

İNVAZİV ASPERGİLLOZUN ÖN TANIMINDA GALAKTOMANNAN ANTİJENİNİ BELİRLEMENİN YERİ VE ÖNEMİ *

A. Serda KANTARCIOĞLU, Ayhan YÜCEL

Background and Design.- The precise diagnosis of invasive aspergillosis depends upon demonstrating the presence of Aspergilli by direct microscopical examination and isolating the fungus from specimens obtained from a sterile site. However, invasive procedures are often precluded by cytopenia or by the critical condition of the patient. Hence, definite diagnosis is infrequently made before fungal proliferation becomes overwhelming and therapy may no longer be successful. Galactomannan, an exo-antigen, is a major cell wall constituent released during growth. The detection of circulating galactomannan in the serum, bronchoalveolar lavage and other body fluids together with the findings obtained by computed tomographic (CT) scanning of the chest contributes to the early presumptive diagnosis of invasive aspergillosis. Today, in mycology, a more targeted "pre-emptive" therapy directed towards the high-risk patients and based upon a battery of clinical, radiological and microbiological data that suspect the presence of invasive aspergillosis has being replaced to empirical therapy. Galactomannan (GM) can be detected by latex agglutination or enzyme immunoassay tests. GM positivity with careful interpretation, in combination with CT-scanning or radiology appears highly useful for early presumptive diagnosis of invasive aspergillosis and sufficiently predictive to start pre-emptive therapy. This paper reviews the relevant literature to clarify the significance of GM detection in invasive aspergillosis.

Kantarcioğlu S.A, Yücel A. The significance of galactomannan antigen detection in presumptive diagnosis of invasive aspergillosis. Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 155-166.

İnvaziv aspergilloz (İA) tek tük olgular halinde normal konaklarda da bildirilmişse de esas olarak bağışıklığı bozuk hastalarda, özellikle hematopoetik kök hücre transplantlılarında ve hematolojik maligniteli hastalarda görülmektedir^{1,2} ve olgu-fatalite oranı yüksektir ($\geq 90\%$).^{3,4} Olgu-fatalite oranının yüksekliği sadece risk altındaki hasta sayısının artmasıyla değil, invaziv olmayan tanımlarının ve daha iyi mikrobiyoloji laboratuvar tekniklerinin bulunmaması, etki alanı sınırlı olan triazolollerin profilaksi amacıyla yaygın kullanılması ile de ilişkilendirilmektedir.¹ Diğer yandan klinik tablonun özgül olmaması, semptomların ve damara invazyonla ilgili işaretlerin hastalığın erken aşamalarında belirgin olmaması, birlikte var olan diğer infeksiyonlar gibi diğer klinik özelliklerin insidansının yüksekliği de doğru tanımları güçleştirmektedir. Bakteriye infeksiyonlardan farklı olarak, dissemine hastalıkta bile kan, BOS ve diğer vücut sıvılarının kültürü nadiren pozitifdir. Konidyumlar havada ve her yerde bol bulunduğundan solunum yolu örneklerinin kültürü infeksiyon, kolonizasyon ve kontaminasyonu belirleyici ol-

mamaktadır. Pozitif bir solunum yolu örneği kültürünün belirleyici değeri, hastanın altta yatan sebeplerine bağlı olarak %20-30 kadar düşük olabildiği gibi, %80-90 kadar yüksek de olabilmektedir. Bağışıklığı bozuk tüm hasta grupları için negatif belirleyici değeri ise düşüktür.⁵⁻¹⁰

Geniş spektrumlu antibiyotiklere yanıt vermeyen ateş, göğüs röntgeninde yeni pulmoner infiltrasyon geliştiğinin saptanması, invaziv mikoza da işaret edebilen göğüs ağrısı, hemoptizi gibi klinik bulguların belirleyici değeri düşüktür. Kesin ve erken tanıma ulaşmanın tek yolu ve altın standart, açık akciğer biyopsisi, beyin biyopsisi gibi biyopsi veya iğne aspirasyonu ile alınan örneğin doğrudan mikroskopta incelenmesi ve/veya histolojik inceleme ile kültür sonucunun birleştirilmesidir. Ancak bu gibi invaziv yöntemler hastanın sitopenisi veya kritik koşulları sebebiyle ekseri engellenir. Dolayısıyla kesin tanıma artık mantarın önlenemeyeceği ve tedavinin başarılı olamayacağı bir aşamaya kadar ulaşmamaktadır.^{1,11}

**Anahtar Kelimeler:* Galaktomannan, aspergillus DNA, lateks aglütinasyon, ELISA, invaziv aspergilloz; *Key Words:* Galactomannan, aspergillus DNA, latex agglutination, ELISA, invasive aspergillosis; *Alındığı Tarih:* 28 Eylül 2004; Dr (PhD). A. Serda Kantarcioğlu, Prof. Dr. Ayhan Yücel: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. A. Serda Kantarcioğlu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34098, Cerrahpaşa, İstanbul.

KISMEN HEDEFLENMİŞ TEDAVİ

Laboratuvar ve klinik belirti ve bulgularla İA'un doğrulanmasını beklemek tedavide yüksek oranda başarısızlıkla sonuçlanabildiğinden kesin tanıya dayanan "aspergilloza hedeflenmiş" ("targetted") antifungal tedavi yerine tedaviye sıklıkla uygun antibakteriyel tedaviye yanıt vermeyen ateşe dayanarak başlanmaktadır. Ancak bugün bu uygulama genelde kabul görmemektedir. Erken empirik tedavinin olası avantajları olsa da bütün nötropenik hastalar aynı riske sahip olmadıklarından tek başına ısrarlı ateş sebebiyle tedaviye başlamak hastaya fazladan ilaç yüklenmesi, direncin uyarılması ve/veya seleksiyonu, artan toksisite ve daha yüksek maliyete sebep olmaktadır.

Yüksek risk grubu hastalara yönelik "kısmen hedeflenmiş" "pre-emptive" bir tedavinin uygulanışı İA varlığından kuşkulandıran klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik verilere dayanmaktadır ve günümüzde yeğlenmektedir. Bu iki strateji de bir antifungal maddeyi tam doz olarak kullansa da aralarındaki fark esasen tanımda kesinliğe doğru giden basamaklardan kaynaklanmaktadır. Empirik tedavi çoğunlukla uzun süren derin nötropeni, gibi altta yatan sebeplerden dolayı risk grubuna dahil olduğunda, geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye yanıtızsız sebebi bilinmeyen ısrarlı ateş geliştiğinde ve İA ortaya konulmadığında başlanırken aksine kısmen hedeflenmiş tedavi İA'a işaret ettiği kabul edilen akciğerde bir lezyonu çevreleyen hale işareti veya bir kaviteye işaret eden hava kabarcığı görüntüsü pulmoner hastalık delilleri ile birlikte, birkaç balgam örneğinden Aspergillus üretilmesi veya serum, sırasında BAL gibi örneklerde antijen belirlenmesine dayandırılmaktadır.¹² EORTC/IFICG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invazive Fungal Infections Co-operative Group) ve MSG (NSAID) tarafından geliştirilen bir şemaya göre kesin tanımdan önceki aşamalarda derecelendirilmiş ön tanımlara olanak sağlanmaktadır. Buna göre, empirik tedavi düşük olasılıklı İA ve kısmen hedeflenmiş tedavi ise yüksek olasılıklı İA için başlanılmaktadır.^{13,15}

"Graft versus host disease" (GVHD)'li karaciğer ve kemik iliği transplant (KİT)'ı alıcılarında Aspergillus türlerinin solunum yolu örneklerinden ayrılması hemen daima invaziv hastalığa işaret etmektedir. Bu yüksek riskli hastalarda histopatolojik delil bulunmasa da bu şekilde kısmen hedeflenmiş bir tedavinin yeğlenmesi önerilmektedir.¹

Sandviç ELISA ile galaktomannan (GM) antijeni veya PCR ile Aspergillus DNA'sının belirlenmesi, özellikle yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (BT), kısmen hedeflenmiş tedaviye başlamak için yeterince duyarlı ve özgül gözükmektedir. Özellikle febril nötropenik hastalarda kısmen hedefe yönelik tedavinin empirik tedaviye yeğlenmesi önerilmektedir.¹

Kültürden bağımsız yöntemlerle ilgili gelişmeler¹⁶⁻²¹: On günden uzun süren ağır nötropenisi olan ve akciğerde infiltrasyon gelişen hastalar geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi altındayken ölümcül infeksiyon ve tedavide başarısızlık riski ile karşı karşıya kalmaktadır. Erken başlanan sistemik antifungal tedavinin yararlı olabileceği gösterilmiştir. Etkenin tanımlanması bronkoskop ile alınan örneklerin mikroskop incelemesi ve kültür sonuçlarının birleştirilmesine dayanırken, yüksek çözünürlüklü toraks BT vasıtasıyla akciğerdeki infiltrasyonların erken tanımlanması prognozu anlamlı etkileyebilmektedir.¹¹

Son yıllarda İA tanımlanma yöntemlerinde başlıca üç gelişme kaydedilmiştir; (i) göğüs BT'nin erken kullanılması; (ii) üreme sırasında eksoantijen olarak başlıca hücre duvarı bileşeni olan "dolaşan galaktomannan" (GM) antijenine yönelik seroloji deneyleri; (iii) Aspergillus DNA'sının belirlenmesi için (hatta panfungal) polimeraz zincir tepkimesi (PZT). *A.fumigatus*, *A.flavus* ve *A.niger*'in sitoplazma antijenlerini tanıyan iki anti-Aspergillus monoklonal murine antikoru üretilmiş ve hem dondurulmuş kesitlerde immunfloresans ile hem de parafine gömülü klinik örneklerde immunfloresans ve immunoperoksidaz boyamalarla Aspergillus spp'nin tanımlanabildiği gösterilmiş; dokuda benzer hüfler üreterek karışabilecek diğer mantarlardan ayırt edici olan Aspergillus'ların im-

munolojik olarak işaretlenebilmesi patoloji örneklerinden aspergillozun tanımına yardımcı olabilecek rutin bir yöntem olarak öne sürülmüştür.²² Angioinvasiv mikozlar için tipik, gerçek diagnostik işaretlere pnömotoraks ve hale ile çevrili tek veya çoklu küçük nodüller, plevraya dayanan köşeli veya üçgen şeklinde bir lezyon dahildir. Kitle şeklinde bir nodül veya buzlu cama atfedilen bir "hale" ile çevrili infiltrat, nekroz ve hemoraji ile çerçevelenmiş merkez bir mantar lezyonuna karşılık gelir.²³⁻²⁸ Bu işaret nötropenik hastalarda yüksek derecede invaziv pulmoner aspergilloza yönlendiricidir ve hastalığın seyirinin erken aşamasında (ilk hafta) oluşur. Nötrofillerin eski durumunu bulmasından sonra bu infiltratlar "hava kabarcığı" işaretini (geç işaret) göstererek kaviteleşebilir.¹ Bu kaviteli lezyonlar infarktlı akciğer dokusunu temsil eder ve akciğer infarkt ile ilgili diğer koşullarda da oluşabilir.¹ Hale veya hava kabarcığının BT'de veya radyografide görülmesi İA'a işaret etmekle beraber bunların ne özgül ne de duyarlı olmadığı ve ekseri bu işaretlerin tam olarak da tanımlanamadığı kaydedilmiştir.^{1,29}

GALAKTOMANNAN ANTİJENİNİN BELİRLENMESİ: LATEKS AGLÜTİNASYON VE EIA TESTLERİ

GM antijeni bir eksoantijendir; mantarın hücre duvarı yapısında bulunmakta; in vitro ve in vivo gelişme sırasında ortama salınmaktadır. İnvaziv aspergillozlularda dolaşan GM antijeni belirlenmiştir. Serumda ve daha nadiren BAL ve diğer vücut sıvılarında GM antijeninin saptanması invaziv aspergillozun ön tanısında önem kazanmaktadır.

Serumda belirlenmesi: Anti-Aspergillus antikorlarını belirlenmenin nötropenik hastalarda ve hematopoetik kök hücre transplantlılarında aspergilloz tanısı bakımından yeri yoktur çünkü bu hastalar uygun antikor yanıtı üretmezler. Aspergillus antijeni aramak için geliştirilmiş ve ticarete bulunan bir lateks aglütinasyon (LA) kiti (Pastorex Aspergillus, Sanofi, Diagnostics Pasteur, France) sıçan monoklonal EB-A2 antikorlarını kullanmaktadır.³⁰

Serumda GM antijeninin aranması ile ilgili ilk çalışmalardan birinde; 19 doğrulanmış pulmoner aspergillozlu dahil bağışıklığı baskılanmış 121 hastanın serum örnekleri değerlendirilmiş, yöntemin pozitif prediktif değeri %67 olarak bulunmuş, nükslerde LA testinin belirleyiciliğinin EIA'den daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.³¹ Bir başka grubun araştırmasında, Pastorex Aspergillus LA testini karaciğer ve KİT hastalarında İA'un erken tanısı için değerlendirmek üzere transplant sonrası dönemde haftada en az iki kez serum örnekleri alınarak çalışılmış ve sonuçlar solunum, idrar ve safra örneklerinin mikrobiyolojik incelenmesi ile karşılaştırılmış, ayrıca *A.fumigatus*'a karşı antikorlar da counter immunoelectrophoresis yöntemi ile aranmıştır. Doksanbir hastanın sekizinde İA gelişmiş, bunlardan alınan 187 serum örneğinin sekizinde (%4.3) pozitif aglütinasyon sonucu elde edilmiş, diğer dört hastada sürekli negatif sonuç alınmıştır. İA belirtisi olmayan 83 hastanın beşinde (%6) yalancı pozitif sonuç alınmış, hastaların hiçbirinde antikor belirlenmemiştir. Bu çalışmada Aspergillus LA testi tek başına kullanıldığında duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bulunmuştur.³² İA riski altındaki hastaların serumlarında GM belirlenmesinde Pastorex Aspergillus LA kitinin performansının ve örneğin saklanmasıyla tekrarlanabilirlik üzerine etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, bir yıl boyunca 46 hastadan 392 serum örneği alınmış, 33 örnek -20°C'de tutularak 2-16 ay boyunca retrospektif olarak yeniden çalışılmıştır. Ayrıca iki pozitif örnek -20°C'de ve -70°C'de tutularak 15 aylık sürede üç ay aralıklarla prospektif olarak incelenmiştir. Pastorex Aspergillus testi, İA için mikrobiyolojik, radyolojik veya histolojik deliller bulunan sekiz hastada pozitif bulunmuş, fakat bu hastaların beşinin ilk serum örnekleri negatif sonuç vermiştir. İA için histolojik delilleri olan iki hastada, altı örnekte negatif sonuç elde edilmiş, -20°C'de altı aydan daha uzun süre saklanan 13 serum örneğinin altısı reaktivitesini kaybetmiş, -20°C'de ve -70°C'de saklanan ve 15 ay boyunca üç ayda bir prospektif olarak yeniden test edilen iki serum örneği kararlı antijen titresi vermeyi sürdürmüştür. Araştırmacılar Pastorex Aspergillus testinin İA'un erken

aşamada tanısı için çok duyarlı olduğu, fakat kültürler negatif kaldığında ve seri örnekler alınması durumunda tanıya katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır.³³ Sonuçta, 1995'lerden günümüze gelindiğinde İA kesin tanısının direkt mikroskopi ve kültüre dayandığı³⁴, ancak GM antijeni belirlenmesinin artık bir tanım testi olarak ve yalnız başına değil, ama görümlüleme teknikleri ile elde edilen hale işareti gibi tipik bulgularla birleştirilerek değerlendirildiğinde İA ön tanısına ve empirik tedaviden daha ileri bir anlayış olarak kısmen hedeflenmiş tedaviye götürebileceği görüşü kabul görmektedir.

Pastorex Aspergillus LA kiti ile serumda GM antijeninin belirlenebilir alt sınırı 15 µg/ml'dir.^{30,35} Yeni geliştirilen ve ticarete bulunan sandviç EIA tekniği (Platelia Aspergillus EIA, BioRad) GM antijeni belirlenmesinin sınırını 1.0 ng/ml'ye düşürebilmiştir.^{30,36} Aspergillus Platelia enzim immünassay (EIA) bir galaktofuranoz epitopa karşı monoklonal antikora sandviç EIA'de GM belirlenmesine dayanmaktadır.^{4,17} Bu testin laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği altı üniversite hastanesi laboratuvarının katılımıyla ve altısı İA'lı 12 nötropenik hastadan alınan 20 serum örneği ile sekiz kör EIA negatif serum örneği kullanılarak araştırılmış ve üretici firmanın önerdiği sınır ("cut off") değerinin negatif örnekler için 1.0'dan 0.8'e ve pozitif olanlar için 1.5'den 1.0'a düşürülebileceği bildirilmiştir.³⁷ Halen, Avrupa'da kullanılan EIA kitinin için 1.0 değeri belirsiz ve 1.5 değeri pozitif kabul edilmektedir. Buna karşın, Mayıs 2003'den bu yana Amerika'da Food and Drug Administration (FDA) onayı olan kitin sınır değeri 0.5'dir ve halen üç ayrı tıp merkezinde klinik olarak denenmekte olduğu bildirilmektedir.³⁸

GM antijeninin belirlenmesinde LA ve sandviç EIA tekniklerini karşılaştırmak üzere 215 KİT hastasında transplantasyon öncesinde ve sonrasında iki yıl boyunca art arda serum örnekleri³⁻²¹ alınarak incelenmiş, öncesinde hiçbirinde pozitiflik saptanmamış, sonrasında kanıtlanmış aspergillozlu 25 hastanın 19'unda EIA ve dördünde LA ile GM antijeni belirlenmiş, sandviç EIA tekniğinin daha duyarlı bu-

lunduğu, pozitif olgularda art arda örneklerde antijeneminin çabuk belirlenebildiği ve kuvvetli pozitif kaldığı yazılmıştır. Bu çalışmada özgüllük %81 ve duyarlılık %98.7 olarak bildirilmiş ve GM antijeni belirlenmesinin KİT hastalarında aspergillozun erken ön tanısında yararlı olabileceği bildirilmiştir.³⁹ Wheat³⁷ GM antijeni belirlenmesi ile ilgili literatürleri gözden geçirmiş ve testin duyarlılığını %81, özgüllüğünü %89 olarak bildirmiştir. GM antijeni belirlenmesi ile ilgili yeni bir kısım çalışmalar mükemmel duyarlılık (>%90) ve özgüllük (%85-95) göstermektedir.⁴⁰⁻⁴³ Allojenik KİT hastalarda yapılan yakın tarihli bir çalışmada %100 duyarlılık ve %65 özgüllük bildirilmiştir.¹ Üstelik, GM antijeninin serumda hastalığın erken aşamasında, İA'a işaret eden klinik ipuçları ve radyolojik özellikleri görünür hale gelmeden önce belirlenebilmekte ve tekrarlanan deneylerde negatif sonuç alınıyorsa İA riski düşük gözükmektedir.⁴³ Serum GM antijeni belirlenmesini serum-PCR ile karşılaştıran retrospektif bir çalışmada⁴⁵ nötropenik ve/veya sistemik steroid tedavisi alan 41 hematoloji/onkoloji hastasından haftalık olarak alınan 281 serum örneği toplanmıştır. Hem GM antijeni hem de PZT pozitif bulunan 13 hastanın tümünde İA bulunduğu, serum GM antijeni pozitif fakat PZT'i negatif olan altı hastanın beşinin İA'lı, her iki testte de negatif sonuç elde edilen 23 hastanın da dördünün İA'lı olduğu bildirilmiştir. Hiçbir hastada pozitif serum PZT, negatif serum GM antijeni sonucu elde edilmemiştir. Bu sonuçlara bakarak tam kan örneklerinin PZT tekniği ile daha iyi sonuç verebileceği önerilmiştir.

Akciğer transplantlarında haftada iki kez toplanan örneklerle yapılan bir çalışmada ise Aspergillus Platelia GM antijeni testinin duyarlılığı %30 ve özgüllüğü %93 olarak bulunmuş, yalancı pozitif sonuçların transplantasyon sonrasında üç gün içinde %43, yedi gün içinde %64 olduğu bildirilmiştir. Deneyin bu hasta popülasyonunda düşük duyarlılık gösterdiği ve ayrıca kistik fibrozlarla kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda geçici bir pozitiflikle karşılaşılabildiği de vurgulanmıştır.⁴⁶ Serum GM antijeni için monoklonal sandviç EIA'ya ilişkin deneyimler arttıkça, yalancı pozitif de-

neylerin de artma eğilimi gösterdiği ve subklinik infeksiyon, sindirim sisteminde kolonizasyon, siklofosamid ile çapraz reaksiyon gibi çeşitli koşullarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yalancı pozitif sonuçların azaltılabilmesi bakımından, pozitif bir testin belirleyiciliği için art arda iki serum örneği ile çalışılması önerilmiştir de yine yalancı pozitif sonuç oluşabilmektedir.⁴³ Yalancı pozitif GM antijeni sonuçlarıyla özellikle yenidoğanlarda ve pediatrik hasta grubunda karşılaşılmaktadır.^{47,48} Bifidobacterium sp'nin bir lipoteichoic asidinin molekül yapısı benzerliğinden ötürü, Platelia EIA'da kullanılan monoklonal antikor için bir epitop gibi davranabildiği kuramlaştırılmaktadır. Yenidoğanların barsaklarında Bifidobacterium sp'nin yoğun bir şekilde kolonize olduğu ve bağırsak mukozasının olgunlaşmamış olması dolayısıyla lipoteichoic asidin seruma geçebileceği hipotezi öne sürülmüş ve eğer bu doğruysa hastalara gereksiz yere kısmen hedeflenmiş tedavi verilmesini önlemek için gerçek pozitif ile yalancı pozitif ayırdedecek bir yöntem geliştirilmesine gereksinim olduğu bildirilmiştir.⁴⁸ Nötropenik hastalarda stafilokoklar, enterokoklar, Corynebacterium jeikeum, Pseudomonas, Echerichia coli'den ileri gelen bakteremi de yalancı pozitifliğe sebep olabilmektedir.⁴⁹ Ancak bu mikroorganizmalardan eksoantijenler deneyde reaksiyon vermemektedir ve bir başka çalışmada bakteremili hastalarda yalancı pozitif sonuç elde edilmemiştir.⁴³

Gerek LA testi ile gerekse ELISA tekniği ile yalancı pozitif GM antijeni sonuçları alınabilmektedir. Yalancı pozitif GM antijeni test sonuçlarının amoksisilin-klavunat, piperasilin-tazobaktam antibiyotiklerin kullanılması⁵⁰⁻⁵³, otoreaktif antikorlar⁵⁴, böbrek yetmezliği, özellikle çocuk hastalarda kontamine gıdaların yenilmesi⁵⁵ ve diğer küflerle çapraz reaksiyonlar⁵⁶ ile ilgili olabildiği bildirilmiştir. Anti-hayvan antikorlar da sandviç EIA'da yalancı pozitif sonuca sebep olabilmekteyse⁵⁷ de EDTA ile ön işlem veya kaynatma bu sorunu giderebilmektedir.⁴⁰ GM antijeni veya benzer başka moleküller monoklonal antikorların aynı epitopları ile reaksiyona girebilmektedir. Pamuk eküvyonların yalancı pozitif sonuca sebep olduğu ve pamukta Aspergillus GM antijeni ile çapraz

reaksiyon veren epitoplar bulunabileceği öne sürülmüştür.⁵⁸ Bir in vitro araştırmada piperasilin-klavunat ve amoksisilin-klavunat ile Pastorex Aspergillus LA testinde yalancı pozitiflikler elde edildiği bildirilmiştir.⁵⁵ İtalya'da bir KİT ünitesinde hastaların %17'sinde Platelia Aspergillus EIA tekniği ile yalancı pozitif antijenemi saptandığı, bunun piperacillin-tazobactam alan hastalarda görüldüğü bildirilmiştir.⁵¹ Çok yakın tarihte, Walsh ve ark. 2004 piperasilin-tazobactam ile GM antijeninin yalancı pozitifliği arasındaki ilişkiyi in vitro, in vivo ve klinik özelliklerini araştırmışlar ve bağışıklığı bozulmuş hastalarda sıklıkla kullanılan antibiyotiklerden yalnızca piperacillin-tazobactamın in vitro anlamlı miktarda galaktomannan içerdiğini, tavşanlarda damar içine verildiğinde antijenin biriktiğini göstermişlerdir.⁵² Fransa'da da hematoloji hastalarında yapılan bir sürveys çalışmasında yalancı pozitif GM antijeni sonuçlarının piperasilin-klavunat kullanan hastalarda elde edildiği, bu ilaçların GM antijen testi uygulandığında dört lot'den üçünün pozitif sonuç verdiği, dolayısıyla hekimlerin GM antijeni test sonuçlarını yorumlarken bu tedavileri dikkate almaları gerektiğini yazmışlardır.⁵³ Benzer sonuçlar İngiltere'den de bildirilmiştir.⁵⁰ Siklofosamidin de yalancı pozitif sonuçlara sebep olabileceği öne sürülmüş⁵⁹, bu durum bir deneysel aspergilloz modelinde infeksiyondan iki gün önce siklofosamid alan farelerle açıklanmaya çalışılmış⁶⁰, ancak başka çalışmacılar⁴³ siklofosamid alan hastalarda yalancı pozitif sonuçla karşılaşmadıklarını bildirmişlerdir. Bir diğer görüş Aspergillus kolonizasyonunun da antijenemiye ve dolayısıyla yanıltıcı sonuçlara yol açtığı yönündedir ancak Maertens¹ kolonize olan hastalarda yalancı pozitiflikle karşılaşmadığını bildirmiştir. Rohlich ve ark.⁴² da solunum yollarında ısrarlı Aspergillus kolonizasyonu olan kistik fibrozulları değerlendirmişler ve antijenemi belirleyememişlerdir. KİT'lı olup nötropenili dönem boyunca ısrarla GM antijeni pozitif bulunan fakat ne hastanede yatış sırasında ne de çıkarıldıktan sonraki izleme sırasında İA belirtileri bulunmayan hastalarda, yalancı pozitif antijeneminin, GM antijeninin canlı mantar bulunmasa bile kontamine havadan veya yiyeceklerden

alınabildiğini düşündürmüş ve yapılan çalışmada hastane mutfağındaki elmalarda, markette satılan sebzelerde, pastada, pirinçte ve KİT'linin dışkısında GM antijeni pozitifliği gösterilmiştir.⁵⁵ GM antijeni belirlenmesi allojenik kök hücre transplantlı hastaların İA açısından izlenmesi amacıyla kullanıldığında yalancı pozitif sonuçların en sıklıkla hücre baskılayıcı tedaviden sonraki ilk iki haftada karşılaşıldığı⁴³; bunun olasılıkla bağırsak mukozasının kemoterapi veya radyasyonla yıkıma uğraması sebebiyle gıdalarla alınan GM antijeninin fazla absorpsiyonuna bağlı olduğu öne sürülmüştür.⁴⁷

Serum örneğinin *Penicillium chrysogenum* ile kontamine olması halinde ısıya dayanıklı ve pronazla muamele edilerek giderilemeyen kuvvetli pozitif reaksiyon (1:128) elde edildiği bildirilmiştir. Benzer sonuçlar, *Cladosporium herbarum*, *Acremonium*, *Alternaria alternata* gibi havada bol bulunan diğer küflerle, *Rhodotorula rubra* ve *Wangiella dermatitidis* ile de elde edilmiştir. *Fusarium oxysporum* çapraz reaksiyon verirken *F.solani*'nin, *Geotrichum* ve *Rhizopus* cinsi mantarların, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'ın vermediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, İA'lu insan örneklerinden 1: 32'nin üzerinde titre elde edilmesinin nadir olduğuna dayanarak, 24 saatten fazla beklemiş ve $\geq 1: 32$ titre veren örneklerin pozitifliğinin kabul edilmeden önce kültürle doğrulanmasını önermişlerdir.⁵⁶ Bretagne ve ark.⁴⁵ *Phialophora americana*'dan ileri gelen pnömoni ve sinuziti olan bir hastada yalancı pozitiflik bildirmişlerdir. *Fusarium* türleri de *Aspergillus* ve *Mucor* cinsleri gibi damar yayılımı; tromboz ve doku nekrozu gösterirler. Lokal veya sistemik yayımlı çeşitli infeksiyonlara sebep olurlar. Fusaryozun, nötropeni ve kemoterapi alan bağırsıklık ödünlü hastalar, KİT hastaları arasında aspergillozdan sonra ikinci en sık karşılaşılan invaziv küf infeksiyonu^{61,62} olup antifungal ilaçlara çoğunlukla dirençli olduğu da göz önüne alındığında çapraz reaksiyonların dikkatle yorumlanmasının gerekliliği açıktır.

Esasen mannopteinler mantar hücre duvarının önemli ve yapıcı bol bulunan bir bileşenidir. *Aspergillus* GM antijeni APMP1 geni ta-

rafından kodlanmaktadır ve *A.fumigatus*'un afmp1 antijeni ve buna karşı geliştirilmiş antikorların kullanıldığı bir EIA deneyi geliştirilmiş, ve *A.fumigatus* dışında *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus*, *Penicillium marneffeii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis* ve *Histoplasma capsulatum* ile negatif sonuç verdiği, bu testin İA'da özgüllüğünün çok yüksek, duyarlılığının %86.7 olduğu öne sürülmüştür.⁶³ GM antijeni belirleyen *Platelia* EIA'nın erişkin ve pediatrik onkematoloji hastalarında İA tanısında kullanılmasının değerlendirildiği bir çalışmada⁴⁷ testin kanıtlanmış yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı İA epizodlarındaki duyarlılığının sırasıyla % 64.5, %16.4 ve %25.5 bulunduğu; anti-*Aspergillus* antikor pozitif hastalarda antikor negatif hastalardan daha düşük olduğu; yalancı pozitif sonuçların çoğunun çocuklarda ve allojenik hematopoetik kök hücre transplantlılarda bulunduğu; tüm olarak EIA'nın özgüllüğünün %94.8 olarak saptandığı belirtilmiştir. Ayrıca çocuklarda erişkinlere göre ($p<0.0001$) ve allojenik hematopoietik kök hücre transplantı erişkinlerde de allojenik olmayanlara göre ($p=0.0002$) daha düşük olarak belirlenmiş ve sınır değerinin 1.500'den 0.700'e düşürülmesinin allojenik olmayan hematopoietik kök hücre transplantı erişkinler için daha uygun gözüktüğü ve bu testin ya çocuklarda kullanılmaması yada farklı sınır değeri belirlenmesinin uygun olacağı benimsenmiştir. Aynı araştırmacılar GM antijeni belirlemek için ELISA testinin önceki bildirimlerden daha az duyarlı bulunduğunu ve bunun anti-*Aspergillus* antikorları eklenerek artırılabilirliğini önermişlerdir. Hayden ve ark.⁶⁴ ise pediatrik hastalarda 0.5 sınır değerini kullanarak %98.4 özgüllük elde etmişlerdir. Yakın zamanlarda ABD'de FDA da bu değeri belirtmiştir. Buna karşın, kanıtlanmış aspergillozlu bir kısım hastalarda GM antijeni bulunmaması^{43,45} veya belirlenememesidir.³⁹ Verweij ve ark.⁶⁵ GM antijeninin infeksiyon yerinde bulunabilirken serumda bulunmayabildiğini göstererek, bunun antijenin vücut sıvılarında ortaya çıkmayabildiğini düşündüğünü bildirdiler. Ayrıca, infeksiyon apse şeklinde olduğunda kanda *Aspergillus* DNA'sının da bulunmadığı gösterdiler.⁶⁵ Yalancı negatif sonuçların se-

bebi tam olarak bilinmemekle beraber farklı *Aspergillus* türlerinde GM antijeni yapısının farklı olabilmesine de bağlanmaktadır.^{66,67} Derin mikoz laboratuvarımızda da kültür ve görüntüleme teknikleri ile belirlenmiş *A.niger*'den ileri gelen bir aspergilloma olgusunda GM antijeni negatif bulunmuştur.⁶⁸

EORTC/IFICG bağışıklığı baskılanmış hastalardaki derin mantar infeksiyonlarının belirlenmesinde kullanılacak ortak belirleyici terimlerle tanı kriterlerini "ispatlanmış" (proven), "yüksek olasılıklı" (probable) ve "düşük olasılıklı" (possible) olarak üç grupta toplamıştır.³⁶ Bu kriterler kullanılarak allogenik hematopoitik kök hücre transplantlarında yapılan yeni bir çalışmada EIA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %75 ve %100 ve pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %100 ve %97 olarak bulunmuş ve bu hasta grubunda EIA tekniği ile GM antijenini belirlemenin İA tanısını erkene almadığı ancak tanıyı daha netleştirmeye katıldığı sonucuna varılmıştır.⁷⁰ Fransa'da iki yıllık bir sürede 135 hematoloji hastasından 195 nötropenik epizod sırasında 507 örnek toplanarak yapılan bir surveyans çalışmasında da EIA testinin duyarlılığının %69, özgüllüğünün %96 olarak belirlendiği ancak bu testin İA'un erken tanımında rol oynamadığı, sadece yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı aspergilloz ön tanısına katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır.⁷¹ Karaciğer transplantlarında ise GM antijeni pozitifliğinin mortalite ile korele olduğu ve bunun risk altındaki hastaların zayıf sonuç alınan bir alt grubunu belirlemeye yardımcı olabildiği gözlemlenmiştir.⁷²

Aspergillus DNA'sının belirlenmesi için PZT hatta panfungal PZT birkaç çalışmacı grubu tarafından bildirilmiştir. Ancak mantar konidyumlarının çok bol bulunması hastalarda ve kontrol gruplarında yüksek sayıda yalancı pozitiflikle sonuçlanmaktadır. Yakın tarihli bir yayında allojenik KİT hastalarında %100 duyarlılık ve %65 özgüllük bildirilmektedir. Eğer bir hastada test tekrarlar negatif ise, İA riski çok düşük gözükmektedir.⁷³ Hematolojik hastalığı olan İA'lularda invaziv olmayan tanı yöntemlerinin performansının belirlenmesi için Japonya'da yapılan bir çalışmada bir "real-time"

PZT (GeniQ-Asper), çift sandviç EIA ve bir (1-->3)-beta-glukan (BDG) testi (Wako) prospektif olarak karşılaştırılmış ve çift sandviç ELISA'nın en duyarlı yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Yeni belirlenen ispatlanmış, yüksek olasılıklı ve düşük olasılıklı aspergilloz tanı kriterlerine göre yüzaltmış nötropenili hematolojik onkoloji hastasında invaziv pulmoner aspergilloz tanımı için toraks BT ile bronkoalveolar lavaj (BAL) ve serum örneklerinde sandviç EIA ile GM antijeni aranmasını birlikte değerlendiren Becker ve ark.⁷⁴, GM antijeni testinin seri serum örneklerinde duyarlılığını %47, özgüllüğünü %93 olarak bulmuşlar, BT ile birlikte serum GM antijeni testinin pozitif ve negatif prediktif değerlerini %100 ve BAL'da GM antijen testinin pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla %85 ve %100 olarak belirlemişlerdir. Becker ve ark.⁷⁴ GM antijen testinin BT ile birlikte değerlendirildiğinde İA'un erken aşamada ön tanımı için çok yararlı olacağını öne sürmüşlerdir. Halen, İA'un kısmen hedeflenmiş tedavisi ile ilgili anlayış bu görüşe dayanmaktadır.

Bu polisakkaritin doğal olarak kandan hızla temizlenmesi sebebiyle seri serum örnekleriyle çalışılması önem taşımaktadır.⁷⁵ Seri örneklerde GM pozitifliğinin belirlenmesi hastanın durumuna göre bir hafta ile iki ay arasında değişebilmektedir.⁴ Pinel ve ark.⁷⁵ antijenemi düzeyinin hastalığın seyri sırasında arttığını, azalan antijen düzeyinin iyi bir prognoza işaret ettiğini belirtmişlerdir. En yüksek yoğunluğa hastalığın son aşamalarında ulaşmaktadır.⁴

Diğer vücut sıvılarında belirlenmesi: GM antijeni serum dışındaki vücut sıvılarında da belirlenebilmekte ve bazı durumlarda elverişli olabilmektedir. BAL sıvısında GM antijeni belirlenebilmektedir.^{35,74}, ancak solunum yolu kolonizasyonunun yalancı pozitif sonuçlara sebep olabildiği bildirilmiştir. Akciğer aspergillozlu hastaların BAL örneklerinde GM antijeninin belirlenmesi için LA testi tanı açısından yararlı bulunmuştur.⁷⁶ BAL sıvısında GM antijenini EIA yöntemi ile belirleyen bir çalışmada serum ve BAL sonuçları arasında korelasyonun mümkün olduğu; ancak serum pozitifliğinin

bronkoskopiden 30 güne kadar daha önce ortaya çıktığı belirlenmiştir.⁴¹ Bu sonuç, önceki çalışmalarda da ortaya koyulmuş olan, antijeneminin klinik belirtilerden önce geliştiği gözlemini desteklemektedir.

Dissemine aspergillozlu hastalarda merkez sinir sistemi (MSS) tutulumunu ortaya çıkarmak için beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda antijen belirlenmesi ile ilgili bildirimler bulunmaktadır.⁷⁷⁻⁸⁰ Ancak kontrol amaçlı çalışılan MSS tutulumu bulunmayan pulmoner aspergillozlu hastaların da BOS'nda antijen bulunabilmektedir.⁷⁸ Ancak antijenemi yokken BOS'da bulunmasının belirlenmesi, klinik durumun da uygun olması halinde MSS tutulumuna işaret edebilir.⁴⁰ Antijen idrarda da belirlenebilir de duyarlılığı serumdan daha düşüktür.³⁰ Stynen ve ark.³⁰ hepsinde antijenemi bulunan yedi olgunun beşinde idrarda da GM antijeni belirlenmişler ancak yoğunluğunun serumdakinden düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise antijenemili altı nötroopenik hastanın sadece ikisinin idrarında antijen belirlenmiştir.⁸¹

SONUÇ

Literatürde bildirilen sonuçların karşılaştırılması, çalışmalarda farklı sınır değerleri ve farklı İA belirleme kriterleri kullanılmış olması gibi iki esaslı sebepten ötürü olanaksızdır. Ayrıca GM antijeninin in vivo kinetikleri henüz belirlenmemiştir. Ancak EORTC ve NIH Mycosis Study Group hematopoietik kök hücre transplantlı ve onkoloji hastalarında GM antijeninin kanda ısrarla bulunuyor olmasını bu hasta grubu için yüksek olasılıklı invaziv mikozun mikrobiyolojik kriterleri arasında saymıştır³⁴ ve son zamanlarda ortak anlayış GM antijeni pozitifliği ile BT'de hale işareti bulunmasının birlikte anlamlı olduğu yönündedir.

ÖZET

İnvaziv aspergillozun kesin tanısı steril bir vücut bölgesine ait örneğin doğrudan mikroskopta incelenmesiyle *Aspergillus* varlığının gösterilmesi ve kültürde mantarın üretilmesi ile konulmaktadır. Ancak invaziv yöntemler has-

tanın sitopenisi veya kritik koşulları sebebiyle ekseri engellendiğinden kesin tanıya artık mantarın önlenemeyeceği ve tedavinin başarılı olmayacağı bir aşamaya kadar ulaşılmamaktadır. GM antijeni bir eksoantijendir; mantarın hücre duvarı yapısında bulunmakta ve üreme sırasında ortama salınmaktadır. Dolaşan GM antijeninin serumda ve daha nadiren BAL ve diğer vücut sıvılarında saptanması bilgisayarlı tomografi bulgularıyla birleştirilerek değerlendirildiğinde invaziv aspergillozun ön tanısına anlamlı katkıda bulunmaktadır. Güncel mikolojide empirik tedavinin yerini yüksek risk grubu hastalara yönelik ve İA varlığından kuşkulandıran klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik verilere dayanan "kısmen hedeflenmiş" "pre-emptive" tedavi anlayışı yer almaktadır. GM antijeni LA veya EIA ile belirlenebilir. LA testi özellikle kültürler negatif kaldığında, seri örneklerle çalışıldığında ve akciğer aspergillozlu hastaların BAL örnekleriyle çalışıldığında yararlı bulunmuştur.

Sandviç EIA deneyinin ekseri klinik belirtiler ve radyolojik bulgular ortaya çıkmadan galaktomannanemiye belirleyebildiği belirtilmiştir. Yalancı pozitifliğe sebep olabilecek hususlar dikkate alınmak kaydıyla GM antijen pozitifliğinin BT veya radyografi ile birlikte değerlendirildiğinde İA'un erken aşamada ön tanımı için çok yararlı ve kısmen hedeflenmiş tedavi uygulanması için yol gösterici olacağı öne sürülmektedir. Bu yazıda galaktomannan antijeni belirlenmesinin invaziv aspergilloz ön tanımındaki yeri ve önemi gözden geçirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Donnelly JP. Febrile neutropenia: antifungal prophylaxis. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 127-130.
3. Lin SJ, Schranz J, Teut SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358-366.
4. Liao R. Diagnosis of invasive aspergillosis by the detection of galactomannan. www.pathology.wust.edu/labmed/Abstracts/03_20_03_abstr.html

5. Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL. Role of fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Am J Med* 1984; 76: 1027-1034.
6. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 518-523.
7. Saito H, Anaissie EJ, Morice RC. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary infiltrates in patients with acute leukemia. *Chest* 1988; 94: 745-749.
8. Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respiratory Medicine* 1992; 86: 243-248.
9. Pagano L, Pagliari G, Basso A. The role of bronchoalveolar lavage in the microbiological diagnosis of pneumonia in patients with haematological malignancies. *Ann Medicine* 1997; 29: 535-540.
10. Kantarcioğlu A S, Erturan S, Bagdatlı Y, Yaman M. Investigation of fungi in bronchoscopically acquired specimens of patients with pulmonary disorders. 14th ECCMID Clin Microbiol Infect, 2004; 10 (Suppl 1): 633.
11. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, Einsele H, Heussel CP, Kiehl M, Loren J. Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003; 82 (Suppl 2): S118-126.
12. Donnelly JP. Therapy of fungal infections-Strategies for managing invasive aspergillosis. 5th International Symposium on Febrile Neutropenia, (Brussels, December 12/14, 2001). www.febrilneutropenia.org/abstract/e_depau.htm
13. Donnelly, J. P. (2000). A strategy for managing fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2: 88-95.
14. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 (Suppl 1): 11-19.
15. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Walsh TJ. Invasive fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Disease. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
16. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A, Mart Engel A, Bunje D, Kern WV, Scumacher U, Kanz L, Einsele H. Early detection of Aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181: 1713-1719.
17. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancoppe-Olivera RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol*; 38 (Suppl 1): 147-159.
18. Rand KH, Houck H, Wolff M. Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 215-221.
19. Löffler J. Application of PCR to detect fungi in clinical specimens. Program and abstract of the Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy. San Francisco, CA, September 26-29, 1999. Washington DC, American Society for Microbiology, 1999, Abstract 491.
20. Loeffler JH, Hebart S, Sepe C, Schumayer C, Klingebiel T, Einsele II. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycol* 1998; 36: 275-279.
21. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1169-1175.
22. Fenelon LE, Hamilton AJ, Figueroa JI, Bartholomev MA, Allen MH, McCarthy P, Hay RJ. Production of specific monoclonal antibodies to Aspergillus species and their use in immunohistochemical identification of aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1221-1223.
23. Pasmans HLM, Loosveld OJL, Schouten TC. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Findings on plain film and (HR)CT. *Eur J Radiol* 1992; 14: 37-40.
24. Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign and the role of CT in early diagnosis. *Radiology* 1985; 157: 611-614.
25. Taccone A, Occhi M, Garaventa A. CT of invasive pulmonary aspergillosis in children with cancer. *Pediatric Radiology* 1993; 23: 177-180.
26. Blum U, Windfuhr M, Buitrago-Tellez C. Invasive pulmonary aspergillosis MRI, CT, and plain radiographic findings and their contribution for early diagnosis. *Chest* 1994; 106: 1156-1161
27. Primack SI, Hartman TE, Lee KS. Pulmonary nodules in the CT halo sign. *Radiology* 1994; 190: 513-515.
28. Sallustio G, Pagano L, La Barbera EO. Pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies: clinicoradiologic correlation. *Rays* 1994; 19: 465-468.
29. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B;

- Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347: 408-415.
30. Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prévost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latgé JP. Rat monoclonal antibodies against Aspergillus galactomannan. *Infect Immun* 1992; 60: 2237-2245.
 31. Haynes K, Rogers TR. Retrospective evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 670-674.
 32. Hopwood V, Johnson EM, Cornish JM, Foot AB, Evans EG, Warnock DW. Use of the Pastorex aspergillus antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 1995; 48: 210-213.
 33. Verweij PE, Rijs AJ, De Pauw BE, Horrevorts AM, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Clinical evaluation and reproducibility of the Pastorex Aspergillus antigen latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 1995; 48: 474-476.
 34. Denning DW, Marinus A, Cohen J, Spence D, Herbrecht R, Pagano L, Kibber C, Kremery V, Offner F, Cordonier C, John U, Ellis M, Collette L, Sylvester R. An EORTC multicenter prospective survey of invasive aspergillosis haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. *Invasive Fungal Infections Cooperative Group. J Infect* 1998; 2: 173-180.
 35. Warnock DW, Foot ABM, Johnson EM, Mitchel SB, Cornish JM, Oakhill A. Aspergillus antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 1991; 338: 1023-1024.
 36. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 497-500.
 37. Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W, Goessens W, Rozenberg-Arska M, Debets-Ossenkopp YJ, Guiot HFL, Meis JFGM for the Dutch Interuniversity Working Party for Invasive Mycoses. Detection of Antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intr- and interlaboratory reproducibility. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1612-1616.
 38. US Food and Drug Administration 2003 Annual report. Bringing new products to the market. <http://www.fda.gov/cdrh/annual/fy2003/bringing.html>
 39. Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P, Sarfati J, Gluckman E, Latgé J, Derouin F. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 139-145.
 40. Wheat LJ. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transplant Infect Dis* 2003; 5: 158-166.
 41. Verweij PE, Latgé JP, Rijs AJMM, Melchers WJG, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3150-3.
 42. Rohrllich P, Sarfati J, Mariani P, Duval M, Carol A, Saint-Martin C, Bingen E, Latgé JP, Vilmer E. Prospective sandwich enzyme linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 232-7.
 43. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
 44. Machetti M, Feasi M, Mordini N, Van Lint MT, Bacigalupo A, Latgé JP, Sarfati J, Viscoli C. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 917-21.
 45. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1407-1412.
 46. Husain S, Kwak EJ, Obman A, Wagener MM, Kusne S, Stout JE, R McCourry K, Singh N. Prospective assesment of Platelia trade mark Aspergillus galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 796-802.
 47. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Liu KL, Natarajan-Ame S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 1898-1906.
 48. Mennik-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: 325-327.
 49. Swanink CMA, Meis JFGM, Rijs AJMM, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 257-260.
 50. 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: 2366-2367.
51. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, Bacigalupo A. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 913-916.
 52. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, Murray H, Mya-San C, Bacher J, Petraitis. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4744-4748.
 53. Adam O, Auperin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 917-920.
 54. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, Mutou Y. False positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay in a patient with chronic graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 633-634.
 55. Ansorg R, van den Boom R, Rath P-M. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; 40: 353-357.
 56. Kappe R, Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2489-2490.
 57. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferons in immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45: 942-956.
 58. Dalle F, Lopez J, Caillot D, Cuisenier B, Ecartot LA, Dumont L, Bonnin A. False-positive results caused by cotton swabs in commercial *Aspergillus* antigen latex agglutination test. *Eur J Clin Infect Dis* 2002; 21: 130-132.
 59. Levy H, Horak DA, Tegtmeyer BR, Yokota SB, Forman SJ. *Respiratory Medicine* 1992; 86: 243-.
 60. Hurst SF, Reves GH, McLaughlin DW, Reiss E, Morrison CJ. Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 477-485.
 61. La Rocco MT, Burget SJ. Fungal infections in the transplant recipient and laboratory methods for diagnosis. *Rev Iberoam Mycol* 1997; 14: 143-146.
 62. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Muller FM, Lozano-Chiu M, Summerbell RC, Dignani MC, Chanock SC, Walsh TJ. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis* 2001; 333: 1871-1878.
 63. Woo PCY, Chan C-M, Leung ASP, Lau SKP, Che X-Y, Wong SSS, Cao L, Yuen K-Y. Detection of cell wall galactomannoprotein Afmp1p in culture supernatants of *Aspergillus fumigatus* and in sera of aspergillosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4382-4387.
 64. Hayden R, Knapp K, Brandt DA. Detection of *Aspergillus* galactomannan in pediatric serum samples a performance evaluation of the Bio-Rad Platelia *Aspergillus* EIA, Imedex Inc., USA. *Focus on Fungal Infections* 13 (March 19-21, 2003, Maui, Hawaii).
 65. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JHAJ, Bretagne S, Meis JFGM. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3900-3901.
 66. d'Enfert C, Grillot R, Rath PM, Richardson M, Ruechel R, Ruhnke M, Schmidt A, Verweij P. Meetings 2000: Focus on *Aspergillus* and aspergillosis. *Mycology Newsletter* 2000; 1: 6-16.
 67. Klont RR, Meis JFMG, Verweij P. Clinical assesment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 2): 32-37.
 68. Kantarcioğlu AS, Yücel A, Keskinel İ, Erk M. Olgu bildiri: Bir akciğer aspergillozu olgusunun mikoloji yönünden izlenmesi. *Cerr Tıp Fak Derg* 2003; 34: 194-203.
 69. Kantarcioğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. *Cerr Tıp Fak Derg* 2003; 34: 140-157.
 70. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP, Mensa J, Rafel M, Ortega M, Almela M, Martinez C, Fernandez-Aviles F, Martinez JA, Urbano-Ispizua A, Carreras E, Montserrat E. Detection of *Aspergillus* galactomannan by enzyme immunoassay in recipient of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation* 2004; 28: 1260-1264.
 71. Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM, Youssef A, Tancrede C, Pico J, Borhis JH, Fenaux P, Munck JN. Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J* 2000; 1: 111-116.
 72. Kwak EJ, Husain S, Obman A, Meinke L, Stout J, Kusne S, Wagener MM, Singh N. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 435-438.
 73. Skladny H, Buchreidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and

- bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two step PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3865-3871.
74. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based bronchoalveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Hematol* 2003; 121: 448-457.
75. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2184-6.
76. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Cauvaillier JF, Durand C, Cuisenier B, Solary E, Piard F, Petrella T, Bonnin A, Couillault G, Dumas M, Guy H. Improved management of invasive aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997;15: 139-47.
77. Machetti M, Zotti M, Veroni L, Mordini N, van Lint MT, Bacigalupo A, Paola D, Viscoli C. Antigen detection in the diagnosis and management of a patient with probable cerebral aspergillosis treated with voriconazole. *Transplant Infect Dis* 2000; 2: 340-344.
78. Viscoli C, Machetti M, Gazzola E, de Maria A, Paola D, van Lint MT, Gualandi F, Truini M, Bacigalupo A. *Aspergillus* galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1496-1499.
79. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullberg BJ, Meis JF. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by non-culture based microbiological methods and management. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1186-1189.
80. Kami M, Ogawa S, Kanda Y, Tanaka Y, Machida U, Matsumura T, Sakamaki H, Hirai H. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol* 1999; 106: 536-537.
81. Salonen J, Lehtonen OP, Terasjarvi MR, Nikoskelainen J. *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 485-490.