tablolar immunkompetan kişilerde de görülebilir. Hematolojik maliniteler başta olmak üzere tüm kanser hastaları, kemik iliği ve organ nakli olan hastalar, kistik fibröz, oto-immun ve kronik granülomatöz hastalığı olanlar invazif aspergilloz (IA) açısından risk altında olan hastalardır. Nötropeni, graft versus host hastalığı (GvHD), kortikosteroid kullanımı, radyoterapi, kemoterapi, eklenen CMV enfeksiyonları, eşlik eden kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) ve diabetes mellitus (DM) bu hastalardaki önemli risk faktörleridir (17). IA, en fazla havadaki konidyumların solum yollarından alınması ile oluşur. Pulmoner ve sino-orbital enfeksiyonlar invazif enfeksiyonlar arasında en sık görülenidir. Hastalık kontrol edilemezse başta merkezi sinir sistemi tutulumu olmak üzere tüm vücuda yayılır (8,18). Yabancı cisme (kontak lens, şant, protez, diyaliz kateteri gibi) bağlı olarak veya cerrahi sonrası gelişen enfeksiyonlar daha çok lokal kalır ve bu odaklardan yayılma azdır. Ayrıca tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi ve pnömonilerin ardından akciğerlerde oluşan kaviterlerin *Aspergillus* hifleri ile dolması sonunda aspergilloma

denilen klinik tablo meydana gelir. Aspergillomalı hastalar çoğunlukla asemptomatik olmakla beraber, dispne, göğüs ağrısı, ateş gibi non-spesifik semptomlar da görülebilir (3,7,19).

Tablo-2: *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar

- Toksik hastalıklar
 - Mikotoksin (Aflotoksin)
- Alerjik hastalıklar
 - Alerjik sinüzit, Alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA)
- *Aspergillus* kolonizasyonu
 - Aspergilloma
- Lokal enfeksiyonlar
 - Keratit, sinüzit, otit, yara enfeksiyonları, protez, şant ve cerrahi sonrası gelişen enfeksiyonlar
- İnvazif enfeksiyonlar
 - Pulmoner enfeksiyonlar
 - ✓ İnvazif trakeabronşit
 - ✓ Akut invazif pulmoner aspergilloz
 - ✓ Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz
 - Sino-orbital enfeksiyonlar
 - Dissemine enfeksiyonlar

IA mortalitesi en yüksek olan klinik tablodur ve olguların büyük bir kısmından *A. fumigatus* sorumludur. Özellikle 1990'lı yılların ikinci yarısından 2000'li yılların ilk yarısına kadar görülme sıklığı giderek artmış ve mortalite %80-90'lara ulaşmışken, 2000'li yılların ikinci yarısından sonra görülme sıklığı ve mortalitede düşme eğilimi olmuştur. Vorikonazol ve posakonazol gibi daha etkili antifungal ajanların gündeme gelmesi, kanser tedavisi ve transplant rejimlerindeki değişiklikler, CMV takibinin daha iyi yapılabilmesi, çevrenin daha iyi korunabilmesi ve tanı yöntemlerindeki gelişmeler düşme eğilimine etkili olmuş faktörlerdir (20,21). IA, allojenik kök hücre nakli yapılanlarda ve hematolojik malinitelerde birinci sırada görülen mikozdur.

Görülme oranı invazif kandidozu (IK) geçmiş ve olguların %40-60'ını oluşturmuştur. Solid organ nakillerinde ise halen ilk sırada görülen mikoz IK'dur (22-24).

V. İnvazif Aspergillozda Tanı

IA'un erken ve doğru tanısı hastaların yaşamlarını etkileyecek önemli bir faktör olmakla beraber diğer enfeksiyonlardan farklı özgül bir klinik bulgusunun olmaması problem oluşturmaktadır. Bu nedenle antibakteriyal tedaviye yanıt vermeyen ve ateşi düşmeyen nütropenik hastalara amprik antifungal tedavi verme uzunca süredir uygulanan bir yaklaşımdır. Ancak son yıllarda, hasta örneklerinin direkt mikroskopik inceleme ve kültürü dışında, yüksek çözünürlükte bilgisayarlı tomografi (HRCT) ve biyolojik belirteçlerin (galaktomannan (GM), β -glukan (BG) ve özgül nükleik asit aranması gibi) kullanılması ile daha erken ve daha doğru tanıya ulaşmak mümkün olmakta ve ampirik tedavi yaklaşımı yerine preemtif ya da kanıtlanmış tedavi yaklaşımı artmaktadır (25,26).

V.A. Yüksek Çözünürlükte Bilgisayarlı Tomografi

İnvazif pulmoner aspergillozun (IPA) tanısında oldukça yarar sağlayan bir yöntemdir. Hastalığın ilk beş günü içinde oluşan "halo belirtisi" olguların %60-80'ninde bulunur ve riskli hastalar için oldukça tipik olmakla beraber geçici bir bulgudur. Olguların çoğunda tespit edilen ise beşinci günden sonra görülmeye başlayan non-spesifik konsolidasyon bulgusudur. Hastalığın son dönemlerinde ise olguların yaklaşık %50'sinde kavitasyonlar ve hava-sıvı seviyeleri oluşur. Geç bir bulgudur ve bu nedenle hastanın yaşamı açısından yarar sağlamaz (27,28).

V.B. Örneklerin Direkt Mikroskopik İncelemesi ve Kültür

Direkt mikroskopik inceleme ve kültür, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olmasa da IA tanısında vazgeçemeyeceğimiz konvansiyonel yöntemlerdir. Direkt mikroskopik inceleme tanı için hızlı bilgi oluştururken, kültür epidemiyolojik veri elde etmemize ve duyarlılık çalışabilmemize olanak sağlar. Kan kültürlerinin IA tanısında yeri yoktur ve en fazla bulaş inhalasyon

ile olduğundan solunum yolu örnekleri (balgam, bronkoskopik örnekler, trekeal aspiratlar) sık kullanılan örneklerdir (27). Bronkoskopi ile elde edilen örnekler balgama göre daha değerli olsa da direkt mikroskopik inceleme ve kültürün tanı için duyarlılığı %50'nin üzerinde değildir (29-33). Ayrıca solunum yolu örneklerinden *Aspergillus* türlerinin üretilmesi geçici bir kolonizasyona bağlı da olabilir. Yapılan çalışmalarda bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde IA gelişmeksizin %5-73 oranında *Aspergillus* türlerinin üreyebileceği gösterilmiştir (33,34). Bununla beraber yüksek riskli hastalarda kültürün pozitif prediktif değeri %80'lere kadar yükselmektedir (35,36). Kültür ve mikroskopik inceleme için en değerli örnek hiç şüphesiz ki doku biyopsileridir. Ancak ileri derecede trombositopenik olan bu hasta grubunda biyopsi almak kolay değildir.

V.C. Direkt Mikroskopik İnceleme ve Kültür Dışı Yöntemler

Başta serum olmak üzere hasta örneklerinde, hücre duvar antijenleri (GM ve BG) ve özgül nükleik asitlerin aranması kültür dışı yeni tanı yöntemleri olarak son yıllarda gündeme gelmiştir (37).

V.C.a. Galaktomannan Testi

GM antijeni, *Aspergillus* türlerinin hücre duvarında bulunan ve ekstrasellüler olarak da salgılanabilen bir moleküldür. Doksanlı yılların başında molekülün analizi yapılmış ve 1994 yılında bu moleküle karşı monoklonal antikor oluşturulmuştur (38-41). Bu monoklonal antikor yardımıyla IA tanısında başta serum olmak üzere BAL, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve idrar gibi farklı örneklerde GM antijeni aranmaya başlanmıştır; 1999 yılında Avrupa'da EIA kiti (Platelia *Aspergillus*; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) haline getirilmiş ve 2003 yılında ise Food and Drug Administration (FDA) tarafında IA tanısında serumda kullanılmak üzere onay almıştır (42,43). Kit en az 0.5 ng/ml GM tespit edebilmektedir. İmmün baskılanmış hastalarda kemoterapiye başlandığında haftada en az iki kere testin yapılması ve üst üste gelen örnekte iki pozitiflik bulunduğu zaman testin IA açısından olumlu kabul edilmesi önerilmiştir (44,45).

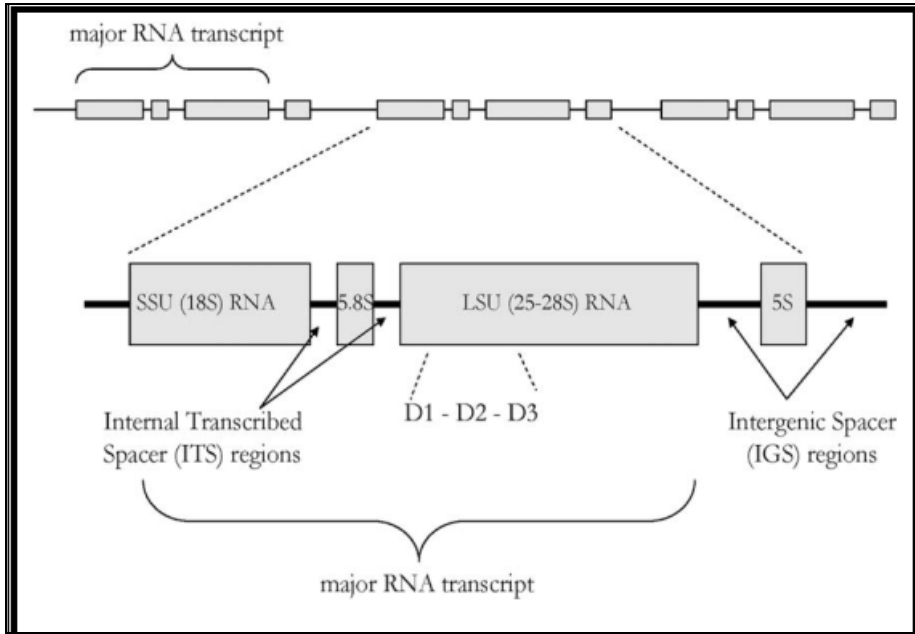
V.C.b. Beta-glukan Testi

BG antijeni sadece *Aspergillus* türlerine özgül olmayıp *Cryptococcus neoformans* ve *Zygomycetes* sınıfı mantarlar hariç birçok mantarın hücre duvarında bulunan bir komponenttir. Özellikle Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 2000'li yıllardan sonra konu ile ilgili çalışmalar yoğun olarak başlamıştır (46-50). BG, büyük okyanus kıyılarında yaşayan "horseshoe crab" denilen canlıların amebositlerinden degranülasyonu ve açığa çıkan serin prateaz zimogenlerin (faktör G) aktive olmasını sağlayan bir maddedir. Aktif hale gelen zimogenler koagülasyon enzimlerini harekete geçirir. Bu özellikten yararlanılarak önce Japonya'da (Wako Pure Chemical Industries, Tokya) ve daha sonra ABD'de (Fungitell assay; Cape-Cod Inc, ABD) kitler geliştirilerek kullanıma sokulmuştur. Her iki kit de birbirine benzer, kinetik okuma yapan spektrofotometrik bir yöntemle (Limulus test=LAL test) çalışmaktadır. Bu test 2006 yılında, IA da dahil invazif fungal enfeksiyonlarının (IFE) tanısında kullanılmak üzere FDA'dan onay almıştır. Aynen GM testi gibi, bağışıklığı baskılanmış hastalarda kemoterapiye başlandığında haftada en az iki kere testin yapılması önerilmiş ve üst üste gelen iki örneğin pozitif olması IFE açısından anlamlı kabul edilmiştir (51,52).

V.C.c. Hasta Örneklerinde Özgül Nükleik Asit Aranması

Hasta örneklerinde özgül nükleik asit (DNA) aranması, IA tanısında kullanılan kültür dışı bir diğer yöntemdir. Duyarlılığının yüksek olması ve kısa sürede tamamlanması açısından "polymerase chain reaction"nun (PCR) çeşitli formatları bu amaçla kullanılmaktadır. Standart PCR, nested PCR ve son yıllarda, kontaminasyonun daha az olması ve mantar yükünü kantitatif olarak gösterebilmesi nedeniyle real-time (RT) PCR, en fazla tercih edilen PCR yöntemleridir (53). PCR yöntemi ile tanıda, saptanacak hedef genin *Aspergillus* cinsi ya da türleri için yeterince özgül ve duyarlı ve çok sayıda olması önemli noktalardır ve bu özellikleri en fazla kapsayan rDNA genleridir. Şekil 2'de ökaryot hücrelerdeki rDNA bölgesi görülmektedir. Bu bölge dört gen (18S, 5.8S, 25-28S, 5S) ve "internal transcribed spacer" (ITS1 ve ITS2) ve "intergenic spacer" (IGS) olmak üzere ara kısımlardan oluşmaktadır. ITS1, ITS2, 25-28S kısmının D1 ve D2 kısımları ve 25-28S kısmına komşu

olan IGS bölgesi *Aspergillus* türlerini ayırabilecek ve tanımlayabilecek kısımları oluşturmaktadır (54-56). Ancak IA tanısında hangi tür ile enfeksiyonun geliştiği bilinemediğinden tüm *Aspergillus* türlerinin kapsayacak (pan-*Aspergillus*) 18S bölgesinden çoğaltmanın yapılmasını daha doğru bulanlar da vardır (57,58). Bu genler dışında yine sayıca fazla olması nedeniyle mitokondri, alkalin proteaz, 18K_D IgE-bağlayan protein ve çeşitli toksin genleri de çalışmalarda kullanılmıştır (59-61).



Şekil-2: Ökaryot rDNA bölgesi

PCR formatı ve hedef genin seçilmesi dışında uygun ve yeterli miktarda hasta örneği ve DNA ekstraksiyon yöntemi diğer önemli teknik noktalardır. Tam kan, serum, plazma, BAL, BOS ve taze ya da parafin içindeki dokular çeşitli çalışmalarda kullanılmış hasta örnekleridir. Bunlar arasında en kolay alınabilecek ve invazyonu gösterebilecek olan örnek kan örnekleridir. Ancak tam kan, serum veya plazma seçimi konusunda kararsızlık devam etmekte, kimi araştırmacı tam kanı daha üstün bulurken, kimi araştırmacı aynı örnekte GM ve BG çalışılmasına olanak sağladığı için serum ya da plazmayı üstün bulmaktadır (53).

Mantarlar kalın bir hücre duvarına sahip oldukları için DNA ekstraksiyonu önemli bir sorundur. DNA ekstraksiyonu amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber, en fazla tercih edilen hücre duvarının, cam boncuklarla mekanik olarak veya litikaz enzimi ile muamele edilerek ya da ikisini beraber uygulayarak uzaklaştırılmasıdır. Günümüzde manuel ekstraksiyon yanı sıra ticari kitlerle ekstraksiyon yapmak mümkündür. Kontaminasyon ihtimalinin daha az olması nedeniyle ticari kitle ekstraksiyon yapmak önerilebilir (53,62-64).

Klinik örneğin miktarı da diğer önemli bir sorundur. Serum ve plazma gibi fazla tercih edilen örnekler, çeşitli çalışmalarda 200µl-10 ml arasında kullanılmıştır. Periferik kandaki mantar yükü genellikle <10CFU/ml olduğundan az miktarda örnekle çalışmak yeterli olmayabilir. Fazla miktarda örnek almak ise başta çocuklar olmak üzere bazı hastalarda zor olmaktadır (53).

PCR yöntemi oldukça duyarlı bir yöntem olarak görülse de en önemli sorun kontaminasyon ve yalancı pozitifliklerdir. RT-PCR yöntemi, ticari ekstraksiyon kitleri, biyolojik kabinlerde çalışma, tamamen steril malzemelerin kullanılması kontaminasyonu azalmak için başvurulan yollardır. Ancak *Aspergillus* türlerinin çok yaygın olduğu ve örneğin alınmasından laboratuvara ulaşana kadar süren süreçte bile kontaminasyonun olabileceği unutulmaması gereken bir durumdur (53).

Hasta örneklerinde IA tanısını sağlayacak özgül DNA'nın aranması, 1990 yıllardan beri çok sayıda çalışmada denenmiş ve iyi sonuçlar elde edilmiştir. Buna rağmen özgül DNA aranması GM veya BG testi gibi yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Yöntemin standardizasyon ve validasyonunun yapılmamış olması ve çok merkezli olarak denenememesi bunun en önemli nedenleridir (65). Tanı ile ilgili olan ve antifungal stratejilerini belirleyen çalışmalarda bir standart sağlamak üzere IFE'lar, "European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG)" tarafından 2002 yılında kategorize edilmiştir. Riskli hastalar için kanıtlanmış, yüksek olasılıklı (YO) ve düşük olasılıklı (DO) IFE kriterleri belirlenmiştir (66). Daha sonra 2008 yılında kriterler yeniden gözden

geçirilmiş ve IA tanısında GM ve BG testlerinin serum ve BAL örneklerinde çalışılması önerilirken, bahsedilen nedenlerden dolayı özgül DNA'nın çalışılması dahil edilmemiştir (67). Bununla birlikte yöntemin standart hale getirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (68,69).

Bu çalışmada da IA açısından risk altında olan hematolojik maliniteli hastalarda serumda özgül DNA varlığının kültür/direkt mikroskopik inceleme, GM ve BG testleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır, özgül DNA varlığının diğer testlere göre özgüllük ve duyarlılık açısından yeterliliği incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 25.01.2011 tarih ve 2011-3/19 sayılı kararda alınan izin ile yapılmıştır.

I. Hasta Serumları

Bu çalışmada; Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji Kliniği'nde yatırılarak takip edilen ve IA açısından riskli 70 hastanın, GM ve/veya BG bakılmış ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda -80°C'da saklanmış serumlarında özgül DNA aranmıştır.

II. Hasta Örneklerinin Direkt Mikroskopik İncelemesi ve Kültür

Hasta grubuna ait balgam, BAL, BL ve trekeal aspirat (TAS) gibi solunum yolu ve doku biyopsi örneklerinin direkt mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı kayıtlarından alınarak retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Direkt mikroskopik incelemesi pozitif olan bütün örneklerdeki üremeler anlamlı kabul edilirken, direkt mikroskopik incelemesi negatif olan örneklerde anlamlılık için aynı türün, birden fazla örnekte üremesi koşulu aranmıştır.

III. Galaktomannan Antijen Testi

Hastanemizde GM antijeni; hematolojik malinite ile yatırılan hastaların, kemoterapi başlanması ile beraber haftada iki kez alınan serumlarında, tek basamaklı sandviç EIA yöntemi ile çalışan Platelia *Aspergillus* kiti (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) kullanılarak taranmaktadır (Şekil-3). Bu çalışmada da hasta grubunun serum

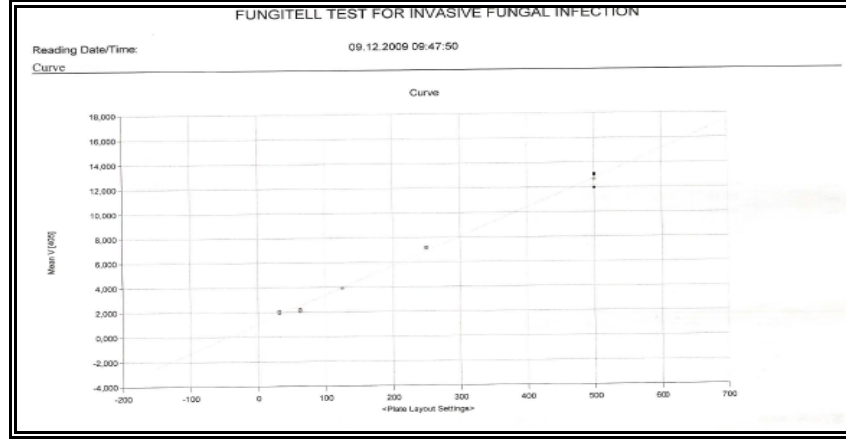
galaktomannan indeksleri retrospektif olarak değerlendirilmiş ve seri olarak haftada iki kez galaktomannan çalışılan hastalarda indeks değeri art arda iki kez >0.5 olanlar IA açısından anlamlı kabul edilmiştir.



şekil-3: Platelia *Aspergillus* kiti

IV. Beta-Glukan Testi

Aynen GM antijen taraması gibi, kemoterapi başlanan çalışma grubu hastalarından haftada iki kez alınan seri serum örneklerinde kinetik/spektrofotometrik yöntemle çalışan kit ile (Fungitell assay; Cape-Cod Inc, USA) BG düzeylerine bakılmış ve sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Standartlar kullanılarak elde edilen grafiğe göre (şekil-4) hasta örneklerindeki BG miktarı hesaplanmış ve art arda gelen iki örneğin $\geq 60\text{pg/ml}$ olması durumunda hasta İFE olarak değerlendirilmiştir.



Şekil-4: BG standartlar ile oluşturulan eğri

V. Özgül Nükleik Asit (DNA) Aranması

Bahsedildiği gibi, daha önce GM ve/veya BG bakılmış hastaların -80°C'da saklanmış serumları özgül DNA aranması için kullanılmıştır. GM ve/veya BG pozitif hastaların seri örneklerdeki ilk pozitif olanı, negatif hastaların seri örneklerinden ise ortanca olanı, RT-PCR (Light Cycler 480 Instrument; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) yöntemiyle DNA düzeyini tespit etmede kullanılmıştır.

Örneklerden DNA ekstraksiyonu ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kiti (Zymo Research; Cat n0:D6005; ABD) kullanılarak yapılmıştır. İçinde 0,5mm çaplı boncuklar olan tüpe, 200µl serum örneği 750µl lizis solüsyonu konarak 2000 devirde 45sn (manga lyser homojenizatör; Zymo Research; ABD) karıştırılarak hücre duvarının parçalanması mekanik/enzimatik olarak sağlanmıştır. Daha sonra 10.000g'de 1dk santrifüj işlemi ile çöktürülen örneklerin süpernatantlarından 400µl alınmış ve DNA ekstraksiyonu fast-spin kolon teknolojisi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Temiz ve saf DNA elde edilebilmesi için üretici firma tarafından sağlanan farklı tampon solüsyonları (DNA binding buffer, DNA pre-wash buffer, DNA wash buffer) çeşitli aşamalarda kullanılmış ve son aşamada 100µl DNA ellution buffer ile spin kolanda absorbe DNA'yı (yaklaşık 25µg) elde etmek mümkün olmuştur (70).

Ekstraksiyonu yapılan örneklerde *Aspergillus* DNA varlığı, RT-PCR cihazı (Light Cycler 480 Instrument; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) ile ticari bir kit (Way2Gene; Kat No: WG40-0270-16) kullanarak belirlenmiştir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan enzim ve primer-prob karışımından (LightCycler® 480 Probes Master; Cat.No 04707494001; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) 15µl alınarak 5µl DNA ekstraksiyonu yapılmış örnek ile karıştırılmış, 96 kuyucuklu plaklara (LC480 96 well plate white; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) 20µl olacak şekilde dağıtılarak 95°C'da 10 dakika ön inkübasyon ile denatürasyon sağlanmıştır. Ön işlemden sonra 95°C'da 5sn, 55°C'da 10sn ve 72°C'da 20sn olacak şekilde cihaz 45 döngüye ayarlanmış, negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Kırkıncı döngüden önce negatif kontrole göre eksponansiyel floresan artışı saptanan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif standartlar kullanılmadığı için DNA miktarının kantitasyonu yapılmamıştır.

VI. Sonuçların Değerlendirilmesi

Hasta grubuna ait direkt mikroskopik inceleme, kültür, GM ve BG sonuçları kayıtlardan sağlanmış ve her birinin IA tanısındaki değeri incelenmiştir. Bu parametreler kullanılarak hastalar EORTC/MSG kriterlerine göre kanıtlanmış, YO ve DO IA olarak gruplandırılmış ve gruplara göre DNA testinin özgüllük ve duyarlılığı hesaplanmıştır (67).

BULGULAR

I. Direkt Mikroskopik İnceleme ve Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen ve serumları saklanmış olan 70 hematolojik maliniteli nötropenik hastanın, 57 tanesinde IA açısından klinik bulgular (anamnez, fizik muayene ve görüntüleme bulguları) varken, 13 tanesinde herhangi bir klinik bulgu tespit edilmemiştir. Klinik bulgusu olan hastaların alınan biyopsi örneklerinin kültür ve mikroskopik incelemesi (histopatoloji ve boyasız inceleme) ile altı tanesinde (%10,5); solunum yolları örneklerinin (Balgam, BAL) kültür ve direkt mikroskopik incelemesiyle ise 15 tanesinde (%26,3) pozitiflik tespit edilmiştir. Tablo-3'de klinik bulguları olan ve mikroskopik inceleme ve kültür ile pozitif bulunan 21 hastadaki (%36,8) üremeler özetlenmiştir. Klinik bulgusu olmayan hastalardan herhangi bir örnekleme yapılmamıştır.

Tablo-3: Klinik bulgusu olan hastalardaki kültür pozitifliği

Hasta	Örnek	DMİ	Kültür
1	AC biyopsi dokusu	+	<i>A. flavus</i>
2	AC biyopsi dokusu	+	<i>A. flavus</i>
3	Nazal biyopsi dokusu	+	<i>A. flavus</i>
4	AC biyopsi dokusu	+	<i>A. fumigatus</i>
5	Nazal biyopsi dokusu	+	<i>A. flavus</i>
6	Plevra sıvısı	+	<i>A. flavus</i>
7	TAS	+	<i>A. flavus</i>
8	BAL	+	<i>A. fumigatus A flavus</i>
9	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
10	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
11	BAL	+	<i>A. terreus</i>
12	BAL	+	<i>A. fumigatus A terreus</i>
13	Balgam	+	<i>A. flavus</i>
14	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
15	BAL	-	<i>A. flavus</i>
16	BAL	+	<i>A. niger</i>
17	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
18	BAL	+	<i>A. flavus</i>
19	BAL	+	<i>A. fumigatus</i>
20	Balgam	-	<i>A. flavus</i>
21	BAL	-	<i>A. terreus</i>

AC: Akciğer; TAS: Trakeal aspirat; BAL: Bronkoalveolar lavaj

Tablo-3'de de görüldüğü gibi 21 örneğin 18'inde (%85,7) direkt mikroskopik inceleme pozitif bulunmuştur. Hastaların 12 tanesinde *A. flavus*, dört tanesinde *A. fumigatus*, iki tanesinde *A. terreus* ve bir tanesinde *A. niger* ürerken, iki hastada miks üreme olmuş ve toplam 13 *A. flavus*, altı *A. fumigatus*, üç *A. terreus* ve bir *A. niger* suşu izole edilmiştir.

II. Galaktomannan Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GM antijen taraması, çalışma grubunda bulunan bütün hastalarda seri olarak yapılmıştır. Direkt mikroskopik inceleme ve kültür pozitif olan 21 hastanın 18'inde GM antijeni de, art arda gelen iki serum örneğinde pozitif bulunmuştur. Serum GM düzeyi negatif kalan üç hastanın klinik ve görüntüleme bulgularının ciddi olarak IA düşündürmesi üzerine bronkoskopi yapılmış ve alınan BAL örneklerinde hem üreme hem de GM pozitifliği tespit edilmiştir.

Serum GM pozitifliği, örneklerinde herhangi bir üreme tespit edilmeyen 18 semptomatik hastada daha saptanırken, klinik bulgusu olmayan hastalarda pozitiflik olmamıştır. Tablo-4'de 57 IA açısından semptomatik hastadaki GM sonuçları ile kültür sonuçları karşılaştırılmaktadır. Tabloda da görüldüğü gibi GM testi hastaların %63,2'sinde tanıyı desteklerken, kültür %36,8'inde desteklemektedir.

Tablo-4: IA açısından semptomatik hastalardaki kültür ve GM testinin karşılaştırılması

	DMİ ve Kültür (+)	DMİ ve Kültür (-)	Toplam
GM (+)	18	18	36 (%63,2)
GM (-)	3	18	21
Toplam	21 (%36,8)	36	57

III. Beta Glukan Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BG; çalışma grubundaki 35 klinik bulgulu, 11 klinik bulgusu olmayan toplam 46 hastada seri olarak taranabilmiştir. Biyopsi örneklerinde üremesi olan hastalarda BG bakılamamıştır. Solunum yolları örneklerinde üremesi olan ve IA açısından semptomatik 12 hastanın 8 tanesinde BG da pozitif bulunmuştur. Serum BG düzeyi negatif kalan dört hastadan alınan BAL örneklerinin hepsinde üreme ve GM pozitifliği saptanmışken, BG üç örnekte pozitif bulunmuştur.

Üremesi olmayan ancak klinik bulguları olan beş hastada daha BG pozitifliği elde edilmiştir. Beş hastanın dört tanesinde GM da pozitif iken bir tanesinde negatif kalmıştır. Tablo-5'de klinik bulguları olan ve BG bakılmış 35 hastadaki kültür ile BG pozitifliği karşılaştırılmıştır. Tabloda da görüldüğü gibi BG testi hastaların %37,1'inde tanıyı desteklerken, kültür %34,3'ünde desteklemektedir.

Tablo-5: IA açısından semptomatik hastalardaki kültür ve BG testinin karşılaştırılması

	DMİ ve Kültür (+)	DMİ ve Kültür (-)	Toplam
BG (+)	8	5	13 (%37,1)
BG (-)	4	18	22
Toplam	12 (%34,3)	23	35

GM pozitifliği klinik bulgusu olmayan hastalarda tespit edilmemişken, BG çalışılmış ve klinik bulgusu olmayan 11 hastanın iki tanesinde (%18,2) BG testi art arda gelen ≥ 2 serum örneğinde pozitif olarak bulunmuştur.

Tablo-6'da hem GM hem de BG testi çalışılan ve klinik bulgusu olan hastaların (35 hasta) direkt mikroskopik inceleme ve kültüre göre pozitifliği görülmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi direkt mikroskopik inceleme ve

kültür ile 12 hasta (%34,3) IA açısından pozitif olarak değerlendirilirken, GM ve/veya BG pozitifliği ile bu sayı 19'a (%54,3) çıkmıştır.

Tablo-6: Semptomatik hastaların GM ve BG çalışılan örneklerinde (35 örnek) kültür pozitifliği

	DMİ ve Kültür (+)	DMİ ve Kültür (-)	Toplam
GM ve BG (+)	7	4	11
GM (+) BG (-)	2	2	4
GM (-) BG (+)	1	1	2
GM ve BG (-)	2	16	18
Toplam	12	23	35

IV. Özgül DNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bahsedildiği gibi GM ve/veya BG pozitif hastaların ilk pozitif serumlarında negatif hastaların ise seri alınan örneklerinin ortanca olanında özgül DNA aranmıştır. Doku tanısı olan altı hastanın hepsinin ilk GM pozitif serumlarında özgül DNA saptanmıştır. Solunum yolu örneklerinde üreme olan 15 hastanın 12 tanesinde DNA pozitif bulunurken üç hasta negatif kalmıştır. Negatif kalan hastaların iki tanesinde üreme yanı sıra GM ve BG pozitif iken bir hastada BAL örneğinde *A. terreus* üremesine rağmen hem GM, hem BG, hem de ortanca serum örneğinde özgül DNA negatif bulunmuştur. Üremesi olan hastaların bir tanesinde ise GM ve BG negatif kalırken sadece DNA saptanmıştır. Klinik bulgusu olup, üremesi olmayan ancak GM ve/veya BG pozitif olan 19 hastanın 18 tanesinde, DNA da pozitif bulunmuştur. Ayrıca klinik bulgusu olmasına rağmen üreme olmayan ve GM/BG testleri negatif kalan 17 hastanın dört tanesinde daha DNA pozitifliği saptanmıştır. Klinik bulgusu olan 57 hastanın 13 tanesinde IA lehine hiçbir pozitif bulgu elde edilmemiştir (Tablo-7).

Tablo-7: Semptomatik hastalarda GM/BG, DNA ve kültür pozitifliği

	DMİ ve Kültür (+)	DMİ ve Kültür (-)	Toplam
GM/BG (+) DNA (+)	17	18	35
GM/BG (+) DNA (-)	2	1	3
GM/BG (-) DNA (+)	1	4	5
GM/BG (-) DNA (-)	1	13	14
Toplam	21	36	57

IA lehine klinik bulgusu olmayan 13 hastada bahsedildiği gibi hiç GM pozitifliği olmaz iken dört örnekte DNA pozitif saptanmıştır.

V. Hasta Grubunun EORTC/MSG Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi

Tablo-8'de, bu çalışmada incelenen ve IA açısından riskli 70 hasta EORTC/MSG kriterlerine göre ispatlanmış, YO-IA, DO-IA ve non-IA olarak gruplandırılmıştır (67). Kriterler içinde DNA tespiti olmadığında tabloya DNA bulguları eklenmemiştir.

Tablo-8: EORTC/MSG kriterlerine göre hastaların gruplandırılması ve pozitiflik veriler

Hasta Grubu	Klinik bulgu	Histopatoloji (+)	DMİ ve kültür (+)	GM (+)	BG (+)^a
Kanıtlanmış IA (6)	6	6	6	6	6 ^b
YO-IA (34)	34	0	15	30	13 ^c
DO-IA (17)	17	0	0	0	0 ^d
Non-IA (13)	0	0	0	0	2 ^e
Toplam (70)	57	6	21	36	15

^aBG toplam 46 hastada çalışılmıştır; ^bçalışılmadı, ^c19 hastada çalışıldı, ^d16 hastada çalışıldı, ^e11 hastada çalışıldı

Kanıtlanmış hasta grubunun tamamında DNA tespit edilirken, YO-IA grubunda, GM testi gibi 30 tanesinde (%88,2) pozitiflik saptanmıştır. BG testi ise 34 YO-IA hastasının 19'unda çalışılmış ve 13 tanesinde (%68,4) pozitif bulunmuştur. Hem DO-IA ve hem de non-IA gruplarında dört hastada DNA testi pozitif bulunmuştur. Ancak pozitiflik oranları (%23,5 ile %30,8) arasında anlamlı bir fark bulunmadığından (p:0,7; κ^2 testi) ve DO-IA grubunda klinik bulgular olsa da diğer testler negatif kaldığından DNA pozitifliği anlamlı olarak değerlendirilmemiştir.

Kanıtlanmış ve YO-IA'lu hastalar (40 hasta) gerçek hasta grubu, DO-IA ve non-IA grubu (30 hasta) hasta olmayanlar olarak alındığında GM, BG ve DNA tespitinin özgüllük, duyarlılık, pozitif tanı ve negatif tanı değerleri Tablo-9'da görülmektedir.

Tablo-9: GM, BG, DNA tespitinin tanı değerleri

	Duyarlılık	Özgüllük	PPV	NPV
GM	%90	%100	%100	%85,7
BG*	%68,4	%92,6	%86,7	%80,6
DNA	%90	%73,3	%81,8	%84,6

*Toplam 46 hastada çalışılmıştır; PPV: Pozitif tanı değeri, NPV: Negatif tanı değeri

Tablo-9'da görüldüğü gibi en iyi özgüllük ve duyarlılık GM testi ile sağlanmışken BG testinin duyarlılığı, DNA saptanmasının ise özgüllüğü diğerlerinden daha düşük bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Aspergillus türleri farklı çevre koşullarında üreyebilen saprofitik, ısıya dayanıklı ve doğada yaygın bulunan küf mantarlarıdır. İnhalasyonla, günde yüzlerce *Aspergillus* sporu alınsa da nadiren hastalık oluşturur. Atopik kişilerdeki alerjik hastalıklardan, bağışıklığı baskılanmış kişilerdeki invazif hastalıklara kadar değişen farklı tablolar gelişebilir (71). En önemli sorun invazif hastalıklardaki zor tanı olup, bu çalışmada da IA tanısında kullanılan farklı yöntemlerin karşılaştırılması yapılmıştır.

Hasta örneklerinin mikroskopik olarak incelenmesi ve ekilerek etkenin üretilmeye çalışılması, vazgeçemeyeceğimiz klasik tanı yöntemleridir. Kan ve doku biyopsi kültürleri invazif hastalıkların tanısında en değerli örnekler olmakla beraber, kan kültürlerinin duyarlılığı çok düşük (<%5) olup, doku biyopsisi almak trombositopeni nedeniyle zordur. Bu çalışmada da semptomatik 57 hastanın sadece altı tanesine (%10,5) doku biyopsisi ile tanı konulabilmiştir. Dolayısıyla hastaların çoğunda tanı için kullanılan örnekler solunum yolu örnekleridir. Yapılan çalışmalarda IA tanısında solunum yolu örneklerinin duyarlılığı %15-77 arasında değişmektedir (29,35,72-76). Bronkoskopi ile alınan örneklerin balgama göre duyarlılığı daha yüksektir (29,30). Bu çalışmada da, çoğunluğu BAL olan solunum yolu örneklerinde, %26,3 oranında üreme olmuş ve literatür ile uyumlu bulunmuştur. Üreme olan örneklerin %85,7'sinde DMI'nin de pozitif olması kontaminasyon ihtimalini kaldırmış olmakla beraber, kolonizasyon ihtimalini ortadan kaldırması zordur. Ancak, nütropenik hematolojik maliniteli hastalarda ve kemik iliği nakli olanlarda solunum yolu örneklerindeki üremelerin, IA tanısındaki pozitif prediktif değeri %70-80 civarında olup, aksi ispatlanana kadar tüm pozitif örneklerin anlamlı kabul edilmesi gerekir (29,35,36,77). Bu çalışmada da solunum yolu örneklerinde üremesi olan semptomatik 15 hastanın 14 tanesinde, diğer tanı yöntemlerinden (GM, BG, ve DNA tespiti) en az bir tanesi pozitif bulunmuş ve üremeyi desteklemiştir. BAL örneğinde *A. terreus* üremesi olan bir hastada diğer biyolojik belirteçler

negatif kalmış, ancak semptomatik hematolojik maliniteli bir hastadan gelmiş olması ve DMI'sinin pozitif bulunması nedeniyle anlamlı kabul edilmiştir. IA olgularında *A. terreus*'un görülme oranının giderek arttığı belirtilmekte ve %3-10 arasında değiştiği vurgulanmaktadır (35). Bu çalışmada da birisi *A. fumigatus* ile beraber olmak üzere toplam üç hastada *A. terreus* üremesi olmuştur. Diğer *Aspergillus* türlerine göre in vivo ve in vitro olarak amfoterisin B'ye daha dirençli bir tür olup, lipozomal amfoterisin B tedavisi sırasında *A. terreus* ile gelişen IA olguları bildirilmiştir (78-80).

IA olgularında en sık izole edilen tür *A. fumigatus* olup, bunu *A. flavus* izler (20). Bu çalışmada ise izole edilen suşların yarısından fazlasını *A. flavus* oluşturmuştur. Ancak bu çalışma epidemiyolojik bir araştırma olmayıp, çalışma grubundaki türleri göstermektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda *A. flavus*'un sıklığından da bahsedilmekte olup, bölgesel farklılıklar olabilir (81). *A. flavus*'un paranazal sinüs mikozlarında daha fazla izole edildiği bildirilmektedir (82-84). Bu çalışmada da kanıtlanmış iki sinonazal enfeksiyonda *A. flavus* üremiştir.

IA tanısında kullandığımız, mikroskopik inceleme ve kültürün duyarlılığının düşük olması ve özellikle kültürün geç sonuçlanması nedeniyle farklı tanı yolları arayışı içine girilmiştir. Hasta örneklerinde GM antijeninin aranması oldukça eski yıllara (1970) dayanan bir uygulama olmakla beraber, son iki dekatta, ticari EIA kiti (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Fransa) oluşturulduktan sonra, yaygın kullanılmaya başlanmıştır (85). Bu kit ile yapılan çalışmalarda, duyarlılığının %29-100 gibi oldukça geniş aralıkta olduğu görülmüştür (44). Bu geniş aralığın çeşitli nedenleri vardır. Testin farklı hasta gruplarında çalışılmış olması en önemli nedendir. Derin nötropenisi olan hematolojik maliniteli hastalarda duyarlılık %90-100 gibi yüksek bulunurken, diğer kanser hastalarında, solid organ nakli olanlarda, kronik aspergilloz olgularında ve lokal enfeksiyonlarda duyarlılık düşmekte, kan nötrofillerinin GM antijenini temizlediği ve testin duyarlılığını düşürdüğü varsayılmaktadır (42,43). Hematolojik maliniteli hasta serumlarının kullanıldığı bu çalışmada da duyarlılık %90 olarak bulunmuştur. Ampirik ya da profilaktik antifungal kullanımı, testin en az haftada iki kez seri olarak

yapılmaması ya da yüksek cut-off optik dansite (OD) indeksi kullanılması duyarlılığı düşüren diğer nedenlerdir (86). Bu çalışmada test, seri olarak haftada iki kez çalışılmış ve cut-off OD indeksi üretici firma tarafından ilk öneri olan 1,5 olarak değil, yeni öneri ve FDA tarafından onaylanmış olan 0,5 olarak düşük alınmıştır (87,88). Kurumumuzda, yüksek çözünürlükte tomografi ve GM testi kullanımı ile birlikte ampirik antifungal tedavi yerine preemtif antifungal tedavi yaklaşımına geçilmiş olup, çalışma grubuna da zorunlu kalınmadıkça ampirik antifungal verilmemiştir. Ayrıca çalışma döneminde proflaktik antifungal kullanımı da olmamıştır. Bu bağlamda GM testi çalışma grubumuzda literatür ile uyumlu olarak oldukça duyarlı bulunmuştur. Bu çalışmada GM testinin özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuş ve klinik bulgusu olmayan hastalarda pozitiflik olmamıştır. Yapılan çalışmalarda da GM testinin özgüllüğünün %90'nın üzerinde olduğu vurgulanmaktadır (89-91). Çocuklarda ve piperasillin-tazobaktam gibi bazı antibiyotikleri kullananlarda yalancı pozitiflikten söz edilmektedir (92-95). Bu çalışma erişkin grupta yapılmış olup, antibiyotik kullanımı ile ilgili yalancı pozitiflikle karşılaşılmamıştır.

IA tanısında kullanılacak, FDA tarafından onay almış bir diğer tanı testi BG'dir. BG birçok mantarın hücre duvarında bulunan bir komponent olup, test sadece IA özgül olmayıp, pan-fungal bir testtir (96). Fungitell (Fungitell assay; Cape-Cod Inc, ABD) ve Fungitec (Seikagaku; Japonya), BG tespiti için en fazla kullanılan ticari kitler olup, doğruluk açısından aralarında önemli bir fark yoktur ve bu çalışmada da Fungitell kiti (Fungitell assay; Cape-Cod Inc, ABD) kullanılmıştır (97). Yapılan çalışmalarda BG testinin duyarlılığı %70-100, özgüllüğü %75-90 arasında tespit edilmiştir (47,51, 98-101). Bu çalışmada BG testinin duyarlılığı %68,4 olarak diğer testlerden biraz daha düşük bulunmuştur. Ancak bütün örneklerde, özellikle histopatolojik tanısı olan örneklerde BG testinin çalışmamış olması bu çalışmanın bir eksikliğidir. Bunun ötesinde, insan serumunda bulunabilecek serin proteaz inhibitörleri duyarlılığı etkileyebilecek teknik bir sorundur. Her ne kadar kit içinde bulunan solüsyonlarla (Triton X-100) serum örneklerine üretici firmanın önerileri doğrultusunda ön işlem

yapılsa da yetersiz kalma ihtimali vardır (51). BG doğada yaygın bulunan bir madde olması nedeniyle testin özgüllüğü ile ilgili sıkıntılar GM testinden daha fazladır. Çeşitli antibiyotikler, normal flora bakterileri, hemodiyaliz filtreleri, immungloblinler, albumin ve diğer kan ürünleri yalancı pozitifliğe sebep olabilir (101,102). Bu çalışmada da klinik bulgusu olmayan iki hastada test yalancı olarak pozitif çıkmıştır. Bununla beraber özgüllük %92,6 olarak hesaplanmış ve sıkıntı yaşanmamıştır. Ancak daha yüksek sayılarda ve daha farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda bu tür sorun ile karşılaşılabilir.

GM ve BG için bahsedilen çeşitli olumsuzluklara rağmen her iki test de IA tanısında kullanılmak üzere EORTC/MSG kriterlerine girmiş ve bu çalışmada, GM ve/veya BG pozitifliği dahil edilerek semptomatik hastaların 40 tanesi kanıtlanmış ve YO-IA olarak tanımlanmıştır (67,103). DMİ ve kültür ile sadece 21 hastanın kanıtlanmış ve YO-IA olarak değerlendirildiği çalışmamızda, klasik yöntemlere yeni yöntemlerinin eklenmesi ve birden fazla yöntemin aynı anda çalışılarak beraber kullanılması ile tanı şansının artacağı net olarak gösterilmiştir.

IA tanısında GM ve BG dışında kullanılabilir bir diğer yaklaşım duyarlılığının daha yüksek olması ve daha kısa sürede sonuçlanması nedeniyle özgül DNA'nın aranmasıdır. Hasta örneklerinde *Aspergillus*'a özgül DNA'nın aranması uzunca bir süredir denenmekle beraber EORTC/MSG tanı kriterlerine alınmamıştır (67). Özgül DNA aranmasındaki en önemli sorun, standart ve validasyonu yapılmış bir yöntemin olmayışıdır. Yapılan çalışmalarda farklı örnekler, farklı ekstraksiyon yöntemleri, farklı primer-problar ve farklı PCR formatları kullanılmıştır ki bunlardan hepsi, sonuçları etkileyebilecek faktörlerdir (53,104).

Serum, plazma, tam kan ve doku örnekleri, invazyonu göstermesi nedeniyle PCR testlerinde tercih edilen örneklerdir. Ancak trombositopenik hastalarda doku almak kolay olmadığından, kan en çok kullanılan örnektir. Yapılan çalışmalarda tam kan kullanıldığında en başarılı sonuçların alındığı vurgulanmakta ve olabildiğince fazla miktarda kan kullanmanın duyarlılığı arttırmadaki yararından bahsedilmektedir (105,106). Bu çalışmada daha

önce GM ve BG çalışılmış serum örnekleri 200µl olacak şekilde kullanılmış ve aynen GM gibi %90 duyarlılık elde edilmiştir. Tam kan kullanımı daha uygun bulunsa da aynı zamanda GM ve BG çalışılmasına olanak sağlaması açısından serum ve plazma örnekleri avantajlıdır ve bu çalışmada duyarlılık üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Mantarlar kalın bir hücre duvarına sahip oldukları için DNA ekstraksiyonu önemi bir basamaktır. Manuel ya da ticari kitlerle ekstraksiyon yapmak mümkün olup, kontaminasyon ihtimalini azaltması nedeniyle ticari kitler önerilmektedir (53). Bu çalışmada da ticari bir kitle (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kiti; Zymo Research; Cat n0:D6005; ABD) ekstraksiyon yapılmış ve başarılı sonuçlar (duyarlılık %90) alınmıştır.

Primer-prob seçimi PCR testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilecek önemli bir diğer noktadır. Genellikle rDNA bölgesine ait diziler genomda çok tekrarlandığı için tercih edilen bölgeler olmaktadır ve yapılan çalışmalarda bu bölgeden seçilmiş türe özgü, cinse özgü ya da pan-fungal değişik primer ve problar kullanılmaktadır (53). Bu çalışmada da rDNA bölgesinin 18S kısmına ait tüm *Aspergillus* türlerini kapsayan ticari olarak hazırlanmış primer-prob (LightCycler® 480 Probes Master; Cat.No 04707494001; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) kullanılmış ve aynen GM testi gibi %90 duyarlılık yakalanmıştır.

Klasik, nested, mütipleks ve RT-PCR bugüne kadar denenmiş PCR formatlarıdır (53). Bu çalışmada da rDNA bölgesinin 18S kısmına ait tüm *Aspergillus* türlerini kapsayan ticari olarak hazırlanmış primer-prob (LightCycler® 480 Probes Master; Cat.No 04707494001; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) kullanılmış ve aynen GM testi gibi %90 duyarlılık yakalanmıştır.

Klasik PCR'in çoğaltmadan sonra farklı bir tanı yöntemine (southern hibridizasyon gibi) ihtiyacı vardır ki, bu işlem basamaklarını çoğaltarak kontaminasyon ihtimalini ve süreyi uzatır. Nested ve mütipleks PCR yöntemleri başarılı olmakla beraber, bunlarda da işlem basamakları fazladır ve kontaminasyon riski vardır. Son zamanlarda gerçek zamanlı olarak çoğaltma işlemi yapması, çoğaltma ile beraber tanımlamayı da sağlaması ve

kısa sürede tamamlanması nedeniyle RT-PCR tercih edilen yöntem olmuş ve bu çalışmada da ticari bir kitle (Way2Gene; Kat No: WG40-0270-16) RT-PCR yöntemi kullanılarak %90 duyarlılık sağlanmıştır.

İyi bir ekstraksiyon yöntemi, uygun primer-prob ve uygun PCR formatı ile özgül DNA aranmasında, yüksek duyarlılıklara ulaşmak mümkün olmaktadır. Ancak, mantarlar ve özellikle küf mantarları, doğada yaygın olup, hava florasında yoğun bulunmaları nedeniyle yöntemlerde karşılaşılan en önemli sorun yalancı pozitifliklerdir (107). Bu çalışmada, ticari ekstraksiyon kiti ve RT-PCR formatı kullanılmış olsa da, özgüllük %73,3 olarak GM ve BG testlerinden daha düşük bulunmuştur. Klinik bulgusu olan çalışma grubu hastalarının 17 tanesinde (%23,5) DMİ/kültür, GM ve BG testleri negatif kalırken özgül DNA pozitif olarak bulunmuştur. Benzer şekilde klinik bulgusu olmayan 13 hastada (%30,8) da pozitiflikler elde edilmiş ve aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle diğer testlerin negatif kaldığı DO-IA grubundaki pozitiflikler de yalancı olarak değerlendirilmiştir. Kanıtlanmış ve YO-IA olgularındaki özgül DNA pozitifliklerinin hepsi, en az bir diğer tanı yöntemiyle (DMİ/kültür, GM, BG) desteklenmiştir. Bu çalışmada, yalancı pozitiflikleri azaltmak amacıyla tüm işlemler biyolojik kabinlerde yapılmış, tamamen steril malzemeler kullanılmış ve ticari ekstraksiyon kiti ve RT-PCR formatı uygulanmış olmasına rağmen sekiz örnekte (dört örnek DO-IA grubundan dört örnek non-IA grubundan) yalancı pozitiflik olmuştur. Örneklerin hastalardan alınıp, laboratuvara ulaştırılması da dahil olmak üzere her aşamada kontaminasyon riski vardır ve bu çalışmada da daha önce GM ve BG çalışılmış, birkaç kere işlem görmüş ve olası kontaminasyona açık örneklerde özgül DNA aranmıştır.

GM, BG ve özgül DNA testlerini karşılaştıran çok sayıda çalışma bulmak mümkündür (108-117). Bu çalışmaların çoğunda, GM ve BG için standart yöntemle çalışılmışken, yukarıda bahsedildiği gibi farklı DNA arama yöntemleri kullanılmıştır. Bu nedenle oldukça değişik sonuçlara ulaşmak mümkün olup, bu çalışma ile de literatüre katkı oluşturacak veriler elde edilmiştir. Bu karşılaştırmalı çalışmalarda PCR yönteminin değişik formatlarının IA tanısındaki duyarlılığı %41-100 arasında değişmiştir. Tam

kan örneği, >1ml örnek kullanılması ve RT-PCR ile en yüksek duyarlılıklara ulaşılmıştır. Bu çalışmada ise 200µl serum örneği kullanarak RT-PCR yöntemi ile %90 duyarlılık yakalanmıştır. Örneğin şekli ve miktarından ziyade kullanılan ekstraksiyon yöntemi, primer-problar ve PCR formatının duyarlılık açısından daha önemli olduğu kanısına varılmıştır. Duyarlılığa benzer şekilde, yapılan çalışmalarda, çeşitli PCR formatların IA tanısında özgülüğü de %40-100 civarında bulunmuştur. Bahsedildiği gibi kontaminasyonun azalması ile en yüksek özgülüklere RT-PCR ile ulaşılmakla beraber, bu çalışmada %73,3 özgülük elde edilmiştir. Yalancı pozitiflikleri azaltmak için PCR testlerinde sıkı laboratuvar kurallarına uyulması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak IA, tüm bu gelişmeler rağmen tanısı hala güç olan bir hastalıktır. Tanıya tam ulaşabilecek hiçbir yöntem yoktur. Bununla beraber tanı testlerinin beraber kullanılması duyarlılığı arttıracaktır. GM ve BG testleri standartlaşmış ve ticari olarak bulunan testler olmakla beraber, özgül DNA'nın arandığı PCR testlerinin standardizasyonu bazı gelişmeler olsa da henüz tam olarak sağlanamamıştır (68). Bu çalışmada RT-PCR ile GM testi kadar iyi duyarlılık elde edilebilmiş ve sıkı laboratuvar uygulamaları ile kontaminasyonun da azaltılarak GM ve BG testleri yanında kullanılabilecek test olduğu ve her bir yeni testin tanıyı güçlendireceği sonucunda varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Çerikcioğlu N, Sancak B. Mantarların genel özellikleri ve tanı yöntemleri. In: Wilke AT, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyoloji. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. 2391-7.
2. de Hoog GS, Gene GJ, Figueras MJ (eds). Atlas of clinical fungi. 3rd edition. Utrecht: CBS; 2009.
3. Reis E, Shadomy HJ, Lyon GH (eds). Fundamental medical mycology. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2012.
4. Warnock DW. Taxonomy and classification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of clinical microbiology. 9th edition. Washington DC: ASM Press; 2007. 1721-7.
5. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, et al. The Revised classification of eukaryotes. J Eukaryot Microbiol 2012; 59:429–93.
6. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 2:310-50.
7. Kwon Chung KJ, Bennett JE (eds). Medical mycology. Philadelphia: Lea and Fabinger;1992.
8. Denning DW. Invazive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26:781-805.
9. Verweij PE, Brandt ME. *Aspergillus*, *Fusarium*, and other opportunistic moniliaceous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of clinical microbiology. 9th edition. Washington DC: ASM Press; 2007. 1802-38.
10. Kuştımur S. *Aspergillus*, *Fusarium* türleri ve diğer küf mantarları. In: Wilke AT, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyoloji. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. 2458-68.
11. Özyaral O. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. Ener B (ed). *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2006. 30-41.
12. Larone DH (ed). Medically important fungi. 5th edition. Washington DC: ASM Press; 2011.
13. Falvey DG, Streifel AJ. Ten year air-sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. J Hosp Infect 2007; 67:35-41.
14. Şimşekli Y, Asan A, Gücin F. Bursa İli'nin çeşitli semtlerinde ev dışı havasında bulunan *Penicillium*, *Aspergillus* türleri ve mevsimsel dağılımları. Kükem Dergisi 1998; 1:13-20.
15. Millner PD, Olenchock SA, Epstein E, et al. Bioaerosols associated with composting facilities. Compost Sci Utilization 1994; 2:6-57.
16. Vesonder R, Haliburton J, Stubblefield R, Gilmore W, Peterson S. *Aspergillus flavus* and aflatoxins B1, B2, and M1 in corn associated with equine death. Arch Environ Contam Toxicol 1991; 1:151-3.
17. Patterson TF. *Aspergillus* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and practice of infectious disease. 7th edition. Philadelphia PA: Churchill Livingstone; 2010. 3241-56.

18. Verschraegen CF, van Besien KW, Dignani C, Hester JP, Andersson BS, Anaissie E. Invasive *Aspergillus* sinusitis during bone marrow transplantation. *Scand J Infect Dis* 1997; 4:436-8.
19. Richardson MD, Warnock DW (eds). *Fungal infection, diagnosis and management*. 2nd edition. London: Blackwell Science; 1997.
20. Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future. *Am J Med Sci* 2010; 340:253–7.
21. Warnock DW. Trends in epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol* 2007; 48:1-12.
22. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, 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; 48:265-73.
23. Kontoyiannis DP, Dimitrios P, Marr KA, 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.
24. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: Results of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* 2010; 50:1101-11.
25. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *CID* 2008; 46:327-60.
26. Karthaus M. Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin-review of the literature. *Eur Med Res* 2011; 16:145-52.
27. Arendrup MC, Bile J, Dannaoui E, Ruhnke M, Heussel CP, Kibbler C. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplantation* 2012; 47:1030-45.
28. Yıldırım N, Topal U. Pulmoner aspergilloz: değişken bulgular. *Tanıs ve Girişimsel Radyoloji* 2004;10:121-6.
29. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1996; 100:171–8.
30. Reichenberger F, Habicht J, Matt P, et al. Diagnostic yield of bronchoscopy in histologically proven invasive pulmonary aspergillosis. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1195–9.
31. Einsele H, Quabeck K, Muller KD, et al. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation. *Lancet* 1998;352:1443-50.
32. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients: Guidelines of the infectious diseases working party of the German Society of Haematology and Oncology. *Eur J Cancer* 2009; 45:2462–72.

33. Levy H, Horak DA, Tegtmeir BR, Yokota SB, Forman SJ. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med* 1992; 86:243-8.
34. McWhinney PHM, Kibbler CC, Hamon MD, Smith OP, Gandhi L, Berger LA, Walesby RK, Hoffbrand AV, Prentice HG. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. *Clin Infect Dis* 1993; 17:397-404.
35. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1824-33.
36. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175:1459-66.
37. Munoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:24-39.
38. Latge JP, Moutauakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes K, Prevast MC. The 18-kilo dalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1991; 59:2586-94.
39. Stynen D, Sarfati J, Goris A, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. *Infect Immun* 1992; 60:2237-45.
40. Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62:5424-33.
41. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked-immunosorbent-assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:497-500.
42. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3223-28.
43. Maertens J, Theunissen K, Boogaerts M. Invasive aspergillosis focus on new approaches and new therapeutic agents. *Curr Med Chem Anti-Infective Agents* 2002; 1:65-81.
44. Mennink-Kersten AS, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:349-57.
45. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2184-6.
46. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1→3)-β-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.

47. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of (1→3)-β-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41:654–9.
48. Uchiyama M, Ohno N, Miura NN, et al. Chemical and immunochemical characterization of limulus factor G-activating substance of *Candida* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 4:411–20.
49. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1→3)-β-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345:17–20.
50. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nyugen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1-3) – β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1009-13.
51. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. β-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.
52. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1→3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5957–62.
53. Baskova L, Buchta V. Laboratory diagnosis of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol* 2012; 57:421–30.
54. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med* 2009 ;30:391–408.
55. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. Assesment of ribosomal large subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2092-103.
56. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:615–21.
57. Merchers WJG, Verweij PE, Hurk P, Belkum A, Pauw BED, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:1710–7.
58. 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* 2005; 49:4150-7.
59. Reddy LR, Kumer A, Kurup VP. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993; 7:121–6.
60. Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1313–7.
61. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J. Detection of *Aspergillus* species DNA in

- bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:1164–8.
62. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. J Clin Microbiol 2005; 43:5122–8.
 63. Loeffler J, Herbart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. J Clin Microbiol 1997; 35:3311–2.
 64. Loeffler J, Schimdt K, Herbart H, Schumacher U, Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. J Clin Microbiol 2002; 40:2240–3.
 65. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. Clin Infect Dis 2006; 42:487–9.
 66. Aşçıoğlu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and haematopoietic stem cell transplants: an international consensus. CID 2002; 34:7-14.
 67. de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, 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/MSD) consensus group. CID 2008; 46:1813-21.
 68. White PL, Bretagne S, Klingspor L, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. J Clin Microbiol 2010; 48:1231-40.
 69. White PL, Barton R, Guiver M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis? a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. J Mol Diagn 2006; 8:376–84.
 70. Akıllı H, Yoldaş A, Özmen M, Topçuoğlu H, Turut N, Tuzcu N. Çukurova yöresinde sığırlarda görülen granülomatöz pneumonilerin etiyojisinin histopatolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi AVKAE Derg 2012; 2:1-6.
 71. Ener B. Fungal infeksiyonlarda tanı. Ankem Derg 2011; 25(Ek 2):E156-61.
 72. Fisher BD, Armstrong D, Yu B, Gold JW. Invasive aspergillosis: progress in early diagnosis and treatment. Am J Med 1981; 71:571–7.
 73. Pannuti CS, Gingrich RD, Pfaller MA, Wenzel RP. Nosocomial pneumonia in adult patients undergoing bone marrow transplantation: a 9-year study. J Clin Oncol 1991; 9:77–84.
 74. Shpilberg O, Dover D, Goldschmied-Reouven A. Invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic disorders. Leuk Lymphoma 1991; 4:257–62.
 75. Nalesnik MA, Myerogitz RL, Jenkins R. Significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory secretions in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol 1980;11:370–6.

76. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:518–23.
77. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1986;81:249–54.
78. Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Medical Mycology* 2009; 47:42-6.
79. Steinbach WJ, Benjamin DK, Dimitrios JR et al. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 39:192–8.
80. Kutlu SS, Kabukcu S, Hacıoğlu SK, Sarı İ. Lipozomal amfoterisin B tedavisi sırasında gelişen invaziv pulmoner *Aspergillus terreus* olgusu. 8. Febril Nötropeni Simpozyumu 2008.
81. Xess I, Mohanty S, Jain N, Banerjee U. Prevalence of *Aspergillus* species in clinical samples isolated in an indian tertiary care hospital. *Indian J Med Sci* 2004; 58:513-9.
82. Chakrabarti A, Sharma SC, Chander J. Epidemiology and pathogenesis of paranasal sinus mycoses. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 107:745-50.
83. Sarti EJ, Lucente FE. Aspergillosis of the paranasal sinuses. *ENT J* 1988; 67:824-31.
84. Mc Gill TJ, Simpson G, Healey GB. Fulminant aspergillosis of the nose and paranasal sinuses: a new clinical entity. *Laryngoscope* 1980; 90:748-54.
85. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive aspergillus infections in patients with haematological disorders. *Mycoses* 2007; 50(Suppl. 1):S2–17.
86. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:609–22.
87. Bennett JE, Kauffman C, Walsh T, et al. Forum report: issues in the evaluation of diagnostic tests, use of historical controls, and merits of the current multicenter collaborative groups. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (suppl 3):S123–27.
88. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20:1898–906.
89. Bretagne S, Marmorat-Khuong A, Kuentz M, Latge JP, Bart-Delabesse E, Cordonnier C. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. *J Infect* 1997; 35:7–15.
90. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002; 34:939–43.
91. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for

- the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190:641–9.
92. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. *Bifidobacterium* lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004; 363:325–27.
 93. Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzymelinked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998; 41:373–7.
 94. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 2004; 38:913–6.
 95. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med* 2003; 349:2366–7.
 96. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rácil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:15–24.
 97. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and metaanalysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*. 2012; 54:633–43.
 98. Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, et al. An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia: beta-glucan, mannan, candida antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. *Microbiol Immunol* 1993; 37:207–12.
 99. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1→3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections—a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1864–70.
 100. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50:7–15.
 101. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; 125(Suppl1):S14–S24.
 102. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1930–1.
 103. Akan H. Fungal infeksiyonlarda EORTC tanımları. *ANKEM Derg* 2009; 23:130-4.
 104. White PL, Barnes RA. *Aspergillus* PCR-Platforms, strengths and weaknesses. *Med Mycol* 2006; 44(suppl 1):S191-8.
 105. Bernal-Martínez L, Gago S, Buitrago ML, Gomez-Lopez A Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3596-9.

106. Suarez F, Lortholary O, Buland S, et al. Detection of Circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3772-7.
107. Basková L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol* 2007; 56:1167–73.
108. 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.
109. Bretagne S, Costa J-M, Bart-Delabesse E, et al. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1407-12.
110. Costa C, Costa JM, Desterke C, et al. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2224-7.
111. Millon L, Piarroux R, Deconinck E, et al. Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5097-101.
112. Kawamura S, Maesaki S, Noda T, et al. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:218-20.
113. Scotter JM, Campbell P, Anderson TP, et al. Comparison of PCR-ELISA and galactomannan detection for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Pathol* 2005; 37:246-53.
114. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, et al. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1434-8.
115. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, et al. Prospective clinical evaluation of a Light Cycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzymelinked immunosorbent assay for the detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 125:196-202.
116. Hashimoto A, Yamakami Y, Kamberi P, et al. Comparison of PCR, [1-3]-beta-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis. *J Clin Lab Anal* 1998; 12:257-62.
117. 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.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocalarım Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Safiye Helvacı'ya ve Prof. Dr. Reşit Mıstık'a; her konuda yardımını, bilgisini ve cömertliğini esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Beyza Ener'e; bilimsel ve analitik düşünme konusunda bakış açımı zenginleştiren, mesleki vizyonunu örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Halis Akalın'a; asistanlığım boyunca bana yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç. Dr. Emel Yılmaz ve tezimin proje danışmanı Uzm. Dr. Esra Kazak'a; mesleğimin laboratuvar ayağı ile ilgili bilgilerimin olgunlaşmasında faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Okan Töre, Prof. Dr. Suna Gedikoğlu, Prof. Dr. Güher Göral, Prof. Dr. Cüneyt Özakin, Prof. Dr. H. Barbaros Oral, Doç. Dr. Melda Sınırtaş, Doç. Dr. Ferah Budak, Doç. Dr. Oktay Alver'e; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Çınar Öztürk, Uzm. Dr. Ahmet Özmen, Uzm. Dr. Emel Aslan, Uzm. Dr. Faruk Karakeçili, Uzm. Dr. Tülay Özvatan Şener, Uzm. Dr. Sezin Zorlu Şahin, Uzm. Dr. Ayşe Oğuz Ayaracı, Dr. Hicran Akın, Dr. Gülay Çekiç Mor, Dr. Diğdem Özer Yıldırım, Dr. Meltem Öner Torlar, Dr. AliRıza İlbaşı, Dr. Nesrin Kebabçı, Dr. Sibel Yorulmaz Göktaş, Dr. Tekin Tunçel ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm asistanlarına; laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı Sıdıka Aşıcı, Nuran Akgül, Aynur Demirbilek, Raziye Ülker, Cahide Güçlütürk, Figen Aymak, Şebnem Gedikli, Bekir Akça, Ayşe Taşpınar, Eda Öztürk, Pınar Yıldız, Elif Uğurgün, Ali Şahin, Tezcan Şahin, Burcu Çakır, Ömer Faruk Birinci, Asuman Dartar, Göknur Altındiş, Kemal Halis, İlknur Akgöğ'e; tezimin laboratuvar ayağında özveriyle çalışıp desteklerini benden esirgemeyen sevgili Saniye Bahar ve Binnaz Güngör'e; tanımaktan mutluluk duyduğum anabilim dalımızın diğer öğretim üyeleri, hemşire ve sevgili personeline;

Ayrıca tüm hayatım boyunca her türlü emeğini, desteğini ve sevgisini koşulsuz sunan canım anneme ve babama; tanıştığımız andan itibaren beni benden daha fazla düşünen, desteğini hiç esirgemeyen, meslektaşım, sevgili eşim Uzm. Dr. Kemal Bölük'e ve hayatımıza girdiği andan itibaren yaşamımızı anlamlandıran çocuklarımız Ayşenur ve Arda Bölük'e sonsuz teşekkürler ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Gülçin

Soyadı: BÖLÜK

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir - 06.10.1979

Ünvanı: Doktor

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Durumu:

1986-1990 Setbaşı İlköğretim Okulu

1990-1993 Emirsultan Lisesi Ortaokul Bölümü

1993-1997 Çelebi Mehmet Lisesi (Süper Lise-1 yıl İngilizce Hazırlık)

1997-2003 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

2007-2013 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

Üyesi Olunan Bilimsel ve Mesleki Topluluklar:

KLİMİK Derneği

Viral Hepatitle Savaşım Derneği

Türk Tabip Odası Bursa Şubesi