



# Mantar İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Klasik Yöntemler ve Yeni Gelişmeler

## Classical Methods and New Developments in Laboratory Diagnosis of Fungal Infections

Dolunay GÜLMEZ<sup>1</sup>(iD), Şehnaz ALP<sup>2</sup>(iD)

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Makale atfı:** Gülmez D, Alp Ş. Mantar infeksiyonlarının laboratuvar tanısında klasik yöntemler ve yeni gelişmeler. FLORA 2021;26(1):34-49.

### ÖZ

Mantarların etken olduğu hastalıklar dünyada çok sayıda kişiyi etkilemektedir. Son zamanlarda bağışıklık sistemini baskılayan hastalıkların ve tedavi uygulamalarının artması, mantar infeksiyonlarının sıklığı ve çeşitliliğinde artışa neden olmuştur. Bu durum, zamanında ve kesin tanıyı zorlaştırmış ve daha başarılı tanısal yaklaşımlara gereksinimini artırmıştır. Özellikle invaziv mantar infeksiyonlarının tanısında yeni yöntemler geliştirilerek risk altındaki hastalarda erken dönemde doğru tanının konması ve prognozun iyileştirilmesine çalışılmaktadır. Bu amaçla, tanımlanan yeni testlerin farklı hasta gruplarında ve farklı patojenler için performansları değerlendirilmektedir. Uygun bulunanlar tanı algoritmalarına eklenmektedir. Bu derlemede mantar infeksiyonlarının tanısı için kullanılan konvansiyonel ve non-konvansiyonel laboratuvar tanı testlerinin avantaj ve dezavantajları ile özetlenmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mantarlar; Tanı; İnvaziv mikoz; İnvaziv kandidoz; İnvaziv aspergilloz

### ABSTRACT

## Classical Methods and New Developments in Laboratory Diagnosis of Fungal Infections

Dolunay GÜLMEZ<sup>1</sup>, Şehnaz ALP<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Microbiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

Diseases caused by fungi affect a large number of people in the world. Recently, the increase of diseases and treatment applications that suppress the immune system has caused a rise in the frequency and variety of fungal infections. This has complicated timely and definitive diagnosis and increased the need for more successful diagnostic approaches. New methods are developed especially for the diagnosis of invasive fungal infections in order to provide early and correct diagnosis and improve prognosis in vulnerable patients. For this purpose, the performances of new tests defined are evaluated in different patient groups and for different pathogens. Those found suitable are added to diagnostic algorithms. The aim of this review was to summarize the conventional and non-conventional laboratory diagnostic tests used for fungal diagnosis with their advantages and disadvantages.

**Key Words:** Fungi; Diagnosis; Invasive mycoses; Invasive candidiasis; Invasive aspergillosis

Geliş Tarihi/Received: 21/08/2020 - Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 03/01/2021

©Telif Hakkı 2021 Flora. Makale metnine www.floradergisi.org web adresinden ulaşılabilir.

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 24.03.2021

## GİRİŞ

Dünyada var olduğu düşünülen 1-5 milyon mantar türünden birkaç yüz kadarı insanlarda enfeksiyona neden olabilmekte, çok daha azı sağlıklı insanlarda etken olarak gözlenebilmektedir. Son dönemde modern tıptaki gelişmeler, mantar enfeksiyonlarına açık büyük bir popülasyon yaratmıştır. Sadece insanda yerleşen patojenlerin aksine, doğada geniş rezervuarları bulunan mantarların gelecekte giderek artan sorunlar olarak karşımıza çıkması olasıdır<sup>[1,2]</sup>. Mantarlara bağlı hastalıklar, sanıldandan daha fazla kişiyi etkilemektedir. Yılda yaklaşık bir milyar kişinin mantar hastalıklarından etkilendiği ve 1.5 milyon kişinin öldüğü düşünülmektedir<sup>[3]</sup>. Mantar hastalıkları hakkındaki farkındalığı artırmayı hedefleyen uluslararası bir platform olan “Leading International Fungal Education” (LIFE, <http://www.life-worldwide.org/>), konuya dikkat çekebilmek amacıyla farklı ülkelerdeki mantar enfeksiyonu yükünü tahmin eden modelleme çalışmalarını teşvik etmektedir. Bu amaçla 2013’ten beri yürütülen çalışmalar, dünya nüfusunun yaklaşık %80’i için ciddi mantar hastalığı riskinin varlığını ortaya çıkarmıştır<sup>[4]</sup>. Türkiye için yapılan çalışmada, modellemenin hata potansiyeline dikkat çekilmekle birlikte, ülkemizde rastlanan mantar enfeksiyonlarının belgelenenden fazla olabileceği belirtilmiştir<sup>[5]</sup>. Mantar enfeksiyonlarına ilişkin farkındalığın artması, şüpheli klinik tablonun varlığında laboratuvara bildirilerek gerekli mikolojik yöntemlerin uygulanabilmesini sağlayabilecek ve olguların tanı alabilmesine yardımcı olacaktır.

Mantar enfeksiyonlarının tanısı geleneksel olarak direkt mikroskopi ve kültüre dayanmaktadır. Bu yöntemlerin yetersiz kaldığı, geç sonuç verdiği veya uygulanmadığı durumlar sık karşımıza çıkmaktadır<sup>[6]</sup>. Yakın dönemde geliştirilen ve tanı kılavuzlarında önerilmeye başlanan seroloji ve moleküler temelli testler, konvansiyonel testler ile birlikte kullanıldıklarında bazı hasta gruplarında tanıya katkı sağlamaktadır. İlgili merkezin hasta profili ve coğrafi yerleşimi, mantar enfeksiyonlarında etkenlerin dağılımını büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, laboratuvarında kullanılması planlanan testlerin kılavuz önerilerinin yanı sıra, merkez özelliklerine göre de planlanması gerekliliğine dikkat edilmelidir<sup>[6]</sup>. Bu derlemede, mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılan testlerin avan-

taj ve dezavantajları ile birlikte özetlenmesi amaçlanmıştır. Tanıda ve sonrasında tedavinin yönlendirilmesinde önemli rol oynayabilmesine karşın, etken mantarın tanımlanmasına yönelik yöntemler dışarıda bırakılmıştır.

## Konvansiyonel Yöntemler

Geleneksel olarak mantar enfeksiyonlarının tanısı direkt mikroskopi ve kültür ile etken mantarın klinik örnekte gösterilmesine dayanmaktadır. Bu nedenle klasik tanı ve sonrasında etkenin tanımlanması mantarın morfolojisi ve yapısal detaylarından büyük ölçüde etkilenmektedir<sup>[7]</sup>. Mayalar ve küfler olmak üzere iki morfolojik mantar şekli tanımlanmışsa da, aralarındaki ayırım her zaman çok net değildir<sup>[6,7]</sup>. Maya mantarları, genellikle tomurcuklanma yoluyla aseksüel olarak üreyen tek hücreli organizmalardır. Katı besiyerinde üremiş olan maya kolonileri genellikle düzgün kenarlı ve yuvarlaktır. Maya kolonilerinin agar yüzeyindeki makroskopik görünümü bakteri kolonilerine benzediğinden, Gram boyası veya ıslak preparat ile mikroskopik olarak değerlendirilmediklerinde yanlışlıkla bakteri olarak değerlendirilebilirler. Küf mantarları, çok hücreli filamentöz mantarlardır. Küfün filamentöz doğası, kültürde üremiş olan küf kolonilerine yünsü, tüysü veya kadifemsi görünüm verir. Bazı durumlarda, aseksüel üreme yapılarının oluşumu nedeniyle granüler veya tozlu micelyum yapıları ortaya çıkabilir. Ayrıca, bazı küf kolonileri düz (pürüzsüz) olabilirken, bazı maya mantarları da makroskopik olarak görülebilen filamentöz yapılar oluşturabilirler. Küf kolonilerinin filamentöz aktinomiçetes kolonilerinden ayrımı gerekebilmektedir<sup>[7]</sup>. Farklı koşullarda küf veya maya formunda bulunabilen dimorfik mantarlar da tanımlanmıştır. Özellikle in vivo ortamda çok çeşitli morfolojiler de gözlenebilmektedir<sup>[6,7]</sup>. Mantarlara özgü belirgin morfolojik özellikler, mantar enfeksiyonlarının tanısında ve etkenin tanımlanmasında başarı ile kullanılmışlardır. Halen, nadir görülen etkenlerle gelişen enfeksiyonların tanısında etkenin kültürde üretilerek tanımlanması gerekmektedir<sup>[8]</sup>. Ancak, kültür yapılmasının zamanında ve kesin tanımlamada yetersiz kalabildiği durumlar, diğer tanı testlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır.

Mantar enfeksiyonunun tanısı amacıyla laboratuvarında uygulanacak olan tüm işlemler, gerekli biyogüvenlik düzeyi koşullarına uyumlu laboratuvar-

larda ve eğitimli personel ile gerçekleştirilmelidir. Ayrıca, kültürde gelişen mantar sporları saçılarak diğer örnekleri kontamine edebilmektedir. Moleküler yöntemlerde de, özellikle nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında infeksiyon bölgesine yakın anatomik bölgelerde veya çevrede bulunan mantarlar ile kontaminasyon olabilmektedir. Bunların önlenmesi için, mikolojik tetkiklerde ek tedbirler gerekebilmektedir<sup>[7]</sup>.

### Direkt İnceleme

Direkt mikroskopide mantarlara ait yapıların saptanması, mantar infeksiyonlarının tanısında hızlı bir yöntem olarak halen yerini korumaktadır<sup>[7,9]</sup>. İnvaziv mikozların tanısında steril vücut sıvıları ve dokularda direkt mikroskopi zorunlu kabul edilmektedir<sup>[10,11]</sup>. Eğitimli ve deneyimli personel tarafından mantar yapılarının güvenilir şekilde ayırt edilebilmesi, özellikle küf üreyen kültürlerde kontaminasyon ile kolonizasyon/infeksiyon ayrımının yapılabilmesini kolaylaştırmakta ve sonucun sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, negatif sonuç mantar infeksiyonunu ekarte ettirememektedir. Kültür ve direkt mikroskopi sonuçlarını kıyaslayan çalışmalarda duyarlılık %20 ile %80 arasında değişmektedir<sup>[9]</sup>. Klinik örnekte bulunan mantar elemanlarının az sayıda, fragmente ve/veya nekrotik olması yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Rutin laboratuvar da artefaktların mantar elemanlarıyla karıştırıldığı yanlış pozitif sonuçlar raporlanabilmektedir. Bu durumlarda farklı boyama yöntemlerinin kullanımı ve doku reaksiyonlarının değerlendirilmesi de önem kazanmaktadır. Bunun dışında görüntünün belirli bir etken lehine veya aleyhine yanlış yorumlandığı durumlara da rastlanmaktadır. Psödohipflerin hif olarak, antifungal maruziyeti sonrası yapısı bozulan hiflerin *Mucorales* takımına ait küf olarak raporlandığı durumlar olabilmektedir<sup>[7,9]</sup>. Nadiren, etkenin cins/tür düzeyinde tanımlanmasını sağlayabilecek mantar yapıları dokuda görülebilmektedir ve bunlar alışkın olmayan gözlerden kaçabilmektedir<sup>[12]</sup>. Direkt mikroskopi, tüm dezavantajlarına karşın, mantar infeksiyonlarının değerlendirilmesinde kontaminasyon, kolonizasyon ve etken ayrımının yapılmasında değerini korumaktadır<sup>[7,9]</sup>.

Klinik materyalin direkt incelemesi için çeşitli yöntemler kullanılabilir.

### Islak Preparat

Örneğe ait süspansiyonun lam üzerine konulup, lamelle kapatılarak kısık ışık altında incelenmesi oldukça kolay bir yöntemdir. Kuru veya akışkan olmayan örneklerin, inceleme öncesinde serum fizyolojik gibi bir solüsyonla işlem görmesi gerekebilir. Bu yöntemle maya hücreleri ve hiflerin görülmeleri mümkündür. Ayrıca; tırnak, deri kazıntısı gibi doku artığı ve hücreler içeren örneklerin potasyum hidroksit (KOH) solüsyonu ile hazırlanması, doku materyalinin çözünmesini ve mantar yapılarının daha görünür hale gelmesini sağlayabilmektedir. Preparatların ısıtılması, dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmesi, boya (mürekkep, çini mürekkebi, kalkoflor beyazı, Papanicolaou gibi) eklenmesi gibi yöntemler işlemin hızlanmasına veya mantarlara ait yapıların belirginleşmesine katkıda bulunabilmektedir<sup>[7,9,13]</sup>.

### Gram Boyama

Mayaların çoğu ve hif yapıları tamamen veya kısmen gram-pozitif boyanmaktadır. Gram ile boyanmış preparatların mikroskopik incelemesinde boyutları ve tomurcuklanan hücre varlığı ile mayalar bakteri hücrelerinden ayırt edilebilmektedir. Gram boyama, *Actinomyces* ve *Nocardia* gibi gram-pozitif dallanan basillerin hiflerden ayrımı için de yararlı olabilmektedir<sup>[7,9]</sup>.

### Çini Mürekkebi ile Boyama

Beyin omurilik sıvısı (BOS) başta olmak üzere, sıvı klinik örnekler santrifüj edildikten sonra oluşan cökelti lam üzerine alınıp, 1-2 damla çini mürekkebi ile boyanabilmektedir. *Cryptococcus neoformans/gattii*, nadiren de olsa diğer *Cryptococcus* türleri ve *Rhodotorula* gibi kapsüllü mayalarda kapsül, negatif boyanma ile mantar hücresi çevresinde berrak bir boşluk olarak belirginleşmekte ve gri-siyah zeminde kapsüllü, tomurcuklanan maya hücreleri gözlenebilmektedir. Bazı suslarda in vitro ortamda gelişen kapsülün ince olması nedeniyle bu yöntemle saptanamaması da mümkündür<sup>[7,9]</sup>.

### Giemsa, Wright ve Papanicolaou Boyaları

Histoplazmoz şüphesi bulunan durumlarda makrofajlar içindeki maya hücrelerinin gösterilmesinde Giemsa, Wright veya Papanicolaou boyalarından yararlanılabilmektedir<sup>[7,9]</sup>. Ancak bu boyalar mantarlara ait duvar yapısını belirginleştirmemek-

te, doku reaksiyonunun gösterilmesine yardımcı olmaktadır<sup>[9]</sup>.

### Histokimyasal Boyalar

Biyopsi örneklerinin patolojik incelemesi, mantar infeksiyonlarının tanısı amacıyla sık kullanılmaktadır. Patoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan Hematoksilen eozin (H-E) boyası, konak reaksiyonunun gösterilmesinin yanı sıra mantarın hiyalen (renksiz) veya dematisiyöz (doğal pigmentli) olduğunun anlaşılmasında yararlı olabilmektedir. Dokuda mantarları saptamak için bazı özel boyama yöntemleri de kullanılabilir. Gomori'nin metenamin gümüşleme (GMS) yöntemi, arka planın minimum ölçüde boyanmasıyla yüksek düzeyde kontrast sağlayarak mantar yapılarının görülmesini mümkün kılmaktadır. Zemin boyası olarak H-E kullanılacak şekilde birleştirilerek kullanılabilen GMS, hem doku hem de mantara ilişkin detaylı morfolojik inceleme sağlanabilmektedir. Periyodik asit Schiff (PAS) yöntemi ise, iç detayların gösterilmesi için kullanışlıdır. Griedley mantar boyası, çoğu mantar duvarını boyayabilmektedir. Mayer'in musikarmin boyası, mukopolisakkaritleri boyadığı için *Cryptococcus neoformans* gibi kapsüllü mantarlarda mukoid kapsülün gösterilmesinde kullanılabilir. Melanin ve öncüllerini belirginleştiren Fontana-Masson ve diğer melanin boya, esmer mantarların gösterilmesi için tercih edilebilmektedir<sup>[9]</sup>.

### Kalkoflor Beyazı ile Boyama

Bir florokrom bileşik olan kalkoflor, mantarın hücre duvarındaki kitine bağlanarak uzun dalga boylu ultraviyole ışığına maruz kaldığında floresans vermekte ve floresan mikroskopta mantarı belirginleştirmektedir. Kalkoflor beyazının, potasyum hidroksit ile birlikte uygulanmasının mantara ait yapıların daha kolay görülmesini sağladığı belirtilmektedir<sup>[7,9]</sup>.

### Direkt İmmünfloresan Boyama

Belirli bir mantara karşı geliştirilen işaretli monoklonal veya poliklonal antikorlar tanıda yardımcı olabilmektedir<sup>[9]</sup>. *Pneumocystis jirovecii* tanısında floresan işaretli spesifik antikorlar ile boyama tercih edilmektedir<sup>[7,9,14]</sup>. *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Pneumocystis*, *Sporothrix*, *Paracoccidioides*, *Penicillium*, *Candida*, *Aspergillus*, ve *Mucorales* gibi çok farklı man-

tarların tanısı için geliştirilmiş testler bulunsa da çapraz reaksiyonların sorun olabileceği bildirilmiştir ve rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmamaktadır<sup>[9]</sup>.

### Kültür Yöntemi

Kültür yönteminin en önemli avantajı, saf olarak elde edilen patojenin kesin olarak tanımlanmasına ve gerekli durumlarda antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Tüm mikrobiyolojik kültürlerde olduğu gibi, mantar kültürünün başarısı için de infeksiyon bölgesinden yeterli miktarda örnek alımı gereklidir. Kültür için infeksiyon bölgesinden alınan doku ve sıvı örnekleri tercih edilmektedir. Zorunlu olmadıkça sürüntü örneklerinden kaçınılmalıdır. Daha invaziv yöntemlerle alınan örnekler, örneğin balgama kıyasla bronkoalveolar lavaj (BAL), etken mantarın üreme olasılığını artırabilmektedir. Ancak, invaziv örnek almanın zorlukları ve olası komplikasyon riski nedeni ile bu karar her hastanın durumuna göre alınmalıdır<sup>[7,15,16]</sup>. Özel besiyeri veya inkübasyon koşulları gerektiren mantarların (Örneğin *Malassezia* veya *Histoplasma* türleri gibi) etken olduğu düşünülüyorsa laboratuvara bildirilmesi uygun olacaktır<sup>[7,16]</sup>. Mantar infeksiyonlarının tanısında kültür yöntemlerinin duyarlılığı sınırlıdır. Örneğin, kan kültürlerinin dissemine kandidoz olgularının yaklaşık %50 kadarını tespit edebildiği düşünülmektedir<sup>[17]</sup>. Kan kültürü, kandidemi olmadan gelişen derin yerleşimli kandidozlarda ise yararlı olamamaktadır<sup>[15]</sup>. *Fusarium* veya *Scedosporium*'un etken olduğu hyalohifomikozlarda kan kültürlerinin yaklaşık yarısında üreme gözlenebilmektedir<sup>[8]</sup>. Aspergilloz için BAL kültürlerinin duyarlılığının %30-60 arasında değiştiği bildirilmiştir<sup>[16]</sup>. Kültür duyarlılığını artırmak için 2 mL'nin üzerindeki hacimlerde gönderilen steril vücut sıvıları ve BAL örneklerinin santrifüj edilerek dipteki tortudan ekim yapılması önerilmektedir<sup>[7,18]</sup>. Homojen olmayan örnekler de sorunludur. Solunum yolu örneklerinden standart ekim yapılabilmesi amacıyla homojenizasyon ve dilüsyon yapıldığında kültürün duyarlılığı azalmaktadır. Seyreltilmeyen örneklerden yapılan ekimler, yüksek hacimde örneğin kültürüne olanak tanıyarak aspergilloz tanısında duyarlılığı artırabilmektedir<sup>[19]</sup>. Doku örnekleri de mikroorganizma içeriği açısından homojen değildirler. Bu nedenle alınan dokunun en az bezelye

boyutunda olması ve hiflerin (özellikle *Mucorales* takımına ait küf mantarlarına ait septasız hiflerin) hasar görmemesi için ezilmeden kesilip küçük parçalara ayrılarak ekilmesi önerilmektedir<sup>[7,18]</sup>. Ayrıca, kültürde etken mantarların üremesi zaman alıcıdır<sup>[7,18]</sup>. Bazı yavaş üreyen mantarların (dermatofitler, *Histoplasma*, *Blastomyces* gibi) ortaya çıkması iki haftayı aşabilmektedir<sup>[7]</sup>. Buna ek olarak, özellikle filamentöz mantarlarda tipik morfoloji gösteren olgun kolonilerin gelişmesi de zaman almaktadır. Uzun süreli inkübasyon, kültür plaklarında kuruma ve kontaminasyon riskini de beraberinde getirmektedir. Kültürde üretilemeyen mantarlar da bulunmaktadır. Atipik bir mantar cinsi olan *Pneumocystis*, rutin laboratuvarlarda kullanılan yöntemler ile kültürde üretilememiştir<sup>[20]</sup>. Belirtilen dezavantajlarına karşın, kültür yöntemleri mantar infeksiyonlarının tanısında zorunlu ve altın standart tanı yöntemi olarak yerini korumaktadır<sup>[10,11]</sup>.

Mantarların kültürde üretilebilmeleri amacıyla örnekler genel amaçlı mantar besiyerlerine ekilirler. En sık kullanılan besiyeri pH'sı 5,5-5,6 olan Sabouraud dekstroza agar (SDA). Patates dekstroza agar, SDA'nın daha az glukoz içeren ve pH'sı 6,8-7,0 olan Emmons modifikasyonu ve "inhibitory mold agar" da klinik mikoloji laboratuvarlarında genel izolasyon besiyeri olarak kullanılabilir<sup>[7]</sup>. Steril olmayan bölgelerden veya kontamine olma olasılığı bulunan bölgelerden alınan örneklerin ek olarak seçici bir besiyerine de ekilmesi önerilir. Örneğin; dermatofitler için mikobiyotik agar, "inhibitory mold agar" gibi antibiyotik ve saprofit mantarları inhibe eden sikloheksimid içeren besiyerleri kullanılabilir. Doku örnekleri için, özellikle dimorfik bir mantarın etyolojik ajan olabileceği durumlarda, antibiyotik eklenmiş kanlı beyin kalp infüzyon agar gibi zenginleştirilmiş besiyerleri önerilmektedir. *Malassezia* türleri gibi üremesi için ek besin gereksinimi olan mantarlar için Leeming-Notman veya Dixon besiyerleri uygun olabilmektedir<sup>[7,13]</sup>.

Klinik örneklerden maya mantarlarının üretilebilmesi için kromojenik besiyerleri de kullanıma girmiştir. Bu besiyerlerinde; sık rastlanan *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* ve *Candida krusei* gibi türler farklı renklerde koloniler oluşturmaktadırlar. Bu besiyerinin, bir örnek içinde farklı *Candida* türlerinin karışık kültürlerini saptamada elverişli olduğu gösterilmiştir<sup>[7,21]</sup>.

Mantarların büyük bir bölümü 1-2 haftada in vitro olarak üreyebilmektedir. Dermatofitler ve termal dimorfik mantarlar gibi daha yavaş üreyen mantarlar için, iki haftadan daha uzun süre beklemek gerekebilir. Özellikle yüzeysel infeksiyon etkeni mantarların üremesini desteklemek amacıyla 36 ± 1°C'ye ek olarak daha düşük sıcaklıklarda (30°C hatta 25°C'de) inkübasyon önerilmektedir<sup>[7]</sup>.

Kan kültürlerinden mantarların izolasyonu için, otomatik kan kültürü sistemleri tercih edilmektedir. Bu sistemlerde genellikle 5-7 gün inkübasyon sonrasında çoğu mantar izole edilebilmekteyse de, inkübasyonun 10 güne kadar uzatılmasının *C. glabrata* ve *C. neoformans* gibi patojenlerin üreme oranlarını artırdığı belirtilmiştir<sup>[7]</sup>. İnkübasyon süresi; küf mantarlarından şüphelenildiğinde 14 güne, *Histoplasma capsulatum* veya *Blastomyces dermatitidis* şüphesinde 6-8 haftaya kadar uzatılabilir<sup>[18]</sup>. Mantarlar aerobik organizmalar olduklarından saptanmaları için aerobik kültür şişeleri tercih edilmekte, anaerobik şişelerde üreme oranları azalmaktadır<sup>[22]</sup>. Ticari sistemlerde hangi mantarların üremesinin desteklendiğini kontrol etmek için üreticinin kılavuzları kontrol edilmelidir<sup>[18]</sup>. Bazı sistemlerde özel mikolojik şişelerin kullanımı önerilmektedir<sup>[7,23]</sup>. Örneğin, BACTEC sisteminde (BD diagnostics, ABD) mantara özgü şişelerin kullanımı ile *C. glabrata* izolasyonu artmakta ve daha erken pozitif sinyal alınabilmektedir<sup>[24]</sup>. Farklı ticari sistemlerin performanslarında da farklılıklar bulunmaktadır. Sık görülen beş *Candida* türünü standart miktarlarda aerobik, anaerobik ve mikolojik şişelere ekleyerek BACTEC ve BacT/Alert (BioMérieux, Fransa) sistemlerini karşılaştıran bir çalışmada, mikolojik şişe kullanıldığında pozitif sinyalin daha erken alınabildiğini gösterilmiştir. Ancak; aerobik şişeler kullanıldığında BacT/Alert sisteminde tüm pozitif şişeler saptanırken, BACTEC sisteminde yalnızca negatiflikler gözlenmiştir<sup>[22]</sup>. *H. capsulatum* ve küflerin kandan izolasyonunda lizis-santrifüj sistemlerinin avantajlı olduğu da bildirilmiştir<sup>[7]</sup>. Kan kültüründe mantar üremesinden şüphelenildiği durumlarda, etken mantara ve kullanılan yöntemlere göre gerektiğinde mikolojik şişelerin kullanımı tanıya katkı sağlayabilmektedir.

Steril olmayan örneklerde gözlenen mantar üremelerinin hastalık etkeni olup olmadıklarının anlaşılması, mantarların mikrobiyota üyesi olarak vücudun farklı bölgelerinde bulunabilmeleri nedeniyle güç



olabilmektedir<sup>[15]</sup>. Örneğin, idrar örneklerinde bakteriyel üremelerin klinik anlamını ortaya koyabilmek için kantitatif ekim yapılmakta ve üreyen bakterinin koloni sayısı ile birlikte değerlendirme yapılmaktadır. Oysa, mantar üremelerinde koloni sayılarının hastalık durumu ile ilişkisi gösterilememiştir<sup>[25]</sup>.

Kültürde elde edilen patojenin tanımlanması da önemli bir süreçtir ve etken mantarlarda zaman alıcıdır. Tanımlamanın hızlandırılması için matrisli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS) kütüphanelerinin genişletilmesi çabaları son dönemde büyük başarı göstermiştir<sup>[7]</sup>. Ayrıca özellikle kan kültürlerindeki üreme sonrasında katı besiyerinde subkültür yapılmadan etkenin tanımlanmasına yardımcı olan yöntemler de geliştirilmektedir. Bu yöntemler, maya üreyen kan kültürü şişelerinde uygulanmakta ve doğrudan şişeden germ tüp testi gibi daha geleneksel yöntemlerden<sup>[26]</sup>, sık rastlanan kandidemi etkenlerini tanıyan floresan işaretli moleküler probalar kullanan PNA-FISH<sup>[7,15,18,27]</sup> veya şişeden doğrudan MALDI-TOF-MS ile tanımlama yapan SepsisTyper (Bruker Dantoni, Almanya)<sup>[28]</sup> gibi sistemlere kadar değişmektedir.

### Non-konvansiyonel Testler

Mantar infeksiyonlarının tanısında direkt mikroskop ve kültürün yetersiz kalması, farklı tanı testlerine ihtiyaç doğurmuştur. Sık gözlenen *Candida* veya *Aspergillus* gibi etkenlerin tespit edilmesine yönelik testler kullanıma girmiştir. Etken olabilecek tüm mantarların kapsamaya çalışan "panfungal" testler de bulunmakta ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Böylece, nadir görülen etkenlerin de tanıda atlanmaması hedeflenmektedir<sup>[6,7,15]</sup>. Bu bölümde sözü geçen non-konvansiyonel testlerin, tek başlarına değil geleneksel yöntemler ile birlikte kullanımı önerilmektedir. Çoğu durumda birden fazla non-konvansiyonel testin kullanımı tanıya ve farklı klinik tabloların ayırmasına katkı sağlamaktadır<sup>[11,29,30]</sup>. Sık gözlenen fırsatçı infeksiyonlarda konvansiyonel testlere ek olarak kullanılabilen testler Tablo 1'de özetlenmiştir.

### Antijen ve Antikor Temelli Tanı Testleri

Bazı patojen mantarlar için antijen ve antikor saptanması temeline dayalı testler bulunmaktadır. İmmünkompromize hastaların yeterli hümmoral yanıt oluşturamaması, antikor saptama testlerinin

bu grup hastalarda kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır<sup>[11,15,16,29]</sup>.

### 1,3-beta-D-glukan

Mantarların çoğunda duvar yapısının önemli bir bileşeni olan 1,3-beta-D-glukanın serumda tespiti, "panfungal" bir test olarak invaziv mikozların tanısına yardımcı olabilmektedir. Glukanların, invaziv mantar infeksiyonlarında etken mantarın hücre duvarından sistemik dolaşıma salındığı gösterilmiştir. 1,3-beta-D-glukan testi etken mantarı ayırt edememekle birlikte, riskli hasta gruplarında invaziv mikoz tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Konak faktörleri ve diğer tanısal testlerle birlikte değerlendirildiğinde, yüksek negatif prediktif değeri sayesinde invaziv mikoz tanısının ekarte edilmesinde yararlı olmaktadır<sup>[16]</sup>. Ancak, immünkompetan çocuklarda ortalama 1,3-beta-D-glukan düzeylerinin yüksek olması ve çocuklar için optimal eşik değerlerinin belirlenmemiş olması nedeniyle pediatrik hastalarda değerlendirilmesi sorunludur. Çocuklarda invaziv aspergilloz tarama ve tanısında 1,3-beta-D-glukan testinin kullanılmaması önerilmektedir<sup>[31]</sup>. Ayrıca; testin *Mucorales* takımı, *Cryptococcus* ve *Blastomyces* gibi önemli bazı patojenlerin neden oldukları infeksiyonlarda yararlı olamayacağı akılda tutulmalıdır<sup>[17,32]</sup>. Hastada mantar kolonizasyonu, eşzamanlı bakteriyemi (özellikle *Streptococcus* türleri ile) veya mukozit varlığında, selüloz membranlar kullanılarak hemodiyaliz uygulanan hastalarda, beta-glukan içeren selüloz filtrelerle işlem görmüş immünoglobülin, albümin ve diğer kan ürünlerini alanlarda, gazlı bez ve bazı ilaçların kullanımı durumunda da yalancı pozitiflik gözlenebilmektedir<sup>[10,17,32]</sup>. İlk Food and Drug Administration (FDA) ve CE onaylı (Avrupa Ekonomik Bölgesi'nde satış için gerekli yasal gerekliliklere sahip olduğunu gösteren belge, <https://ec.europa.eu/growth/single-market/ce-marking/>) ticari 1,3-beta-D-glukan testleri hasta serumu ile Limulus ameobosit lizati (LAL) arasındaki reaksiyonu kolorimetrik olarak ölçmektedir<sup>[17,33,34]</sup>. Bu yöntemin maliyet etkin olabilmesi için rutin laboratuvarlarda hasta örneklerinin biriktirilerek belirli günlerde çalışılması gerekmekte, test sonuçlarında varyasyon oranının yüksek olması nedeniyle örneklerin çift çalışılması önerilmekte ve okumanın kolorimetrik olması (sarı renk değişimi) nedeniyle hemolizli veya lipemik serum örneklerinde yalancı

Tablo 1. Sık rastlanan fırsatçı mantar infeksiyonlarında kullanılabilen non-konvansiyonel laboratuvar tanı testleri ve temel özellikleri

Test	Yöntem	Kapsam	Kullanım	Notlar
1,3-beta-D-glukan	"Limulus assay"	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pneumocystis</i> , <i>Coccidioides</i> ve diğer çoğu patojen mantar	İnvaziv mikozlar	Etken mantar ayırt edilemez. <i>Mucorales</i> , <i>Cryptococcus</i> ve <i>Blastomyces</i> infeksiyonlarının tanısında yetersiz. Çocuk hastalarda kullanımı önerilmiyor. Yanlış pozitiflik oranları genellikle yüksek. Etken <i>Candida</i> türlerine göre performansı değişken.
Mannan Ag ve anti-mannan Ab	EIA	<i>Candida</i> spp.	Kandidemi, kronik dissemine kandidoz	
<i>Candida albicans</i> germ tüp antikoru	EIA	<i>C. albicans</i>	İnvaziv kandidoz	<i>C. albicans</i> dışındaki türler ile gelişen invaziv kandidozlarda da pozitif olabilir ama duyarlılık daha düşük (özellikle <i>C. tropicalis</i> için).
<i>Candida</i> PZR	PZR ("in house" veya ticari sistemler)	<i>Candida</i> spp.	Kandidemi	Yöntemler çok çeşitli ve tanıl değer değişken. Genellikle sık rastlanan türler ( <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> ve <i>C. krusei</i> ) ile sınırlı.
Galaktomannan Ag	EIA	<i>Aspergillus</i> spp.	İnvaziv aspergilloz, kronik pulmoner aspergilloz (BAL örneğinde)	<i>A. fumigatus</i> kompleksi dışındaki türlerde performansı değişken. Farklı hasta popülasyonlarında tanıl yaranı değişken (Ör: Yenidoğan ve küçük çocuklarda yalancı pozitiflik sık). İnvaziv aspergilloz dışındaki klinik tablolarda duyarlılık düşük. Histoplazmoz, fusaryoz ve talaromikozda da pozitif.
<i>Aspergillus</i> Ag	LFD	<i>Aspergillus</i> spp.	İnvaziv aspergilloz	Hızlı tanı. Kronik pulmoner aspergillozda duyarlılık düşük.
<i>Aspergillus</i> IgG	EIA	<i>Aspergillus</i> spp.	İnvaziv aspergilloz, kronik pulmoner aspergilloz	Kit <i>A. fumigatus</i> 'a spesifik olabilir.
<i>Aspergillus</i> IgE	EIA	<i>Aspergillus</i>	Allerjik bronkopulmoner aspergilloz	Kit <i>A. fumigatus</i> spesifik olabilir.
<i>Aspergillus</i> PZR	PZR	<i>Aspergillus</i> spp.	İnvaziv aspergilloz, kronik pulmoner aspergilloz	Kit tüm <i>Aspergillus</i> cinsine, sadece <i>A. fumigatus</i> 'a veya sık rastlanan türlerden bazılarına ( <i>A. fumigatus</i> 'a ek olarak) spesifik olabilir.
<i>Cryptococcus</i> kapsül Ag	Lateks aglütinasyon, EIA, LFD	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Kriptokok menenji ve invaziv kriptokokoz	Diğer <i>Cryptococcus</i> türlerinde duyarlılık düşük. İnvaziv <i>Trichosporon</i> infeksiyonlarında yalancı pozitif.
<i>Pneumocystis</i> PZR	PZR	<i>Pneumocystis</i> spp.	<i>Pneumocystis</i> pnömonisi	Direkt mikroskopiye göre duyarlılık daha yüksek.

Ag: Antijen, Ab: Antikor, EIA: Enzyme Immune Assay, LFD: Lateral Flow Device, BAL: Bronkoalveolar lavaj, PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

negatiflikler görülebilmektedir. Türbidimetrik olarak LAL reaksiyonunu okuyan bazı testler, bu sorunları aşmayı hedeflemiştir. Lot bazında kalibre edildiği için tek örnek çalışabilen; hemolitik, lipemik ve ikterik örneklerden etkilenmeden sonuç verebilen ticari testler piyasada bulunmaktadır<sup>[17,33]</sup>. Pozitif sonuç için eşik değer yaygın kullanılan ticari kitler için 80 pg/mL olarak belirlenmiştir; ancak, farklı kitlerde değişiklik gösterebilmektedir<sup>[32,34]</sup>. Örneklerin antifungal tedavi öncesinde alınması ve optimum sonuç için tanı/tarama amacıyla kullanımda haftada iki kez, tedavi yanıtının monitörizasyonunda haftada bir kez test yapılması ve pozitif sonucun kesinleştirilmesi için aynı örnekte veya yeni bir örnekte test tekrarı önerilmektedir<sup>[32,35]</sup>.

Pnömosistoz dışındaki invaziv mikozların tanısı için 1,3-beta-D-glukan testinin sonuçlarını inceleyen bir meta-analizde duyarlılık %76.8 ve özgüllük %85.3 bulunmuştur<sup>[34]</sup>. Kandidemi, invaziv kandidoz ve kronik dissemine kandidoz tanısı için haftada iki kez serumda test edilmesi önerilmektedir<sup>[10,32]</sup>. Kandidemi tanısında çoğu çalışmada duyarlılık %65'in, özgüllük ise %80'in üzerinde bulunmuş, negatif prediktif değer >%85 olarak hesaplanmıştır<sup>[10]</sup>. *Aspergillus* infeksiyonlarında hasta popülasyonuna ve klinik tabloya göre testin yararı değişken olsa da tanı ve tarama amaçlı kullanılabilir. Galaktomannan ve/veya *Aspergillus* polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile kombine kullanımının özgül tanıya daha çok yardımcı olduğu belirtilmiştir<sup>[11]</sup>.

*Pneumocystis* pnömonisinde de yüksek 1,3-beta-D-glukan düzeyleri saptanabilmektedir<sup>[20]</sup>. Kolorimetrik ve türbidimetrik yöntemle sonuç veren iki testi karşılaştıran bir çalışmada sırasıyla duyarlılık %85 ve %78, özgüllük ise %87 ve %98 bulunmuştur<sup>[33]</sup>. Başka bir meta-analiz, *Pneumocystis* pnömonisi tanısı için 1,3-beta-D-glukan düzeyleri kullanan 23 çalışmayı değerlendirmiş, %91 duyarlılık ve %79 özgüllük bildirmiştir. Bu çalışma, HIV pozitif hasta popülasyonunda duyarlılığın daha yüksek olduğunu belirterek (HIV pozitif hastalarda %94 iken HIV negatiflerde %86) testlerin tanısal değerlerinin belirlenmesinde hasta popülasyonunun önemine dikkati çekmiştir<sup>[36]</sup>. Ülkemizden bir çalışma ise; pnömosistoz tanısında direkt floresan mikroskopi altın standart olarak alındığında 1,3-beta-D glukan testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %93.9 olarak bildirmiştir<sup>[37]</sup>.

Fusaryozda 1,3-beta-D glukan testi pozitif olabilmekte, tedavi takibinde de kullanılabilir. Brezilya'dan bir çalışma 2000-2018 arasında tespit edilen 17 fusaryoz olgusunu aynı dönemdeki nötropenik ateş olguları ile karşılaştırmıştır. Ardışık iki test ile yüksek duyarlılık (%85), özgüllük (%69) ve negatif prediktif değer (%99) bulunmuş ve klinik başlamadan önce testin pozitifleşebildiği gözlenmiştir. Ancak, düşük pozitif prediktif değer (%7) erken dönemde tanısal değeri kısıtladığı düşünülmüştür<sup>[38]</sup>.

Hücre duvarı beta-glukan içeren ama nadir olarak etken olan mantarlara bağlı infeksiyonlarda 1,3-beta-D-glukan testinin tanısal değeri için elimizde yeterli veri bulunmamaktadır.

### Galaktomannan

Galaktomannan antijeninin serumdaki titresinin belirlenmesinin ve ardışık örneklerde titrede artış saptanmasının invaziv aspergillozun erken tanısında kullanılabilmesine ilişkin veriler elde edilmiştir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonlarında (nötropeni, hematolojik malignite, kemik iliği veya solid organ transplantasyonu varlığı, kortikosteroid ve benzer bağışıklık sistemi baskılayıcı tedaviler gibi) invaziv aspergillozun prospektif taraması, tanısı ve tedavi takibinde önerilmektedir<sup>[11,16,31]</sup>. Farklı hasta gruplarında testin tanısal performansı değişebilmektedir. Örneğin nötropenik hastalardaki duyarlılığın nötropenik olmayanlara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir<sup>[11,16]</sup>.

İnvaziv aspergillozun hızlı tanısında serum, BAL, BOS ve akciğer dokusu örneklerinde galaktomannan antijeni saptanabilmektedir<sup>[11,16,31]</sup>. Yüksek risk grubundaki hastalarda, haftada en az iki kez serum örneğinin test edilmesi durumunda tanıya katkıda bulunduğu gösterilmiştir<sup>[11]</sup>. İnvaziv aspergilloz şüphesinin yüksek olduğu hastalarda, serum örneklerinde galaktomannan negatif bulunduğunda, BAL örneklerinin test edilmesi önerilmektedir<sup>[16]</sup>. Serum örneklerinde düşük olan duyarlılık, uygun eşik değerleri kullanıldığında BAL örneklerinde %100'e ulaşabilmektedir<sup>[39,40]</sup>. Antifungal profilaksi veya tedavi alan hastalarda serum ve BAL örneklerinden elde edilen galaktomannan düzeyleri için verinin sınırlı olması ve eşik değerlerinin kesinleşmemiş olması nedeniyle değerlendirmesinde dikkatli olunmalıdır<sup>[16]</sup>. Serebral aspergilloz tanısında BOS örneklerinde



galaktomannan tespiti önerilmektedir; ancak, valide edilmiş eşik değerleri bulunmamaktadır<sup>[11]</sup>. Galaktomannan, akciğer biyopsilerinde de test edilebilmekle birlikte, elde yeterli miktarda doku olması önemlidir<sup>[11]</sup>. Test edilecek örnek için kullanılan galaktomannan kitinin valide edilmiş olmasına dikkat edilmelidir. Antifungal tedavinin etkinliğinin anlaşılmasında galaktomannan düzeyinin takibi kanser hastalarında yararlı olabilmektedir. Bu hasta grubunda antifungal tedavinin ilk iki haftasında serum galaktomannan değerlerinde azalmanın tedavi başarısı ile uyumlu olduğu belirtilmiştir<sup>[11]</sup>. Ancak, test sonuçlarının güvenilirliğini etkileyen çeşitli değişkenler bulunmaktadır. Testin ilk versiyonlarında piperasilin/tazobaktam tedavisi altında saptanan yalancı pozitiflik sorunu son çalışmalarda bildirilmemekle birlikte; kan transfüzyonları, kan ürünü infüzyonları, mantar kökenli antibiyotiklerin kullanımı ve bazı gluklan içeren besinlerin tüketimi sonrası sorun devam etmektedir<sup>[11,16,41]</sup>. Ayrıca histoplazmoz, fusaryoz ve talaromikoz gibi diğer mantar infeksiyonlarında da pozitiflik gözlenebilmektedir<sup>[11,16]</sup>. Pediatrik hastalarda erişkine benzer olarak yüksek duyarlılık ve özgüllük bildirilmişse de, yenidoğan ve küçük bebeklerde yalancı pozitiflik daha sık görülmektedir. Bu durumdan barsak mikrobiyotasındaki bifidobakteriler sorumlu tutulmaktadır<sup>[31]</sup>. Ülkemizden bir çalışmada, hematolojik malignitesi olan 1-16 yaş arasındaki çocuk hastalarda invaziv aspergilloz tanısında farklı eşik değerler kullanılarak galaktomannan testinin yeri araştırılmıştır. Pozitif prediktif değer, en yüksek eşik değer (galaktomannan indeksi > 1.5) kullanıldığında bile tek örnek pozitif olan hastalarda %50 iken, iki ardışık örnekte pozitiflik saptandığında %100'e ulaşmıştır<sup>[42]</sup>.

Galaktomannan antijeni, invaziv aspergilloz dışında *Aspergillus*'un etken olduğu diğer klinik tabloların tanısında aynı performansı göstermemektedir. Örneğin, kronik pulmoner aspergilloz tanısında serum galaktomannan duyarlılığı düşük bulunduğundan BAL örneklerinin test edilmesi önerilmekte, buna karşın duyarlılık yine düşük kalabilmektedir<sup>[29,43]</sup>. *Aspergillus*'un etken olduğu fungal sinüzitte ise, patolojik olarak kesin tanı almış hastalarda serum galaktomannan testinin özgüllüğünün yüksek ama duyarlılığın oldukça düşük olduğu bildirilmiştir<sup>[44]</sup>.

### ***Aspergillus* Spesifik Antijen ve Antikor Testleri**

*Aspergillus* antijeni "lateral flow device" (LFD) ile BAL ve serum örneklerinde tespit edilebilmektedir<sup>[11]</sup>. Otuz dakika gibi kısa bir sürede sonuç vermesi invaziv aspergilloz tanısında avantaj sağlamaktadır. Ancak, duyarlılığı invaziv aspergillozda bile, hasta başında uygulanabilmesi için serum veya BAL örnekleri ön işleme alınmadan test edildiğinde azalmaktadır<sup>[45]</sup>. Ayrıca, galaktomannan antijenine benzer şekilde, farklı klinik tablolarda performansı değişmektedir. Kronik aspergillozda BAL örneklerinde yaklaşık %10 gibi çok düşük duyarlılık oranları bildirilmiştir<sup>[43]</sup>. Yüksek özgüllük değerleri, negatif prediktif olarak kullanılmasına olanak vermektedir.

*Aspergillus* spesifik antikorları, presipitan antikorlar ve aglutine edici antikorlar invaziv aspergilloz ile kronik aspergilloz tablolarının tanı/ayrımında kullanılabilir. Bunun için farklı yöntemlerle çalışan ticari sistemler bulunmaktadır<sup>[11]</sup>. Tanı için daha çok IgG tipi antikorlar anlamlı bulunmuştur. IgM ve IgA tipi antikorların tanısız değeri sınırlıdır. *Aspergillus* IgE tespiti, alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA) tanı kriterleri arasında yer almaktadır<sup>[29]</sup>.

### **Mannan ve Antimannan**

*Candida* antijenlerinin hastalık tanısında kullanımında; kandaki düzeyin düşük olması, kandan hızla temizlenmeleri, oluşan antijen-antikor komplekslerinin değerlendirmeyi güçleştirilmesi ve mikrobiyotada *Candida* türlerinin yaygın olarak bulunmalarının yalancı pozitifliklere neden olabilmesi sorun yaratmaktadır<sup>[15,46]</sup>. Tanıda, mantar hücre duvarı yapısında bulunan 1,3-beta-D gluklan ve mannan antijenleri en başarılı hedefler olarak öne çıkmışlardır<sup>[15,17]</sup>. Mannan antijeni, lateks aglutinasyon veya enzim "immunoassay" (EIA) ile tespit edilebilmektedir<sup>[15]</sup>. Lateks aglutinasyon testinin kantitatif olmaması ve duyarlılığının özgül antikorların varlığından etkilenmesi ek bir dezavantaj getirmektedir<sup>[47]</sup>.

*Candida* antijenlerine karşı gelişen antikorların tanıda kullanımı da antikor oluşumunun zaman gerektirmesi, yüksek riski olan immünkompromize hasta grubunda baskılanmış olması ve geçirilmiş infeksiyonu veya kolonizasyonu ayırt edememesi

nedeniyle sınırlanmaktadır<sup>[15,17]</sup>. Genellikle, mannan antijenine karşı gelişen IgG tipi antikörlerin araştırılması daha başarılı sonuçlar vermiştir<sup>[17,46]</sup>. Ancak; invaziv kandidozu olan hastalar, *Candida* kolonizasyonu saptanan kişiler ve kontrol grubu kullanılarak invaziv kandidoz tanısında antimannan antikörlerinin tanısal değerini araştırılan bir çalışmada duyarlılık ve özgüllük IgG için daha düşük (sırasıyla %68-75 ve %91-94), IgM içinse yüksek (sırasıyla %78-80 ve %97-98) bulunmuştur. IgG ve IgM sonuçlarının kombine değerlendirilmesiyle duyarlılığın arttığı belirtilmiştir<sup>[48]</sup>. Ayrıca, farklı *Candida* türlerinde antikor yanıtı değişebilmektedir. Bir çalışma, kandidemilerde etkenin *C. krusei* olduğu durumlarda, *C. tropicalis*'e göre anlamlı olarak daha yüksek antimannan IgG değerleri saptamıştır<sup>[46]</sup>. Bu çalışmalar, antimannan antikor testlerinin daha ayrıntılı incelenmesinin gerekliliğine işaret etmektedir.

Tek başına kullanıldıklarında yeterli duyarlılık ve özgüllük düzeylerine ulaşamayan mannan ile antimannan antikoru, eşzamanlı test edildiklerinde invaziv kandidoz tanısında yararlı olabilmektedirler<sup>[10,17,46,49]</sup>. Kandidemide ve kandidemi olmadan derin yerleşimli kandidozlarda tanısal testlerin performansı değişkenlik göstermektedir<sup>[10]</sup>. Mannan ve antimannan testleri için FDA onayı bulunmadığından ABD'de kandidoz tanısında kullanımı sınırlıdır<sup>[17]</sup>. Avrupa'da ise, ESCMID *Candida* infeksiyonları için tanı kılavuzunda eşzamanlı mannan ve antimannan tespitinin kandidemi ve kronik dissemine kandidoz tanısında öneriler arasında bulunması nedeniyle daha yaygındır. Ardeşik testlerin tanıda başarıyı artırabileceği de belirtilmiştir. Ancak, invaziv kandidoz tanısında öneriler arasında bulunmamaktadır. Kandidemi içinduyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla yaklaşık %80 ve %85 olduğu bildirilmiştir. Kan kültüründeki üremeden ortalama altı gün önce pozitiflik saptanabilmesi önemli bir avantaj olarak öne çıkmaktadır<sup>[10]</sup>. Mannan/antimannan kombinasyonunun *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* infeksiyonlarının tanısında daha başarılı olduğu bildirilmiştir<sup>[17]</sup>.

Mannan ve antimannan tespiti için EIA tercih edilen çalışmalarda daha çok Platelia Ag ve Ab (BioRad, Fransa) veya bu kitlerin bir sonraki versiyonu olan Platelia Ag ve Ab Plus (BioRad, Fransa) kitleri kullanılmıştır. Mannan ve

antimannan testlerinin etkinliği daha çok eski nesil testlerle belirlenmiştir<sup>[10]</sup>. Kitlerin eski ve yeni versiyonlarını az sayıda hasta örneği ile karşılaştıran ilk çalışma antijen testinde özgüllüğün yeni versiyonda %50 azaldığını bildirmiş ve bu durumun yüzeysel *Candida* infeksiyonlarından kaynaklanabileceği yorumunu yapmıştır<sup>[50]</sup>. Ancak, yüzeysel kandidozlu hastaların dahil olduğu bir çalışmada Platelia Ag Plus kiti ile yalancı pozitiflik görülmemiştir<sup>[49]</sup>. Ayrıca, daha yakın zamanlı bir çalışmada yeni versiyon ile elde edilen sonuçların daha duyarlı (%65'e %85), özgüllükteki düşüşün de sınırlı (%98'e %89) olduğu bildirilmiştir<sup>[51]</sup>. Mannan/antimannan testlerinin diğer biyobelirteçlerle birlikte izlemi, antifungal tedavi alan hastalarda mortaliteyi artırmadan tedavinin daha erken kesilmesine olanak tanıyabilmektedir. Ancak, bu yaklaşımın ayrıntıları netleşmemiş ve henüz kılavuzlara öneri olarak girmemiştir<sup>[35]</sup>.

*Candida* fosfopeptidomannanına karşı gelişen IgG2 tipi antikörlerin tespitinin invaziv kandidoz ile kolonizasyon ayırımında yararlı olabileceği iddia edilmişse de, diğer Ig alt sınıfları ile bir karşılaştırma yapılmamıştır<sup>[15]</sup>.

### ***Candida* İçin Özgül Serolojik Testler**

*C. albicans* germ tüp antikoru testi, invaziv kandidoz tanısı için geliştirilmeye çalışılmış; ancak, yoğun kolonizasyon gözlenebilen yoğun bakım hastalarında özgüllüğün azaldığı belirtilmiştir<sup>[16]</sup>. Özgüllük ve duyarlılık, farklı çalışmalarda büyük değişkenlik göstermektedir. *C. albicans* dışındaki türlerle gelişen infeksiyonlar tespit edilebilse de, etken olan *Candida* türü de test sonucunu etkilemektedir. Derin yerleşimli *Candida* infeksiyonu saptanmayan kandidemilerde de duyarlılığın düşük olduğu öne sürülmüştür<sup>[17]</sup>. Mannan veya 1,3-beta-D-glukan testleri ile kombine kullanımları tanıda başarılarını artırabilmektedir<sup>[15]</sup>.

*Candida*'ya özgü protein antijenleri tespit etmeye yönelik lateks aglütinasyon veya EIA yöntemleri de bulunmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri düşük bulunmuş ve tanıda rutin olarak kullanımları önerilmemiştir<sup>[15,47,49]</sup>.

### ***Cryptococcus* Kapsül Antijeninin Saptanması**

En yaygın kullanılan antijen saptama testlerinden biri kriptokok infeksiyonu tanısında uygulanan

antijen testidir. Kriptokok kapsül antijeni, serumda ve BOS'ta lateks aglütinasyon, enzim immünoasay ve "lateral flow" yöntemiyle saptanabilmektedir. Duyarlılığının direkt mikroskopiden yüksek olması tercih sebebidir<sup>[7,52]</sup>. Sistemik *Trichosporon* infeksiyonlarında yanlış pozitiflik gözlenebilmekteyse de, nadir rastlanan bir durum olması nedeniyle genellikle sorun yaşanmamaktadır<sup>[7,53,54]</sup>. *Cryptococcus* kapsül antijeni tespiti için geliştirilen yöntemler öncelikle *Cryptococcus neoformans/gattii*'yi hedefleyerek geliştirildiğinden diğer türlerde duyarlılık düşüktür<sup>[53]</sup>. Kriptokok menenjitisi olan hastalarda serum veya BOS'ta kapsül antijeni titresinde azalma tedavi başarısına işaret etmekle birlikte, azalmanın bir haftadan fazla gecikebildiği akılda tutulmalıdır<sup>[18]</sup>. Bağışıklığın düzelmediği durumlarda ömür boyu sürebilen antijen pozitifliği ve tedavi gereksinimi olabilmektedir. Antijen pozitifliği, klinik düzelden ve hastanın iyileşmesinden sonra da gözlenebilmektedir. Ayrıca; HIV pozitif hastalarda klinik hastalık gelişmeden haftalar önce antijen pozitifliği saptanabilmekte, bu hastalarda preemtif flukonazol tedavisi kriptokok menenjitisi gelişimini engelleyebilmektedir<sup>[52]</sup>.

#### **Endemik Mikoz Etkeni Mantarlar İçin Antijen ve Antikor Saptama Testleri**

Histoplazmoz tanısında serum, idrar veya BAL'da özgül antijen ve/veya antikor saptanması, altın standart olmasına karşın zaman alıcı olan kültür yöntemine tercih edilebilmektedir. Antijen testinin, disemine ve diffüz akut pulmoner histoplazmoz tanısında özel bir yeri vardır. Daha düşük antijen miktarlarını saptayabilen kantitatif testlerin geliştirilmesi özgülüğü artırmıştır. Diğer endemik mikozlarla çapraz reaksiyon görülebilmeye karşın duyarlılık %81, özgülük ise %98'lere ulaşabilmektedir. *Histoplasma* antijen ile antikorunun eşzamanlı test edilmesi duyarlılığı artırabilmektedir. İdrar ve serum örneklerinin birlikte çalışılmasının yararlı olabileceğine dair sınırlı veri bulunmaktadır. Antikor testlerinin duyarlılığının immün sistemi baskılanmış hastalarda düşük olduğu da akılda tutulmalıdır<sup>[16]</sup>.

Blastomikoz ve koksidiyoidomikoz gibi diğer endemik mikozlarda da antijen ve antikor saptama testleri tanıda yararlı olabilmektedir. Histoplazmoz olgularındakine benzer şekilde, antikor saptama

testleri immünkompetan hastalarda daha başarılı bulunmuştur<sup>[16]</sup>.

#### **Nükleik Asit Temelli Tanı Testleri**

Etkene özgü nükleik asit amplifikasyonu için PZR kullanan testlerin yanı sıra, nükleik asit problemleri kullanan hibridizasyon testleri de infeksiyon hastalıklarının tanısında başarı ile kullanılmaktadır. En önemli avantajları, testin doğası gereği örnekte az miktarda nükleik asit bulunduğu bile özgül olarak tespit etme potansiyelleridir. Ancak mantarlara özgü bazı sorunlar nedeniyle henüz rutin laboratuvarında tanı için önerilen testler sınırlıdır. Mantar hücrelerindeki sağlam ve polisakkaritten zengin hücre duvarı, klinik örneklerde konak materyaline göre az miktarda bulunan etken mantarın DNA'sının yeterli miktarda ve uygun saflıkta elde edilmesini güçleştirmektedir. Hedeflenen gen bölgesi de belirli türlere/cinslere özgü veya "pan-fungal" olabilmektedir. Hastalık etkeni mantarların çoğunun hastanın mikrobiyotasında bulunabilmesi nedeniyle, test sonucunun hastalık lehine yorumlanabilmesi için eşik değerleri belirlenmiş kantitatif test sonuçları gerekli olabilmektedir. Ayrıca, mantarların doğada yaygın olarak bulunmaları, örneğin kontaminasyondan korunması için ek önlemlerin alınmasını zorunlu kılmaktadır<sup>[6,7,15]</sup>. Tüm bu sorunlara karşın, tanıda yarar sağlayan ve kullanımı önerilen nükleik asit temelli testler bulunmakta ve test geliştirme çabaları devam etmektedir.

#### ***Aspergillus* PZR**

*Aspergillus* PZR testinin invaziv aspergillozda galaktomannan ile birlikte kullanımı daha erken ve daha kesin tanıya yardımcı olabilmektedir<sup>[11]</sup>. Uzun süreli nötropeni olan hematolojik malignite hastaları, küf profilaksisi almayan allojenik kemik iliği nakli hastaları ve riskli yoğun bakım hastaları gibi bazı gruplarda BAL, tam kan ve serumda çalışılması önerilmektedir. Merkezi sinir sistemi tutulumu veya menenjit şüphesi varsa BOS örneklerinde çalışılabilir<sup>[11]</sup>. Ülkemizden bir çalışma, nötropenik olmayan yoğun bakım hastalarında invaziv aspergilloz tanısında BAL örneklerinde *Aspergillus* PZR'in duyarlılığını düşük (%40.0), özgülüğünü yüksek (%93.9) bulmuştur<sup>[39]</sup>. Başka bir çalışma ise nötropenik hastalarda invaziv aspergilloz tanısı için serum örneklerinde duyarlılığı %30 olarak bildirmiştir<sup>[40]</sup>. Ayrıca, DNA ekstraksi-

yonunun daha yüksek hacimde (>500 µL) serum örneği kullanılarak yapılmasının test performansını artırabileceği belirtilmiştir<sup>[55]</sup>.

Kronik pulmoner aspergillozda duyarlılığın kültürden daha iyi olduğu bildirilmiştir<sup>[29]</sup>. Ayrıca, doku örneklerinde (taze doku veya parafine gömülü doku) uygulanabilmektedir. Mikroskopi ile hafif görülen örneklerde duyarlılık daha yüksektir<sup>[11]</sup>. Pediatrik hastalardaki çalışmalar sınırlıdır ve henüz kullanımına yönelik öneri geliştirilememiştir<sup>[31]</sup>. Bu amaçla geliştirilen ticari kitler, ağırlıklı olarak en sık rastlanan patojen tür olan *Aspergillus fumigatus* kompleksini hedeflemektedir ve diğer türleri tespit etmekteki başarıları değişkendir<sup>[56]</sup>. Bazı kitlerde, *Aspergillus* cinsinde artmaya başlayan azol direncini tespit etmeye yönelik mutasyon taramaları da yapılabilmektedir<sup>[57]</sup>.

### **Candida PZR**

Kandidemi tanısında kan kültürü duyarlılığının düşük olması nedeniyle, *Candida* türlerinin kan örneklerinden tespiti ve/veya tanımlanması için çok sayıda “in-house” ve ticari kit bulunmaktadır<sup>[10,17]</sup>. Bunlardan bazıları, sık rastlanan bakteriyemi etkenlerini de içerebilen çoklu PZR testleridir. Çoğu test, klinik örneklerde sık rastlanan *Candida* türleri ile sınırlıdır<sup>[17]</sup>. Bu testlerin özgüllükleri, özellikle yoğun *Candida* kolonizasyonu gözlenen yoğun bakım hastalarında olumsuz etkilenebilmektedir<sup>[16]</sup>. Kan kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılık değerlerinin yüksek olması ve daha kısa zamanda sonuç vermeleri nedeniyle umut verici olduklarını bildiren çalışmalar bulunmaktadır<sup>[58]</sup>. Ancak, testlerin yöntemsel olarak büyük değişkenlik gösterdiği ve çoğunun sık gözlenen bazı *Candida* türleri (*C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) ile sınırlı olduğu hatırlanmalıdır<sup>[17]</sup>.

*Candida* invaziv infeksiyonlarının tanısında PZR ve manyetik rezonans testlerini birleştiren “T2 *Candida* Magnetic Resonance Assay” kullanılabilmektedir<sup>[7,15,17]</sup>. Bu test, tam kan örneğinden sık görülen beş *Candida* türünü (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) 5 saat içinde saptayarak tür bazında raporlayabilmekte; ancak, kendine özgü bir cihaz (T2DX) gerektirmektedir ve<sup>[17]</sup> bu testin FDA onayı bulunmaktadır.

### **Pneumocystis PZR**

*Pneumocystis* rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kültürde üretilmeyen bir patojen olduğundan tanısında direkt immünfloresan boyama ile mikroskopi tercih edilmektedir. Bu amaçla gönderilen solunum yolu örneklerinin gerektiğinde n-asetil sistein veya sputolizin ile homojenize edilmesi önerilmektedir<sup>[18]</sup>. Ancak, mikroskopinin düşük duyarlılığı farklı arayışlara neden olmuştur. Son yıllarda *Pneumocystis* için özgül PZR yöntemleri ile %90 civarında duyarlılık ve özgüllük bildirilmesi umut verici olmuştur<sup>[14,20,37]</sup>.

### **Diğer Patojenlere Yönelik PZR Testleri**

Farklı hastalık etkeni mantarlara özgül PZR testleri de geliştirilmiş ve yararlı olabildikleri bildirilmiştir. Hızlı tanının hastanın sağ kalımı için kritik olduğu *Mucorales* takımına ait küf mantarlarının etken olduğu infeksiyonlarda tanı, mikroskopi, kültür ve görüntüleme tekniklerine dayanmaktadır. *Mucorales* takımına özgül veya içindeki cinsleri hedef alan PZR yöntemleri, erken ve kesin tanıya olanak sağlayabilmektedir<sup>[59,60]</sup>. Nadir görülen ama yüksek mortaliteye neden olan invaziv *Fusarium* infeksiyonlarının tanısında farklı PZR yöntemleri ile değişken özgüllük ve duyarlılık oranları bildirilmiştir<sup>[8]</sup>. Endemik mikozlara yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. *Blastomyces* için PZR kullanan merkezler bulunmaktadır<sup>[16]</sup>. Dermatofitoz tanısında da, doğrudan klinik örnekten çalışılan PZR testleri tanıda zaman kazandırabilmekte ama çoğu merkezde maliyet nedeniyle uygulanmamaktadır<sup>[13]</sup>. Bu amaçla belirli bir tür dermatofiti, tüm dermatofitleri veya tüm mantarları hedefleyen primerler kullanılabilmektedir. Daha genel primerler kullanıldığında dizi analizi ile cins/tür düzeyinde tanımlama yapılabilmektedir. Bu durum, özellikle nadir görülen etkenlerle gelişen onikomikozlar gibi durumlarda avantaj sağlamaktadır.

### **Çoklu ve “Panfungal” PZR Yöntemleri**

İnvaziv mikozların büyük çoğunluğunda kısıtlı sayıda tür etken olsa da, nadir görülen patojenler gittikçe daha çok karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, etkene özgü PZR yöntemlerinin kısıtlılığını aşmak için, çoklu (“multiplex”) ve “panfungal” teknikler geliştirilmektedir. Bu sayede invaziv mikoz tanısının konması/dışlanması, kültürde üretilmeyen etkenlerin cins ve tür düzeyinde tanımlan-



ması hatta bazı durumlarda antifungal duyarlılıkla ilgili bilgi elde edilebilmesi amaçlanmaktadır. Çoklu PZR yöntemlerinde birden fazla patojene yönelik özgül primerler kullanılmakta, etkenler amplikon uzunluğu veya erime eğrisi analizi ile ayrılabilir. “Panfungal” testlerde, tüm mantar kaynaklı nükleik asitleri amplifiye etmeye yönelik primerler kullanılmaktadır. Amplikon elde edildiğinde saflaştırılarak dizi analizi yapılabilen ve etken tanımlanmaktadır. Bu sayede nadir rastlanan patojenlerin cins/tür düzeyinde tanımlanabildiği de gözlenmiştir<sup>[13,61,62]</sup>. Gerçek zamanlı PZR yönteminde “panfungal” primerlere etkene özgü tasarlanmış problemler eklenmesi de mümkündür. Bu sayede, problemler sık rastlanan patojenlerin erime eğrisi analizi ile tanımlanmasına olanak sağlanmakta, diğer patojenler amplikon dizisinin analizi ile tanımlanabilmektedir<sup>[63]</sup>. Klinik örneklerden mantar DNA’sının ekstraksiyonundaki güçlükler nedeniyle genellikle duyarlılık düşük, ancak özgüllük yüksek olarak bildirilmiştir<sup>[61-63]</sup>.

### Diğer Yöntemler

Mantar infeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere geliştirilmeye çalışılan farklı yöntem temelli testler de bulunmaktadır. Bunlar arasında “in situ hibridizasyon”, “microarray” ve proteom temelli testler sayılabilir<sup>[7,15]</sup>. Geniş spektrumlu PZR reaksiyonu ürünlerini iyonizasyon-kütle spektrometrisi ile birleştiren bir yöntem tanımlanmıştır<sup>[15,64]</sup>. Serolojik proteom analizi, rekombinant cDNA ekspresyon kütüphaneleri ve antijenik protein “microarray” gibi deneysel aşamadaki yöntemler ile mantar infeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek biyobelirteç arayışı sürmektedir<sup>[15]</sup>.

Bu testlerin tanıya katkısını değerlendirirken, ilgili merkezdeki invaziv mikoz prevalansını ve çeşitliliğinin göz önüne alınması gerekmektedir. Ayrıca, her mantar cinsi veya türünün kapsamayabileceği akılda tutulmalıdır. Bu testlerin rutin laboratuvarında kullanımına yönelik elde yeterli veri bulunmamaktadır<sup>[10,11,15]</sup>.

### SONUÇ

Mantar infeksiyonlarının tanısı için geliştirilen testler, halen mükemmel tanı sağlamaktan uzaktır. Çoğu hastalık etkeni mantarın konakta ve çevrede sıklıkla bulunması nedeniyle kolonizasyon/infeksiyon hatta kontaminasyon ayrımı güçleşmek-

tedir. Özellikle invaziv mantar infeksiyonları için risk taşıyan farklı hasta popülasyonlarında konağa özgü durumlar testlerin performansını etkileyebilmektedir<sup>[6]</sup>. Geliştirilen yeni yöntemler ile daha erken dönemde kesin tanı konabilmesi için ilerleme sağlanmış olsa da, özellikle nadir rastlanan etkenlerde yöntemlerin etkinliği henüz tam olarak ortaya koyulamamıştır. Konvansiyonel testler her durumda önerilmekte, eş zamanlı olarak birden fazla non-konvansiyonel testin kullanımı tanı şansını artırmaktadır. Her durumda, test sonuçlarının yorumlanmasında konağın klinik durumunun değerlendirilmesi önemini korumaktadır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

### KAYNAKLAR

1. Kohler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;5:a019273.
2. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 4):S-24.
3. Cole DC, Govender NP, Chakrabarti A, Sacaral J, Denning DW. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e412-e9.
4. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel)* 2017;3.
5. Hilmioglu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, et al. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses* 2019;62:22-31.
6. Wickes BL, Romanelli AM. Diagnostic mycology: Xtreme challenges. *J Clin Microbiol* 2020;58.
7. Walsh TH, Hayden TH, Larone DH. *Larone’s Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 6<sup>th</sup> ed. Washington DC: ASM Press, 2018.
8. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl 3):27-46.
9. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21<sup>st</sup> century. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:247-80.
10. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(Suppl 7):9-18.



11. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(Suppl 1):e1-e38.
12. Karcioğlu O, Dogan R, Uzun O, Tokat F, Gulmez D, Arikan-Akdagli S, et al. A rare presentation of pulmonary aspergillosis: Bronchial stump aspergillosis. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2020;27:e28-e33.
13. Petrucelli MF, Abreu MH, Cantelli BAM, Segura GG, Nishimura FG, Bitencourt TA, et al. Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. *J Fungi (Basel)* 2020;6.
14. Moodley B, Tempia S, Frean, JA. Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of *Pneumocystis jirovecii*. *PLoS One* 2017;12:e0180589.
15. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Diagnosis of invasive candidiasis: From gold standard methods to promising leading-edge technologies. *Curr Top Med Chem* 2018;18:1375-92.
16. Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, Haydour Q, et al. Microbiological Laboratory Testing in the Diagnosis of Fungal Infections in Pulmonary and Critical Care Practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:535-50.
17. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2018;56.
18. Hazen K, Howell SA. Mycology and Antifungal Susceptibility Testing, in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. In: Leber AL (ed). ASM Press: Washington DC, 2016.
19. Vergidis P, Moore CB, Novak-Frazer L, Rautemaa-Richardson R, Walker A, Denning DW, et al. High-volume culture and quantitative real-time PCR for the detection of *Aspergillus* in sputum. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:935-40.
20. Song Y, Ren Y, Wang X, Li R. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Med Mycol J* 2016;57:E111-E116.
21. Gulmez D, Alp S, Gursoy G, Ayaz CM, Dogan O, Arikan-Akdagli S, et al. Mixed fungaemia: an 18-year report from a tertiary-care university hospital and a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:833-841.
22. Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and Bact/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection. *J Clin Microbiol* 2004;42:115-8.
23. Arendrup MC, Bergmann OJ, Larsson L, Nielsen HV, Jarlov JO, Christensson B. Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:855-62.
24. Gokbolat E, Oz Y, Metintas S. Evaluation of three different bottles in BACTEC 9240 automated blood culture system and direct identification of *Candida* species to shorten the turnaround time of blood culture. *J Med Microbiol* 2017;66:470-6.
25. Uyan A, Taşbakan M, Metin DY, Pullukçu H, Durusoy R, Hilmioglu-Polat S. Kandidüriili hastalara yaklaşımda koloni sayısının önemi var mı? *FLORA* 2016;21:105-10.
26. Doğan O, Gülmez D, Arikan Akdağlı S. Fungemi olgularında hızlı bir ön tanımlama testi: Pozitif kan kültürü şişesinden yapılan doğrudan germ tüp testinin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2016;30:102-8.
27. Dogan O, Inkaya AC, Gulmez D, Uzun O, Akova M, Arikan Akdagli S. [Evaluation of PNA-FISH method for direct identification of *Candida* species in blood culture samples and its potential impact on guidance of antifungal therapy]. *Mikrobiyol Bul* 2016;50:580-9.
28. Bal AM, McGill M. Rapid species identification of *Candida* directly from blood culture broths by Sepsityper-MALDI-TOF mass spectrometry: impact on antifungal therapy. *J R Coll Physicians Edinb* 2018;48:114-9.
29. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J* 2016;47:45-68.
30. Boch T, Spiess B, Cornely OA, Vehreschild JJ, Rath PM, Steinmann J, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3-beta-D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:862-8.
31. Warris A, Lehrnbecher T, Roilides E, Castagnola E, Bruggemann RJM, Groll AH. ESCMID-ECMM guideline: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:1096-13.
32. Wright WF, Overman SB, Ribes JA. (1-3)-β-D-glucan assay: A review of its laboratory and clinical application. *Lab Medicine* 2011;42:679-85.
33. Mercier T, Guldentops E, Patteet S, Beuselink K, Lagrou K, Maertens J. Beta-d-glucan for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*: a direct comparison between the Wako beta-glucan assay and the Fungitell assay. *J Clin Microbiol* 2019;57.
34. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750-70.
35. Bouza E, Almirante B, Garcia Rodriguez J, Garnacho-Montero J, Salavert M, Munoz P, et al. Biomarkers of fungal infection: Expert opinion on the current situation. *Rev Esp Quimioter* 2020;33:1-10.
36. Del Corpo O, Butler-Laporte G, Sheppard DC, Cheng MP, McDonald EG, Lee TC. Diagnostic accuracy of serum (1-3)-beta-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26(9):1137-43.
37. Tekinşen FF, Koç AN. Klinik örneklerde çeşitli yöntemlerle *Pneumocystis jirovecii* araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013;47:658-67.

38. Nucci M, Barreiros G, Reis H, Paixao M, Akiti T, Nouer SA. Performance of 1,3-beta-D-glucan in the diagnosis and monitoring of invasive fusariosis. *Mycoses* 2019;62:570-5.
39. Özger S, Hızal K, Kalkancı A, Aydoğdu M, Cıvıl F, Dizbay M, et al. Nötropenik olmayan yoğun bakım hastalarında invazif pulmoner aspergilloz için risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve bronkoalveoler lavaj örneklerinde galaktomannan ve PCR testlerinin tanılma değerinin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2015;49:565-75.
40. Sav H, Koç N, Atalay MA, Yıldız O, Demir G. Sistemik aspergilloz tanısında çeşitli yöntemlerin araştırılması. *FLORA* 2014;19:66-73.
41. Walter W, Bornhauser M, Stolz F, Knoth H. False-positive *Candida* and *Aspergillus* antigen testing in recipients of allogeneic haematopoietic cell transplantation due to administration of parenteral nutrition and fixed combinations of piperacillin-tazobactam. *Mycoses* 2019;62:576-83.
42. Çağlar I, Özkerim D, Tahta N, Düzgöl M, Bayram N, Demirağ B, et al. Assessment of serum galactomannan test results of pediatric patients with hematologic malignancies according to consecutive positivity and threshold level in terms of invasive aspergilloz diagnosis: Cross-sectional research in a tertiary care hospital. *J Pediatr Hematol Oncol* 2020;42:e271-e6.
43. Salzer HJF, Prattes J, Flick H, Reimann M, Heyckendorf J, Kalsdorf B, et al. Evaluation of galactomannan testing, the *Aspergillus*-specific lateral-flow device test and levels of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of chronic pulmonary aspergilloz. *Front Microbiol* 2018;9:2223.
44. Melancon CC, Lindsey J, Russell GB, Clinger JD. The role of galactomannan *Aspergillus* antigen in diagnosing acute invasive fungal sinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2019;9:60-6.
45. Metan G, Keklik M, Dinc G, Pala C, Yildirim A, Saraymen B, et al. Performance of galactomannan antigen, beta-d-glucan, and *Aspergillus*-lateral-flow device for the diagnosis of invasive aspergilloz. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2017;33:87-92.
46. Wang K, Luo Y, Zhang W, Xie S, Yan P, Liu Y, et al. Diagnostic value of *Candida* mannan antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for *Candida* infection. *Mycoses* 2020;63:181-8.
47. Herent P, Styne D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:2158-64.
48. Meng Y, Kang M, Li D, Wang T, Kuang Z, Ma Y. Performance of a new *Candida* anti-mannan IgM and IgG assays in the diagnosis of candidemia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2020;62:e25.
49. Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Hacker G. Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and *Cand-Tec* *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 2013;51:1158-64.
50. Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee HA, Blijlevens NM, Verweij PE. Performance of the new Platelia *Candida* Plus assays for the diagnosis of invasive *Candida* infection in patients undergoing myeloablative therapy. *Med Mycol* 2011;49:848-55.
51. Hartl B, Zeller I, Manhart A, Selitsch B, Lass-Flörl C, Willinger B. A retrospective assessment of four antigen assays for the detection of invasive candidiasis among high-risk hospitalized patients. *Mycopathologia* 2018;183:513-9.
52. Chamard TB, Temfack E, Lortholary O, Alanio A. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113:e180050.
53. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014;20 (Suppl 3):76-98.
54. Alp S, Gulmez D, Ayaz CM, Arikani-Akdagli S, Akova M. Fungaemia due to rare yeasts in a tertiary care university centre within 18 years. *Mycoses* 2020;63:488-93.
55. Oz Y, Aslan M, Aksit F, Metintas S, Gunduz E. The effect of clinical characteristics on the performance of galactomannan and PCR for the diagnosis of invasive aspergilloz in febrile neutropenic patients. *Mycoses* 2016;59:86-92.
56. Morton CO, White PL, Barnes RA, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Lagrou K, et al. Determining the analytical specificity of PCR-based assays for the diagnosis of IA: What is *Aspergillus*? *Med Mycol* 2017;55:402-13.
57. Dannaoui E, Gabriel F, Gaboyard M, Lagardere G, Audebert L, Quesne G, et al. Molecular diagnosis of invasive aspergilloz and detection of azole resistance by a newly commercialized PCR kit. *J Clin Microbiol* 2017;55:3210-8.
58. Fuchs S, Lass-Flörl C, Posch W. Diagnostic performance of a novel multiplex PCR assay for candidemia among ICU patients. *J Fungi (Basel)* 2019;5(3):86.
59. Baldin C, Soliman SSM, Jeon HH, Alkhazraji S, Gebremariam T, Gu Y, et al. PCR-based approach targeting *Mucorales*-specific gene family for diagnosis of mucormycosis. *J Clin Microbiol* 2018;56(10):e00746-18.
60. Springer J, Lackner M, Ensinger C, Risslegger B, Morton CO, Nachbaur D, et al. Clinical evaluation of a *Mucorales*-specific real-time PCR assay in tissue and serum samples. *J Med Microbiol* 2016;65:1414-21.
61. Ala-Houhala M, Koukila-Kahkola P, Antikainen J, Valve J, Kirveskari J, Anttila VJ. Clinical use of fungal PCR from deep tissue samples in the diagnosis of invasive fungal diseases: a retrospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:301-5.
62. Wehrle-Wieland E, Affolter K, Goldenberger D, Tschudin Sutter S, Halter J, Passweg J, et al. Diagnosis of invasive mold diseases in patients with hematological malignancies using *Aspergillus*, *Mucorales*, and panfungal PCR in BAL. *Transpl Infect Dis* 2018;20:e12953.

63. Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza O, Buitrago MJ. New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2016;54:2910-8.
64. Massire C, Buelow DR, Zhang SX, Lovari R, Matthews HE, Toleno DM, et al. PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2013;51:959-66.?

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence**

Doç. Dr. Dolunay GÜLMEZ  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
Ankara-Türkiye  
E-posta: dolunayglm@gmail.com