T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

SİSTEMİK KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN *ASPERGİLLUS* TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

DR. EMİNE KORKMAZ

UZMANLIK TEZİ

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

SİSTEMİK KLİNİK ÖRNEKLERDEN ÜRETİLEN *ASPERGİLLUS* TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. EMİNE KORKMAZ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. M. CEM ERGON

İZMİR-2021

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2019.KB.SAG.064 sayı ile desteklenmiştir.)

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü desteği sunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nuran Esen'e, eğitim hayatıma ve tez çalışma sürecime bilgisi ve tecrübesi ile yön veren, anlayışı, hoşgörüsü ve iş ahlakıyla her zaman kendime örnek alacağım değerli hocam Doç.Dr. Cem Ergon'a ve yetişmemde emeği geçen değerli tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sundukları sonsuz sevgi, anlayış ve destekle hayatımızı güzelleştiren annelerime, hoşgörüsü ve anlayışı ile hep yanımda olan babama, desteğini her zaman arkamda hissettiğim sevgili yol arkadaşıma ve ışıl ışıl parlayan gözleriyle yolumuzu aydınlatan oğlum Nihat Enes'e, destekleri ve her zaman hatırlayacağım dostlukları için tüm çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamı gerçekleştirirken laboratuvarda güler yüzü ve yardımlarıyla hatırlayacağım laboratuvar teknisyeni Rahime ablama ve tüm diğer teknisyen arkadaşlarıma da teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ ..... **VII**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **VIII**

KISALTMALAR ..... **IX**

ÖZET **1**

GİRİŞ VE AMAÇ **5**

1. GENEL BİLGİLER **6**

1.1. *Aspergillus* Cinsi Mantarların Genel Özellikleri 7

1.2. *Aspergillus* Cinsi Mantarların Morfolojik Özellikleri 8

1.2.2. Koloni görünümü 8

1.3. ***Aspergillus*** **Türlerinin Tanımlanan Virülans Faktörleri** 11

1.3.1. Adezinler 12

1.3.2. Toksinler 12

2.3.3. Pigment üretimi 12

1.3.3. Enzimler 13

1.4. *Aspergillus* Türlerinin Klinik Önemi 14

1.5. Aspergillozis Tanı 16

1.5.1. Direk Mikroskopi 17

1.5.2. Kültür 18

1.5.3. Galaktomannan 18

1.5.4. β-D-glukan testi 19

1.5.5. Moleküler testler 19

1.5.6. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Kütle Spektrometresi 20

1.6. *Aspergillus* Enfeksiyonunda Tedavi 21

1.6.1. Klasik Amfoterisin B 23

1.6.2. Amfoterisin B Lipid Formülasyonları 24
1.6.3. Antifungal Trizoller 24
1.6.3.1. İtrakonazol 25
1.6.3.2. Vorikonazol 25
1.6.3.3. Posakonazol 25
1.6.3.4. İsavukonazol 26
1.6.4. Ekinokandinler 26
1.7. Antifungallere Direnç Gelişimi 27
1.7.1. Polyenlere direnç 27
1.7.2. Azol Direnci 28
1.7.3. Ekinokandinlere direnç 29
1.8. Antifungal Duyarlılık Testleri 30
1.8.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi 30
1.8.2. Disk Difüzyon 33
1.8.3. Gradient Difüzyon Yöntemi 34
1.8.4. Diğer Yöntemler 35
1.8.4.1. Aspergillus Azol Direnci için Agar Tarama Yöntemi 35
1.8.4.2. Kolorimetrik Sıvı Mikrodilüsyon Panelleri 35
1.8.4.3. Akış Sitometrisi 35
1.8.4.4. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Kütle Spektrometresi 36
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER 36
2.1. İzolatların tanımlanması 37
2.1.1. Geleneksel yöntemler 37
2.1.1.1. Makroskobik özellikler 37
2.1.1.2. Mikroskobik özellikler 37
2.1.1.3. 45°C'de Üreme Testi 38

2.1.2. MALDI-TOF MS 38
2.1.2.1. Hedef plakasına örnek uygulama 38
2.1.2.2. Değerlendirme 38
2.2. Antifungal Duyarlılık Yöntemleri 39
2.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi 39
2.2.1.1. Besiyerinin hazırlanması 39
2.2.1.2. Antifungal ilaç dilüsyonlarının hazırlanması 39
2.2.1.3. Küf süspansiyonunun hazırlanması 40
2.2.1.4. Mikroplaklara inokulasyon 40
2.2.1.4.1. RPMI 1640 Besiyerinin Mikroplaklara Dağıtılması 40
2.2.1.4.2. Antifungal İlaçların Mikroplaklarda Seri Sulandırımı 40
2.2.1.4.3. Aspergillus İnokülasyonlarının Dağıtılması 40
2.2.1.4.4. Mikroplakların İnkübasyonu 41
2.2.1.5. Testin analizi 41
2.2.2. İzolatların GD Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıklarının Saptanması 41
3. BULGULAR 44
4. TARTIŞMA 64
5. SONUÇ 74
KAYNAKLAR 76
EKLER 86
EK 1. DEÜ GOEK onayı 86

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: En sık görülen *Aspergillus* türlerinin tanımlanması 9
Tablo 2: *Aspergillus* enfeksiyonlarının sınıflandırılması 15
Tablo 3: *Aspergillus* türlerinin laboratuvar tanısında temel yaklaşımlar 17
Tablo 4: Aspergillozis tedavisinde kullanılan antifungal ilaçların sınıflandırılması ... 22
Tablo 5: CLSI M38-A2 klavuzuna göre filamentöz mantarlar için SMD yöntemi ile antifungal duyarlılık testi 32
Tablo 6: CLSI M38-A2 klavuzu ile EUCAST E.Def 9.3.2 klavuzunun karşılaştırılması 33
Tablo 7: CLSI M38-A2 referans yöntemine göre KK izolatlarının MİK aralıkları 37
Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen örneklerin türü, sayısı ve oranları..... 44
Tablo 9: *Aspergillus* türlerinin MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanma skorları ve sayıları..... 45
Tablo 10: *Aspergillus* türlerinin SMD ve GD yöntemi ile 24. ve 48. saatte elde edilen MİK/MEK aralıkları, MİK/MEK_{50}, MİK/MEK_{90} değerleri ve G.O'ları 48
Tablo 11: SMD ve GD yöntemlerinin 24. ve 48. saatlerdeki temel uyum oranları..... 50
Tablo 12: *Aspergillus* türlerinde SMD ve GD yöntemi ile MİK/MEK≤1 saptananların sayı ve yüzdesi..... 56
Tablo 13: Tüm *Aspergillus* türlerinin SMD ve DD yöntemi duyarlılık sonuçları 58
Tablo 14: Tüm *Aspergillus* türlerinin SMD ve GD yöntemi duyarlılık sonuçları..... 59
Tablo 15 : Tüm *Aspergillus* türlerinin DD yönteminin SMD yöntemiyle kategorik uyum ve hata oranları..... 61
Tablo 16: Tüm *Aspergillus* türlerinin GD yönteminin SMD yöntemiyle kategorik uyum oranları 63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: *Aspergillus* türlerinde mikroskobik görünüm 8
Şekil 2: *Aspergillus fumigatus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi 10
Şekil 3: *Aspergillus flavus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi 10
Şekil 4: *Aspergillus niger* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi 11
Şekil 5: *Aspergillus terreus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi 11
Şekil 6: Sistemik antifungal ajanların hedefleri 23
Şekil 7: *A. fumigatus'*un azol direnci kazanma yolları 29
Şekil 8: SMD yöntemi ile antifungal duyarlılığın belirlenmesi *(A. flavus*; AMB; 48. saat görünümü, en alt satırdaki kuyucuklarda KK izolatının ve diğer satırlarda çalışma izolatlarının 48. saat görüntüleri görülmektedir.) 46
Şekil 9: *A. fumigatus* GD yöntemiyle antifungal duyarlılığın belirlenmesi (solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü) 46
Şekil 10: *A. flavus*, GD yöntemi ile antifungal duyarlılığın belirlenmesi (solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü) 47
Şekil 11: DD yöntemiyle antifungal duyarlılığın belirlenmesi (*A. flavus*; solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü) 47
Şekil 12: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. fumigatus* MİK/MEK dağılımı (48. saat) 52
Şekil 13: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. fumigatus* MİK/MEK dağılımı (48. saat). 52
Şekil 14: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. flavus* MİK/MEK dağılımı (48. saat) 53
Şekil 15: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. flavus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)..... 53
Şekil 16: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. terreus* MİK/MEK dağılımı (48. saat) ... 54
Şekil 17: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. terreus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)..... 55

KISALTMALAR

AFDT	: Antifungal duyarlılık testleri
AMB	: Amfoterisin B
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BDG	: β-D-glukan
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CLSI	: 'Clinical and Laboratory Standarts Institute'
D-AMB	: Amfoterisin B deoksikolat
DD	: Disk difüzyon
DMI	: Demetilasyon inhibitörleri
DMSO	: Dimetilsülfoksid
ECIL 6	: 'The European Conference on Infections in Leukemia' (Avrupa Lösemide Enfeksiyonlar Konferansı)
ECV	: Epidemiological cut off value (Epidemiyolojik sınır değer)
EIA	: Enzim immunoassay
ELİSA	: Enzim bağımlı immunosorbent test
EORTC/MSG	: 'European Organization for Research and Treatment of Cancer Mycoses study group criteria' (Avrupa kanser araştırma ve tedavi örgütü ve mikoz çalışma grubu)
EUCAST	: 'European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing'
GD	: Gradient difüzyon
GM	: Galaktomannan
HKHT	: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
IDSA	: 'Infectious Diseases Society of America' (Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği)
İA	: İnvaziv Aspergillozis
İV	: İntravenöz
KAS	: Kaspofungin
KK	: Kalite kontrol
MALDI-TOF MS	: 'Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry' (Matriks ilişkili lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş

zamanı kütle spektrometrisi)

MEK : Minimal efektif konsantrasyon
MHA : Müller Hinton Agar
MİK : Minimal inhibitör konsantrasyon
NPV : Negatif prediktif değeri
PAS : Periyodik asit-Schiff
PDA : Patates dekstroz agar
PPV : Pozitif prediktif değeri
PSZ : Posakonazol
PZT : Polimeraz zincir tepkimesi
ROS : Reaktif oksijen türleri
SDA : Sabouraud dekstroz agar
SMD : Sıvı mikrodilüsyon
VOR : Vorikonazol

Sistemik Klinik Örneklerden Üretilen *Aspergillus* Türlerinin Antifungal Duyarlılıklarının Farklı Yöntemlerle Araştırılması

ÖZET

Emine Korkmaz, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, basemine40@gmail.com

Aspergillus türlerinin, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül enfeksiyonlara yol açması ve son yıllarda antifungallere direnç oranının artması nedeniyle antifungal duyarlılık testlerinin önemi artmıştır. Çalışmamızda *Aspergillus* türleri için disk difüzyon (DD) ve gradient difüzyon (GD) yöntemlerini, referans duyarlılık yöntemi olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile karşılaştırmayı amaçladık. Ayrıca amfoterisin B (AMB), itrakonazol (İTZ), vorikonazol (VOR) ve kaspofungine (KAS) karşı duyarlılık durumunu ve MİK değerlerini belirleyerek ülkemiz epidemiyolojik verilerine katkıda bulunmayı ve hastanemizde üreyen *Aspergillus* türlerinde direnç oranlarını belirleyerek ampirik tedaviye yön vermeyi hedefledik.

Yöntem: Çalışmada 62 *A. fumigatus*, 28 *A. flavus* ve 16 *A. terreus* izolatı (toplam 106 *Aspergillus* izolatı) yer aldı. Çalışmaya dahil edilen *Aspergillus* izolatları, geleneksel yöntemler ve Matriks İlişkili Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile tanımlandı. Tüm izolatların DD, GD ve SMD yöntemi ile AMB, VOR, İTZ ve KAS'a karşı duyarlılıkları belirlendi. SMD yönteminde RPMI 1640 sıvı besiyeri, DD ve GD yönteminde saf Mueller Hinton agar (MHA) kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamızda SMD yöntemi ile en düşük MİK/MEK_{90} değerleri VOR ve KAS (sırasıyla 0.5 µg/ml ve 0.06 µg/ml) ile saptandı. AMB ve İTZ $MİK_{90}$ değerleri ise 2 µg/ml olarak bulundu. Tür düzeyinde incelediğimizde, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının AMB $MİK_{90}$ değerleri (sırasıyla 2 µg/ml ve 4 µg/ml), *A. fumigatus* izolatlarından (1 µg/ml) yüksek saptandı. *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının İTZ $MİK_{90}$ değerleri 1 µg/ml olup, *A. fumigatus* izolatlarından (2 µg/ml) daha düşük bulundu. Tüm türlerin İTZ MİK değerlerinin literatürle karşılaştırdırıldığında yıllar içinde artış gösterdiği saptandı.

GD yöntemini SMD yöntemi ile karşılaştırdığımızda ±2 dilüsyonda temel uyum oranları, AMB, VOR, İTZ ve KAS için sırası ile %91.6, %99.1, %100 ve %38.6 olarak

saptandı. KAS ile temel uyum oranları düşük bulunmasına rağmen kategorik uyum oranları yüksek bulundu.

DD yöntemi SMD yöntem ile karşılaştırıldığında kategorik uyum oranları AMB, VOR, İTZ ve KAS için sırası ile %65.1, %99.1, %77.3 ve %100 olarak saptandı.

GD yöntemini SMD yöntemi ile karşılaştırıldığında tüm türler bir arada değerlendirildiğinde kategorik uyum oranları AMB, VOR, İTZ ve KAS için sırası ile %79.2, %99.1, %87.8 ve %100 olarak saptandı. GD yöntemi kategorik uyum oranları, DD yönteminin AMB ve İTZ uyum oranlarından yüksek olup VOR ve KAS için her iki yöntemde aynı bulunmuştur.

Sonuç: Saptanan yüksek temel ve kategorik uyum oranlarına göre GD yönteminin, SMD yöntemine iyi bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca GD yöntemi için kullandığımız saf MHA, diğer besiyerlerine göre daha ucuz ve kolay ulaşılabilir olmasıyla avantaj sağlamaktadır.

CLSI M51-A DD yöntemini SMD yöntemiyle karşılaştırdığımızda tüm ilaçlar için yüksek uyum oranları saptandı. Fakat AMB ve İTZ uyum sonuçları diğer ilaçlara göre daha düşük saptanmıştır. Bu sonuçlara göre DD yöntemi de SMD yöntemine bir alternatif olarak düşünülebilir fakat AMB ve İTZ sonuçları daha dikkatli yorumlanmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, antifungal duyarlılık, sıvı mikrodilüsyon, gradient difüzyon testi, disk difüzyon, amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin

Investigation of Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* Species Isolated from Systemic Clinical Specimens with Different Methods

ABSTRACT

The importance of antifungal susceptibility tests has increased due to the fact that *Aspergillus* species cause fatal infections in immunocompromised individuals and the resistance rate to antifungals has increased in recent years.In our study, we aimed to compare the disc diffusion (DD) and gradient diffusion (GD) methods for *Aspergillus* species with the broth microdilution (SMD) method, which is the reference susceptibility method.In addition, we aimed to contribute to the epidemiological data of our country by determining the susceptibility status and MIC values for amphotericin B (AMB), itraconazole (ITZ), voriconazole (VOR) and caspofungin (CAS) and to guide empirical treatment by determining the resistance rates in *Aspergillus* species isolated in our hospital.

Method: Sixty-two *A. fumigatus*, 28 *A. flavus* and 16 *A. terreus* isolates (a total of 106 *Aspergillus* isolates) were included in the study. *Aspergillus* isolates included in the study were identified by conventional methods and Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS). The susceptibilities of all isolates to AMB, VOR, ITZ and CAS were determined by performing DD, GD and SMD methods. RPMI 1640 broth was used in the SMD method, and nonsupplemented Mueller Hinton agar (MHA) was used in the DD and GD methods.

Results: In our study, the lowest MIC/MEC_{90} values were determined for VOR and CAS (0.5 µg/ml and 0.06 µg/ml, respectively) with SMD method. AMB and ITZ MIC_{90} values were found to be 2 µg/ml. When we analyzed at the species level, *A. flavus* and *A. terreus* isolates had higher AMB MIC_{90} values (2 µg/ml and 4 µg/ml, respectively) than *A. fumigatus* isolates (1 µg/ml). ITZ MIC_{90} values of *A. flavus* and *A. terreus* isolates were 1 µg/ml and were found lower than *A. fumigatus* isolates (2 µg/ml). It was determined that ITZ MIC values of all species have increased over the years when compared with the literature.

When we compared the GD method with the SMD method, the essential agreement rates at ±2 dilution were found to be 91.6%, 99.1%, 100% and 38.6% for AMB, VOR, ITZ, and CAS, respectively. Although essential agreement rates with CAS were low, categorical agreement rates were high.

When the DD method was compared with the SMD method, categorical agreement rates were found to be 65.1%, 99.1%, 77.3% and 100% for AMB, VOR, ITZ, and CAS, respectively.

When the GD method was compared with the SMD method, the categorical agreement rates were found to be 79.2%, 99.1%, 87.8% and 100% for AMB, VOR, ITZ and CAS, respectively if all species were evaluated together. The categorical agreement rates of the GD method were higher than the AMB and ITZ agreement rates of the DD method while they were found to be the same in both methods for VOR and CAS.

Conclusion: According to the high essential and categorical agreement rates, we think that GD method may be a good alternative for SMD method. Furthermore, nonsupplemented MHA which we used for GD method provides an advantage as it is cheaper and easily accessible than other media.

When we compared CLSI M51-A DD method with SMD method, high agreement rates were found for all drugs. However, AMB and ITZ agreement results were found to be lower than other drugs. According to these results, DD method can also be considered as an alternative to SMD method, but AMB and ITZ results should be interpreted more carefully.

Keywords:*Aspergillus*, antifungal susceptibility, broth microdilution, gradient diffusion test, disc diffusion, amphotericin B, itraconazole, voriconazole, caspofungin

GİRİŞ VE AMAÇ

Aspergillus türleri dünyada en fazla bulunan mantarlar arasında olup mantar enfeksiyonu olan hastalar arasında en yüksek ölüm oranına neden olan patojenlerdendir (1). *Aspergillus* türleri, genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde hayatı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara, bağışıklık sistemi normal kişilerde kronik enfeksiyonlara ve hipersensitivite reaksiyonlarına eğilimli kişilerde ise alerjik reaksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojendir (2). *Aspergillus* enfeksiyonlarının, genellikle organ nakli veya kök hücre nakli geçirmiş kişiler gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ortaya çıkan, en sık akciğerlerde olmak üzere diğer organlarda da ciddi enfeksiyona neden olan formuna invaziv aspergillozis (İA) denmektedir (3,4).

Her yıl 200.000'den fazla hastada İA gelişmektedir (5). Bu hastalardan izole edilen en yaygın tür *A. fumigatus* olup, *A. flavus* bu türü takip etmektedir (6). Ayrıca, *Aspergillus* türlerinin doğru bir şekilde tanımlanmasıyla insanlarda İA vakalarında raporlanan nadir türlerin sayısı artmaktadır (7).

İA vakalarının tedavisinde ve profilaksisinde ilk seçenek olarak triazol antifungal ilaçlar olan itrakonazol (İTZ), vorikonazol (VOR) ve posakonazol (PSZ) önerilmektedir (8,9). Fakat son on yılda azole dirençli *A. fumigatus* izolatları saptanmaya başlamıştır ve sayıları giderek artmaktadır. Azole dirençli bu izolatlar, genellikle uzun süreli azol tedavisi alan, bir ile otuz aylık tedaviden sonra edinilmiş direnç geliştiren ve invazif olmayan aspergillozlu hastalarda daha sık görülmektedir. Bu dirençli izolatlar, multiazole dirençli fenotip sergileyebilir ve altta yatan direnç mekanizması da sıklıkla *cyp51A* genindeki nokta mutasyonlarını içerir (10). Bir başka direnç modeli ise, daha önce azol tedavisi almayan akut aspergillozisli hastalarda saptanmıştır. Bu hastaların, büyük olasılıkla çevresel kaynaklardan dirençli izolatları aldığı düşünülmektedir. Bu dirençli izolatların tarımda yaygın kullanılan azol antifungallere bağlı ortaya çıktığına dair veriler bulunmaktadır (11).

Antifungal duyarlı suşlardan dirençli olanları ayırmak için çeşitli antifungal duyarlılık testleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında en çok kullanılanları, sıvı mikrodilüsyon (SMD), disk difüzyon (DD) ve gradient difüzyon (GD) testleridir. Altın standart olarak kabul edilen SMD yöntemi için “Clinical and Laboratory Standarts Institute” (CLSI) ve “European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST)’ın yayınladığı standartlar bulunmaktadır. Fakat yoğun emek isteyen bir

test olduğundan dolayı laboratuvarların çoğu bu testi çalışmamaktadır. Bu nedenle, yerel Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri hakkındaki veriler de yetersizdir. Ancak, sağlık kuruluşları dönem dönem klinik örneklerden üremiş olan *Aspergillus* izolatları için antifungal duyarlılık testi çalışarak kendi antifungal duyarlılık profillerini belirlemelidir. Birçok araştırmaya rağmen antifungal duyarlı suşlardan dirençli olanları ayırmak için kolay ve ucuz bir in vitro duyarlılık yöntemi geliştirilmemiştir (12).

CLSI, 2010 yılında dermatofit olmayan filamentöz mantarların DD yöntemi ile antifungal duyarlılık testi için bir standart (M51-A) yayınlamıştır. Bu belge, fırsatçı küflerin triazollere, amfoterisin B (AMB) ve kaspofungine (KAS) duyarlılığının test edilmesi için gerekli basamakları açıklamaktadır (13). Ayrıca son zamanlardaki bazı çalışmalarda da SMD ve DD yöntemine bir alternatif olarak GD yöntemi geliştirilmiştir. En yeni triazol ilaç olan isavukonazol dahil olmak üzere tüm onaylanmış antifungal ilaçlar için GD stripleri bulunmaktadır. Bu yöntemin kullanımının kolay olması dışında bir avantajı da MİK değerini belirleyerek antifungal duyarlılığı ölçebilmesidir (14).

Bu çalışmada, *Aspergillus* türlerinin duyarlılıklarını belirlemede, DD ve GD yöntemlerini referans duyarlılık yöntemi olan SMD yöntemi ile karşılaştırmayı ve araştırmamızda yer alan izolatların AMB, İTZ, VOR ve KAS'a karşı duyarlılıklarını belirlemeyi amaçladık. Çalışmamız verilerinin, Türkiye epidemiyolojik verilerine ve hastanemizdeki *Aspergillus* enfeksiyonlarının ampirik antifungal tedavisi seçimine katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

1. GENEL BİLGİLER

Hyalen küflerin oluşturduğu hastalık tabloları çeşitlilik gösterir ve nasıl bir klinik tablonun gelişeceği konağın bağışıklık durumuna bağlı olarak değişir. Enfeksiyöz mantarların girişi solunum yolu, kontamine cerrahi aletler, intraokuler lensler, protezler, rutin sağlık bakımı ile ilişkili diğer kontamine materyaller yoluyla gerçekleşebilir (15).

Aspergillus türleri, yeryüzünde yaygın olarak bulunan küf mantarları olup doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalleridir. Bu mantarlar, ürettikleri

enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar. Fakat uygun koşullar oluştuğunda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler (16,17).

İA olgularında mortalite %50'nin üzerindedir. Ayrıca kemik iliği nakli yapılan hastalarda en uygun antifungal tedavi uygulansa bile mortalite oranları daha da yükselebilir (18,19). Altta yatan hastalık ve enfeksiyon bölgesi ana prognostik faktörler olsa da, son on yılda İA mortalitesinde azalma gözlenmiştir ve bu durum, diğer faktörlerin yanı sıra azol tedavisine bağlanmıştır (19–21). Fakat azol tedavisi ile elde edilen bu sonuç, *Aspergillus* türlerinde ortaya çıkan azol direnci nedeniyle kaybedilme tehdidi altındadır. Azol grubu, farklı aspergilloz klinik tabloları için ilk tedavi seçeneği olarak önerilmektedir ve başka oral tedavi seçeneği bulunmamaktadır (21,22). AMB'nin lipid formülasyonları ve ekinokandinleri de içeren diğer tedavi seçenekleri fataliteyi önlemede azoller kadar etkili bulunmamıştır (18,19,22).

1.1. Aspergillus Cinsi Mantarların Genel Özellikleri

Aspergillus cinsi mantarlar, *Ascomycota* filumunda, *Evascomycetes* sınıfında, *Eurotiales* takımında, *Trichocomaceae* ailesinde sınıflandırılmıştır. Uzun yıllardır bilinen anamorf (eşeysiz, aseksüel) şekli ile beraber son yıllarda telemorf (eşeyli, seksüel) şekilleri de tanımlanmıştır (15).

Hifler (filamentöz uzantılar) ve sporlar (aseksüel sporlar; konidiya, klamidospor vb; seksüel sporlar; askospor) yardımıyla, aseksüel ve seksüel olarak üreyebilir. Ancak seksüel üreme fazını laboratuvarda göstermek kolay değildir. Bundan dolayı izolatların tanımlanması, besiyerlerinde üretildikten sonra hif ve konidiyası yardımıyla yapılmaktadır (15,23,24).

Aspergillus fumigatus dünyada İA olgularının çoğundan sorumlu olan türdür. Diğer en sık görülen patojen türler *A. flavus ve A.niger*'dir. *A. terreus* gittikçe artan oranda bildirilmektedir (15).

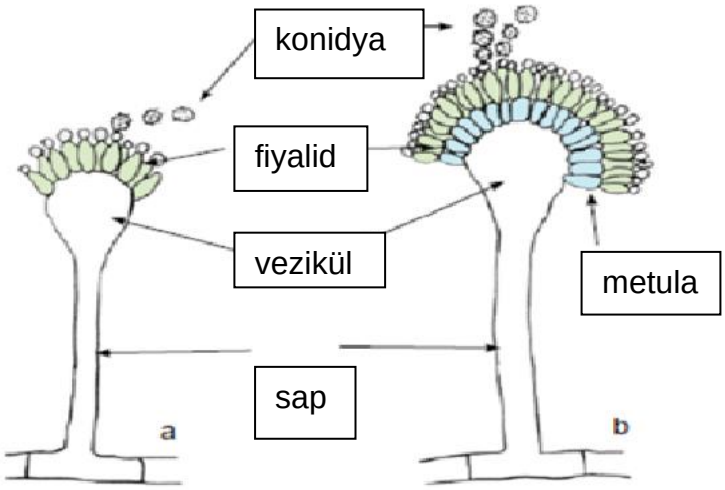
Aspergillus spp. enfeksiyonlarının tür düzeyinde tanımlanması, türlerin farklı direnç paternleri nedeniyle klinik olarak önemli olabilmektedir. Çoğu rutin laboratuvar, küf mantarlarının tanımlanması için makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri kullanmaktadır. Bu nedenle, çoğu klinik izolat tür kompleksi düzeyinde tanımlanmaktadır (25).

1.2. Aspergillus Cinsi Mantarların Morfolojik Özellikleri

Yaklaşık 350 çeşit türden oluşan *Aspergillus* cinsi dünyadaki en yaygın mantar cinslerden biridir (26).

1.2.1. Mikroskobik yapı

Aspergilllus türlerinde, bölmeli (septalı) hifler ve dallanma göstermeyen konidyoforlar bulunur. Konidyoforlar uç kısmında genişleyerek vezikül denen yuvarlak bir kesecik halini alır. Vezikül yüzeyinin tümü veya bir bölümü şişeye benzer bir sterigmata ile örtülmüştür. Sterigmatalardan da yuvarlak, düzgün veya pürüzlü konidyumlar oluşur. Konidyum yapıcı hücreler olan fiyalidler ya doğrudan vezikülün üzerinden (uniseriat) veya metulaların üzerinden (biseriat) doğarlar ve altındaki sap "stibe" denilen yapı, hücre ile birlikte konidyumlu başı oluşturur (15,27,28). *Aspergillus* türlerinin mikroskobik görünümü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1: *Aspergillus* türlerinde mikroskobik görünüm (29)

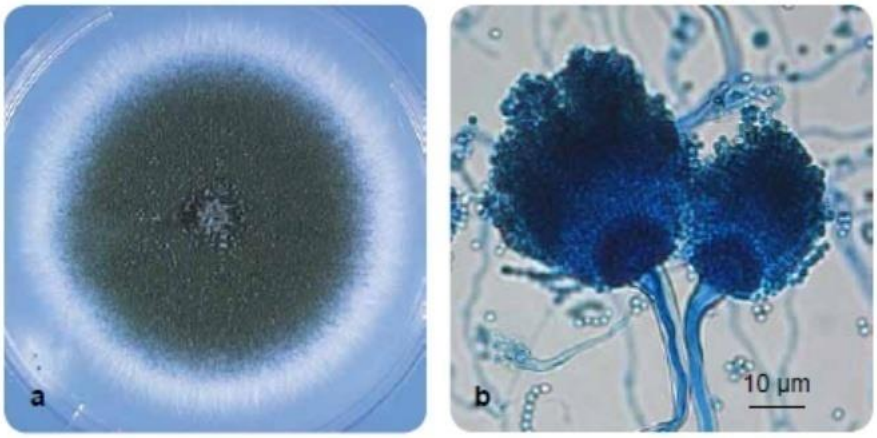
1.2.2. Koloni görünümü

Koloni yüzeyleri başlangıçta beyaz olup sonrasında türlere göre sarı, yeşil, kahverengi veya siyah gibi renklere dönüşebilmektedir. Koloni yüzeyi pamuğumsu veya kadifemsi görünümde olabilir. Koloni tabanı da beyaz, sarı, kahverengi olabilmektedir. *Aspergilllus* türleri arasında koloni görünümleri yönünden farklılıklar vardır (30). *Aspergillus fumigatus* kolonileri, tipik olarak mavi-yeşil renkte yoğun konidyoforlardan oluşan süet benzeri bir yüzeye sahiptir (Şekil 2). *Aspergillus flavus*

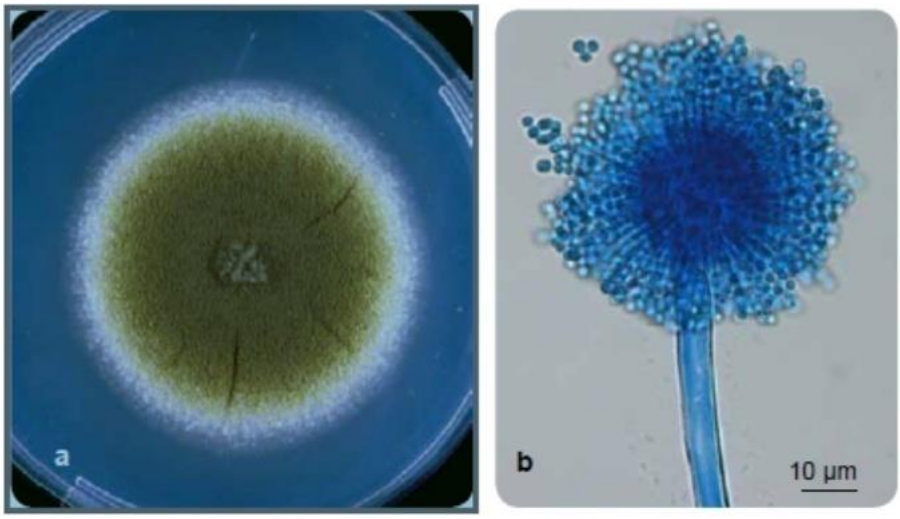
kolonileri, granüler, yassı yapıda, genellikle radyal oluklar içeren ve ilk başta sarı, ancak zamanla parlak koyu sarı-yeşil renge dönen koloniler şeklindedir (Şekil 3). *Aspergillus niger* kolonilerinin yüzeyi siyah kenarları beyaz renkte, yünlü yapıda, arka yüzü beyaz ile krem renktedir (Şekil 4). *Aspergillus terreus* kolonileri, tipik olarak süet benzeri görünümde, tarçın, deve tüyü gibi kum-kahverengi renkte olup tersten bakıldığında ise rengi sarıdan koyu kahverengiye dönüşmektedir (Şekil 5) (29). Tablo 1'de en sık görülen *Aspergillus* türlerinin makroskobik ve mikroskobik görünüm özellikleri verilmiştir. Ayrıca Şekil 2-5'de koloni görünümleri ve konidial baş morfolojisi gösterilmiştir.

Tablo 1: En sık görülen *Aspergillus* türlerinin tanımlanması (30)

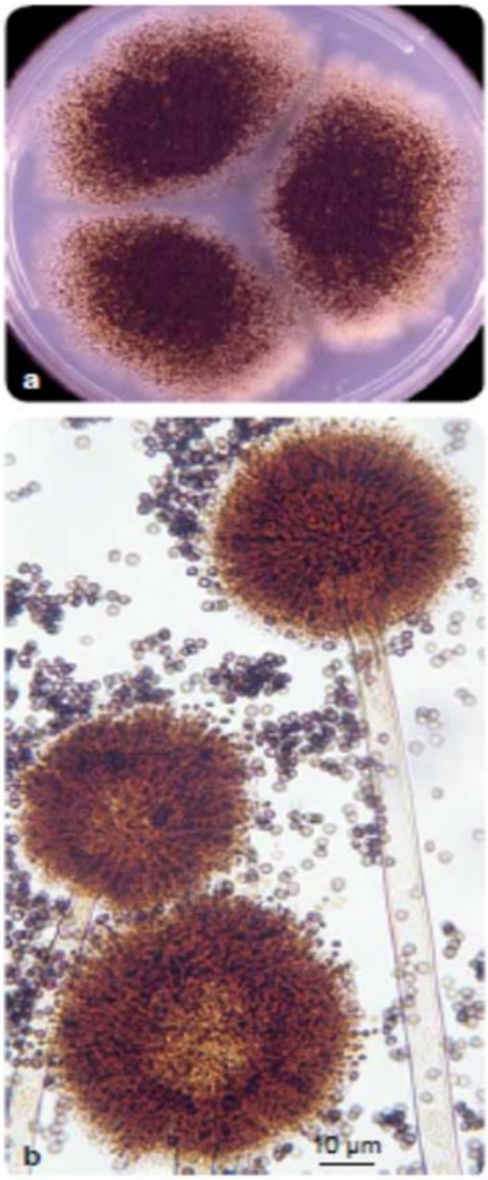
Türler	**Patojenite**	**Makroskopik morfoloji**	**Mikroskopik morfoloji 'konidyofor'**	**Mikroskopik morfoloji 'fiyalid'**
A. fumigatus	Aspergillozisin en yaygın nedeni	Kadifemsi veya toz şeklinde, ilk beyaz renkli, sonrasında koyu yeşil, gri renge dönebilir	Kısa (<300 µm) Düz	Uniseriat, genellikle yalnızca vezikülün üst üçte ikisinde, konidyofor eksenine paralel
A. flavus	Genellikle kontaminant, fakat hastalıkların nedeni de olabilir; yaygın olarak aflatoksin ile ilişkili	Kadifemsi, sarıdan yeşile veya kahverengiye dönebilir	Değişen uzunluk, Düzensiz, çukurlu dikenli	Uniseriat ve biseriat, vezikülün tümünü kaplar, her yöne yönelir
A. niger	Genellikle kontaminant olarak bilinmesine rağmen, ciddi hastalıklarda etken olabilir	Yünlü, ilk beyazdan sarıya, sonra siyaha döner	Uzun Düz	Biseriat, vezikülün tamamını kaplayan radyal baş
A. terreus	Genellikle kontaminant, fakat hastalıklara da neden olduğu bilinmektedir	Genellikle kadifemsi, tarçın renginde	Kısa (<250µm) Düz	Biseriat, kolumnar yapıda



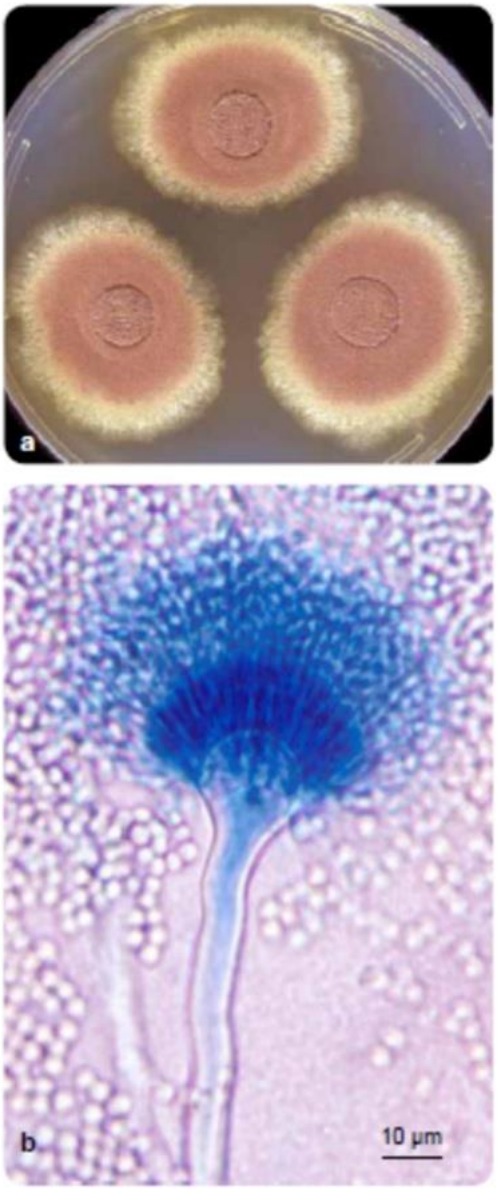
Şekil 2: *Aspergillus fumigatus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi (29)



Şekil 3: *Aspergillus flavus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi (29)



Şekil 5: *Aspergillus niger* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi (29)



Şekil 4: *Aspergillus terreus* (a) kültür, (b) konidyal baş morfolojisi (29)

1.3. Aspergillus Türlerinin Tanımlanan Virülans Faktörleri

Aspergillus türlerinin hastalık oluşturabilmesi için, konak dokusuna tutunmasını, dokuya penetrasyonunu kolaylaştıran ve fagositik hücreler gibi savunma elemanlarını etkisiz hale getirmesini sağlayan bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunun için şu ana kadar yapılmış olan çalışmalarda, adezinler, pigment oluşturma özelliği, toksik moleküller ve ekstraselüler enzimler *Aspergillus* türlerinde olası virülans faktörleri olarak bildirilmektedir (31).

1.3.1. Adezinler

Aspergillus konidyumları fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albümin, immünoglobülinler, kollajen ve surfaktan gibi konakta dolaşımda veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanırlar (32). Bu bağlanma özgül olmayan fizikokimya etkileşimler ve/veya özgül reseptör ligand tanıma ile gerçekleşir. *A. fumigatus* konidyumlarının en dış tabakası, konidyumlara hidrofobik özellik kazandıran rodlet tabakası ile kaplı melaninden oluşur. Bu rodlet tabakasında bulunan hidrofobik proteinlerin (hidrofobinler), bağışıklık sistemi tarafından konidyanın tanınmasını maskelediği saptanmıştır (31)

1.3.2. Toksinler

Aspergillus türleri aflatoksin, okratoksin A, fumagilin ve gliotoksin gibi toksik ikincil metabolitler sentezlemektedir. Bu metabolitlerden üzerinde en fazla durulanı gliotoksindir. Gliotoksin, akut toksisiteye neden olur. Ayrıca makrofaj fagositozunu inhibe edici, makrofaj DNA'sını parçalayıcı ve makrofajların apopitozunu indükleyici etkisi bulunmaktadır. T ve B hücrelerinin aktivasyonunu bloke eder. Bu etkileri ile bağışıklık sistemini baskılar. *A. fumigatus* ile enfekte hayvan ve insanlarda saptanan en düşük gliotoksin konsantrasyonu bile in vitro etkinlik gösterecek kadar yüksek düzeyde saptanmıştır (31). Bir başka önemli metabolit, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* küfleri tarafından üretilen aflatoksindir. Aflatoksin, gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olması açısından önemlidir (34,35). Kontamine yemlerin yenmesi sonucu hayvanlarda hastalıklara neden olan aflatoksin, bu hayvanların et, yumurta ve sütlerinin tüketilmesi sonucu insanları enfekte edebilmektedir. Aflatoksinle kontamine yemlerin tüketimi hayvan sağlığını ve üretimini olumsuz etkilemektedir. Bu toksinler akut ölümlerden kronik hastalıklara kadar geniş hastalık yelpazesine neden olabilirler (36,37).

2.3.3. Pigment üretimi

A. fumigatus sporlarının hücre duvarında bulunan dihidroksinaftalen (DHN) melanin, yeşil-koyu gri renk oluşturur. Melanin, ultraviyole ışınlarına, enzimatik lizise, aşırı ısı derecelerine ve infeksiyon sırasında reaktif oksijen türevlerine karşı koruyuculuk sağlar (38).

Dihidroksinaftalen melanin biyosentezinde işlev gören poliketid sentaz ve sitalon dehidrataz enzimlerini kodlayan *alb1* ve *arp1* genleri bulunmaktadır. Bu

genlerin hasara uğratıldığı bir çalışmada elde edilen beyaz renkli *A. fumigatus* konidyumlarının, komplemana daha kuvvetli bağlandığı ve duvarının daha geçirgen olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak *A. fumigatus*'un yeşil pigment üreten suşlarının üretmeyen suşlara göre daha patojen olduğu saptanmıştır (39,40).

Buraya kadar bahsedilen virulans faktörlerinin varlığı konusunda tartışmalar sürmektedir. *Aspergillus* türlerinin virülans faktörleri arasında daha kesin kanıtlara sahip olan enzimlerdir.

1.3.3. Enzimler

Konak hücre membranları protein ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Bu nedenle, aspergilloz patogenezinde *Aspergillus* türlerinin proteinaz ve fosfolipaz aktivitesine sahip enzimleri üzerinde dikkatle durulmaktadır.

İnsan pulmoner hücre dizisinde, *A. fumigatus* tarafından üretilen proteinazların proinflamatuvar sitokin salınımını indüklediği ve solunum yolu epitel hücrelerinin ayrılmasına neden olduğu gösterilmiştir (41).

Elastin, akciğer dokusunun %28'ini oluşturan majör yapısal bileşenlerinden biri olduğu için, *Aspergillus* türlerinin elastinolitik aktiviteye sahip proteinazlarının (elastaz) akciğer dokusuna invazyonda önem taşıdığı bilinmektedir. Elastaz aktivitesine sahip olan ve olmayan çevresel *A. fumigatus* izolatları, bağışıklık sistemi baskın fare modellerinde invaziv pulmoner aspergilloz gelişimi açısından karşılaştırılmıştır. Elastaz aktivitesine sahip olmayan suşların avirulan olduğu saptanırken, elastaz üreten suşların, farelerde 48-96 saat içinde ölüme neden olduğu ve akciğer dokusunda hifal yapılar ve alveoler nekroz oluşturduğu saptanmıştır (32).

Başka bir çalışmada elastaz aktivitesi, klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* türlerinde araştırılmış ve invaziv hastalıktan sorumlu olan tüm suşların elastaz aktivitesine sahip olduğu gösterilirken, elastaz üreten her suşun invaziv hastalık tablosundan sorumlu olmadığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, elastaz aktivitesinin varlığı tür düzeyinde de incelenmiş ve *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatlarının %90'ından fazlasının elastaz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (42).

Diğer önemli virülans faktörü olarak kabul edilen enzimler, asit proteinaz ve fosfolipazlardır. Asit proteinaz , akciğer dokusuna kolonizasyonda ve/veya sıvısal bağışıklık ile ilgili faktörlerin etkisizleştirilmesinde rol oynarken, fosfolipidlerin indirgenmesinde rol oynayan fosfolipaz, epitelyal hasara neden olmaktadır (31). Bu nedenle *Aspergillus* türlerinde virülans faktörlerinin araştırılması, hastalığın seyri

açısından prognostik değere de sahip olabilir.

1.4. Aspergillus Türlerinin Klinik Önemi

İA enfeksiyonları, özellikle transplant alıcılarında ve hematolojik ya da diğer maligniteler nedeniyle kemoterapi alan hastalarda, yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla birliktelik gösterir (15).

Yüksek riskli hastalardan *Aspergillus* türlerinin izole edilmesi sonrası, bu hastalardaki enfeksiyon varlığı konağın durumuna bağlı olarak, invaziv enfeksiyonla birliktelik gösterebilir. *Aspergillus* türleri rutin olarak solunum yolu, deri ve diğer örneklerden izole edilebildikleri için klinik örneklerden izole edilen herhangi bir *Aspergillus* türünün patolojik öneminin değerlendirilmesi, pozitif radyolojik veya bilgisayarlı tomografi bulgularının varlığında bile zor olabilmektedir. Gerçek pozitif kültürlerin yalancı pozitif kültürlerden ayrımında klinik ve radyolojik bulgular yararlıdır. "European Organization for Research and Treatment of Cancer Mycoses Study Group Criteria" (EORTC/MSG - Avrupa kanser araştırma ve tedavi örgütü ve mikoz çalışma grubu) tarafından konsensus kararları tanımlanmıştır. Burada konak faktörleri, klinik semptom ve bulgular, laboratuvar sonuçları değerlendirilerek hastalar kanıtlanmış, yüksek olasılıklı, düşük olasılıklı invaziv enfeksiyona sahip olanlar olarak gruplanmıştır. Fakat bu tanımlar, klinik ve epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmakta olup günlük tıp pratiğinde kullanılmaları güçtür (43).

Aspergillus türleri, konağın özelliklerine bağlı olarak çok farklı hastalık tablolarına neden olabilir (15,22). Ana giriş ve enfeksiyon bölgesi solunum yolu olsa da, penetrasyon ve enfeksiyon için diğer odaklarda da enfeksiyon tarif edilmiştir. Aspergillozun klinik belirtileri değişkenlik gösterir ve kolonizasyon ve invazyonun yeri ile boyutuna göre üç ana kategoriye ayrılabilir. Bunlar, alerjik reaksiyonlar, kronik pulmoner aspergilloz ve İA'dur. İA, değişik organların da tutulabildiği, ancak temel tutulumun akciğer dokusu olduğu bir klinik tablodur. *Aspergillus* türleri ayrıca - gözler, kulaklar ve cilt gibi bölgelerde - sistemik bir enfeksiyona neden olmadan konakçıyı kolonize edebilir, ancak bu tür vücut bölgelerinde invaziv olmayan *Aspergillus* raporları çok daha nadirdir (44). Tablo 2'de *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar sınıflandırılıp listelenmiştir (15).

Tablo 2: *Aspergillus* enfeksiyonlarının sınıflandırılması (15)

1. Sağlıklı konakta hastalık
    A. Toksikoz ve Mikotoksikoz
        a. Mikotoksinlerin alınması
        b. Diğer metabolitlerin alınması
    B. Alerjik tablolar
        a. Alerjik astım
        b. Alerjik rinit
        c. Alerjik sinüzit
        d. Ekstrensek alerjik alveolit
        e. Aşırı duyarlılık pnömonisi
        f. Alerjik bronkopulmoner aspergilloz
    C. Yüzeysel ve invazif olmayan enfeksiyonlar
        a. Deri enfeksiyonları
        b. Otomikoz
        c. Sinüzit
        d. Saprofitik bronkopulmoner aspergilloz
        e. Trakeobronşit
    D. İnvazif enfeksiyon
        a. Tek organ
        b. Çoklu organ (yayılım gösteren)

2. Doku hasarı veya yabancı cisim ile ilgili enfeksiyon
    A. Keratit ve endoftalmit
    B. Yanık yarası enfeksiyonu
    C. Osteomiyelit
    D. Prostetik kapak endokarditi
    E. Damar greft enfeksiyonu
    F. Aspergilloma (mantar topu)
    G. Ampiyem veya plevral aspergilloz
    H. Peritonit

3. Bağışıklık sistemi bozulmuş konakta enfeksiyon
    A. Primer deri aspergillozu
    B. Sino-orbital enfeksiyon
    C. Pulmoner aspergilloz
        a. İnvazif trakeobronşit
        b. Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz
        c. Akut invazif pulmoner aspergilloz
    D. Santral sinir sistemi aspergillozu
    E. İnvazif (yayılım gösteren) aspergilloz
    F. Gastrointestinal infarkt (nadir)

1.5. Aspergillozis Tanı

İnvaziv akciğer aspergillozunun tanısını koymak zordur ve genellikle klinik, kültür, radyoloji ve direk antijen bulgularının bir arada değerlendirilmesini gerektirir. Mantar kültürü için balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı ve steril olmayan diğer alt solunum yolu örnekleri alınabilir; fakat bu bölgelerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin kontaminasyon ve kolonizasyonu yansıtabilecekleri bilinmelidir. *Aspergillus* türleri ile ilgili enfeksiyon kanıtı en yüksek olan bulgular; biyopsi ile alınan akciğer dokusu gibi, normalde steril olan yerlerden organizmanın izole edilmesi ve hif elemanlarının dokuda histopatolojik olarak gösterilmesi ile elde edilebilir (15). Kısaca *Aspergillus* türlerinin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler tablo 3'de gösterilmiştir.

Örnekten küfleri ürettikten sonra laboratuvarlarda tanımlama işlemleri genel olarak fenotipik özelliklere dayanmaktadır. Farklı ortam ve sıcaklıklarda büyüme de dahil makromorfolojik kriterlerin yanı sıra konidya şekli, sporlar, miçel yapıları gibi mikromorfolojik kriterleri de değerlendirmek için yeterli büyüme ve sporülasyon gereklidir. Fakat bu geleneksel tanımlama yöntemlerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar, sonuç için nispeten uzun bir zaman gerektirmesi, küf izolatlarının morfolojik değişkenliği nedeniyle, laboratuvar personelinde bireysel uzmanlık gerektirmesi ve bazı küf izolatlarının karakteristik yapısal özelliklerini laboratuvar koşullarında geliştirmemesi şeklinde açıklanabilir. Belirtilen bu dezavantajlar tanımlamayı engeller veya yanlış tanımlamalara yol açar (45).

Tablo 3: *Aspergillus* türlerinin laboratuvar tanısında temel yaklaşımlar (46)

Test	Örnekler	Avantajları	Dezavantajlar
Direk mikroskopi	Solunum yolu örneği	Düşük maliyetli	Duyarlılığı düşük, yoğun emek isteyen bir test
Kültür	Solunum yolu ve doku örneği	Düşük maliyetli İleri testlere imkan sağlamakta	Duyarlı değil
Histopatoloji	Doku örneği	Kanıtlanmış tanıya imkan sağlar	Biyopsi dokusu gerekli
Galaktomannan(GM)	Serum, BAL örneği	Duyarlı Örnekler kolay elde edilir	Antifungal tedavi altındaki hastada duyarlılığı düşük
β-D-glukan(BDG)	Serum örneği	Duyarlı Örnekler kolay elde edilir	Özgüllüğü düşük
PZT (DNA varlığı)*	Herhangi bir örnek	Duyarlı Herhangi bir örneğe uygulanabilir	Yoğun emek isteyen bir test Pahalı

* PZT: Polimeraz zincir tepkimesi

1.5.1. Direk Mikroskopi

Aspergillozisin tanısı için en basit yöntemlerden birisidir. *Aspergillus*'lara ait hif elemanları ve hif morfolojileri, içinde kalkoflor beyazı veya blankofor P gibi floresan bileşikler bulunan ya da bulunmayan rutin KOH preparatları ile incelenebilir (15). İA'nın tanısı için blankofor P kullanılarak yapılan çalışmada duyarlılık %88, özgüllük %99 saptanmıştır. Aynı çalışmada kültür için duyarlılık %76 ve özgüllük %99 saptanmış olup optik aydınlatıcı kullanıldığıda tanısal performansın yüksek olduğu vurgulanmıştır (22,47). Fikse dokularda ise gomori metenamin gümüşleme ve periyodik asit-Schiff (PAS) boyası kullanılmaktadır. *Aspergillus* türlerinin teşhisi için bu boyalara ek olarak gram boyası veya KOH preparatlarındaki fenotipik özellikler, kültür yokluğunda etken olabilecek mantarlar için değerli bilgiler sağlamaktadır. Bu preparatlarda *Aspergillus* türleri genellikle hyalen, septumlu, dar açıyla dallanan hifleri olan yapılar (dikotom) şeklinde görünürler. Fakat, hiçbir mikroskobik bulgu patojeni kesin olarak teşhis edemez. *Aspergillus* türlerini diğer filamentli mantarlardan ayırmak için kültür veya kültür dışı teknikle doğrulama gereklidir (22).

1.5.2. Kültür

Genel olarak *Aspergillus* türleri sikloheksimit içermeyen rutin mikoloji besiyerlerinde kolayca izole edilebilirler. *Aspergillus* türleri biyolojik bir tehlike oluşturmaz ancak kuru sporların çevreye yayılmasından ve diğer kültürlerin çapraz kontaminasyonundan sakınmak için genellikle biyolojik güvenlik kabininde işleme alınmalıdır (15).

İA tanısı için en yaygın kullanılan örnekler, transtorasik perkütan iğne aspirasyonu veya video yardımlı torakoskopik biyopsi ile akciğer dokusu ve bronş lavaj/yıkama örnekleridir (22). *Aspergillus* spp. birincil izolasyon ortamı olan Sabouraud dekstroz agar (SDA) da üretildikten sonra konidyum ve pigment üretimini arttırmak ve tür tanımı için patates dekstroz agar (PDA), malt ekstrakt agar, inhibitör küf agar veya benzer şekilde sporülasyon sağlayan agarlar kullanılabilir. İzolasyon ortamına antibakteriyel maddelerin eklenmesi, bakteriyel çoğalmayı engelleyerek ve alt kültür ihtiyacını azaltarak tanımlama süresini kısaltmaya yardımcı olur. Besiyerlerinin 30°C yerine veya 30°C'ye ek olarak 35–37°C'de ilk inkübasyonu bazı *Aspergillus* türlerinin büyümesini hızlandırabilir. Benzer şekilde, kültür ortamının günlük olarak incelenmesi, mümkün olan en erken tespitin yapılmasını sağlar (48,49).

İnsanlar için patojen olan ana etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonu için PDA da üretilen mantarın kültürel ve mikroskobik özellikleri incelenir. Özgün besiyerleri ve inkübasyon koşulları, koloni rengi, çapı gibi değişkenlik gösterme potansiyeli olan özellikler de *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında kullanılabilir. Mikroskobik inceleme ise en iyi PDA besiyerinde yapılan lam kültürüyle gerçekleştirilir. Lam kültüründen laktofenol pamuk mavisi ile preparat hazırlanır ve ince mikroskobik yapılar (konidyofor, veziküller, metula, fiyalitler ve konidyumlar) incelenir (50).

1.5.3. Galaktomannan

Galaktomannan (GM), *Aspergillus* türlerinin çoğunun hücre duvarında bulunan, büyüyen hiflerden salınan ana polisakkarit bileşenidir (51). GM antijeni tesbiti için enzim bağımlı immunosorbent test (ELİSA) geliştirilmiştir. Bu test, GM antijeninin galaktofuranosid yan zincirine yönelik bir fare monoklonal antikoru olan EBA-2 kullanan bir çift sandviç enzim immunoassay (EIA) yönteminden oluşur. İmmunsupresif hastalarda GM antijen testi, İA'nın tanımlanmasında kullanılan EORTC/MSG kriterlerine dahil edilmiştir (15).

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda, mantar kolonizasyonunun infeksiyondan ayırt edilmesi zor olmakla birlikte kolonizasyonun hızla infeksiyona dönüşebileceği ve vücuda yayılma eğilimi gösterebileceği için risk altındaki hastaların serum örneklerinde haftada iki kez antijen aranması da önerilmektedir. Bu tip hastalarda antikor gelişmesi zayıf olduğundan, antikor belirlenmesi ile ilgili yöntemlerin erken tanıda yararlı olmadığı belirtilmektedir (52).

1.5.4. β-D-glukan testi

Aspergillus GM testi gibi, (1,3) β-D-glukan testi de, İA olasılığının tanımlanması için EORTC/MSG değerlendirmesine tanı kriteri olarak eklenmiştir (42). Bu antijen, mantar hücre duvarının önemli bir bileşenidir ve İA'lı hastaların serumunda ölçülebilir (15).

Ancak, bu testin *Aspergillus* ile ilişkili enfeksiyonlar ve diğer mantarların neden olduğu enfeksiyonları ayırt edememesi - yani düşük pozitif prediktif değeri (PPV) (en iyi durumda yaklaşık %50) - İA tanısında testin önemli bir sınırlamasıdır. Herhangi bir sistemik mantar enfeksiyonu için testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV ve negatif prediktif değeri (NPV) sırasıyla yaklaşık %93, %77, %51 ve %98 olarak tanımlanmıştır (53,54)

(1, 3) β-D-glukanın saptanması İA da dahil olmak üzere invaziv mikoz teşhisi için allojenik hematopoietik kök hücre nakli (HKHT) ve hematolojik malignitesi olan yüksek riskli hastalarda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bazı merkezler GM ile kombinasyon şeklinde değerlendirmenin gerekliliğini savunurken diğerleri GM testinin, (1,3) β-D-glukan testine tercih edilmesini savunmuşlardır (22).

1.5.5. Moleküler testler

Aspergillus DNA'sı klinik örneklerde, ya özellikle *Aspergillus*'u hedefleyen nükleik asit amplifikasyon yöntemleriyle ya da panfungal PZT testleri ve ardından türlerin tanımlanması için DNA dizilimi ile saptanabilir. İlki daha iyi duyarlılığa ve daha hızlı sonuç süresine sahiptir (DNA dizilemesine gerek yoktur), ancak panfungal yöntemlerin daha geniş bir tanımlama potansiyeli vardır. Her iki yöntemde de *Aspergillus spp.* doğrudan doku, kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve solunum örneklerinde tanımlanabilmekle birlikte, çalışmalar arasında performansları geniş değişkenlik (%40-100 duyarlılık, %60-100 özgüllük) göstermektedir (55,56).

Moleküler yöntemler tam olarak standardize edilememiş, bu yüzden klinik

kullanımı FDA tarafından onaylanmamıştır. “Infectious Diseases Society of America” (IDSA, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği), tanı için PZT kullanılacaksa her hastanın bireysel olarak değerlendirilmesini önermektedir (22).

Kültürle doğrudan karşılaştırma çalışmalarında, kan ve solunum yolu örneklerinde PZT’nin kültüre kıyasla daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (22).

BAL sıvı örneklerinin PZT duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla %67-100 ve %55-95 olduğu öne sürülmektedir. Serum örnekleri için ise duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %65-92 olarak bildirilmiştir (57). BAL’daki düşük özgüllük, solunum yollarının sıklıkla *Aspergillus* spp. tarafından kolonize olmasına ve PZT’nin kolonizasyonu, enfeksiyondan ayırt edememesine veya farklı *Aspergillus* türlerini ayıramamasına bağlanabilir (58).

Kombine GM ve PZT testlerinin, hematolojik maligniteler ve HKHT olan yetişkinlerde antifungal tedavi kullanımını azalttığı ve daha erken bir tanı ve daha düşük İA insidansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (59,60).

Az sayıda testin standartlaştırılmış ve valide edilmiş olması ve bu testlerin hasta yönetimindeki rolünün tam olarak belirlenememesi nedeniyle *Aspergillus* PZT’nin klinik uygulamada rutin kullanımı henüz önerilmemektedir (22).

1.5.6. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Kütle Spektrometresi

Son on yıl boyunca matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), birçok mikroorganizmanın hızlı ve doğru tanımlanmasını sağlamıştır. MALDI-TOF MS ilk olarak bakterilerin tanımlanması için kullanılmış olup daha sonra mayalar için uyarlanmıştır. Son zamanlarda da, yöntemin filamentli mantarların tanımlamasına başarılı bir şekilde uyarlanabileceği gösterilmiştir. Yeterli referans spektrum kütüphanesi oluşturulmuş ve rutin laboratuvarlar için kullanıma sunulmuştur (61–63).

Mikroorganizmaların tanımlaması için MALDI-TOF MS, başlangıçta iyonizasyon adımını ve kütle/yük oranına (m/z) dayalı olarak moleküllerin ayrılmasını içerir. Bu analiz, genellikle x ve y ekseni üzerindeki her iyonize molekülün m/z ve nispi yoğunluğunu gösteren bir grafikte özetlenen bir kütle spektrumuyla sonuçlanır (64). İlk olarak organik matrikse gömülü mikroorganizmalara, bir nitrojen lazeri uygulanır. Mikroorganizmaların molekülleri lazer ışını ile ısıtılıp buharlaştırılarak yüzeyden ayrıştırılır. Gaz halindeki iyonize moleküller, daha sonra bir elektrik alanı boyunca hızlandırılır ve daha sonra m/z oranıyla orantılı bir hızda bir vakum tüpü içinde göç

eder. Vakum tüpünün ucundaki bir dedektör, iyonize göç eden molekülleri algılar ve "uçuş zamanını" ve zaman içindeki miktarını ölçer. Bu ham spektrum daha sonra ön işlemden geçirilir ve bilinen referans spektrumlarının veri tabanı ile karşılaştırılır. Örnek spektrumunun referans spektrumla benzerliğine dayanarak, mikroorganizmanın en iyi eşleşen referans spektrumun aynı cins, tür veya alt türlerine ait olduğu belirlenir (65).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mantarların rutin tanımlanması için dört farklı MALDI-TOF MS platformu ticarileştirilmiştir. Bunlar; Andromas (Andromas SAS, Paris, Fransa), Axima@Saramis (Shimadzu/AnagnosTec, Duisburg, Almanya), Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve Vitek MS (BioMérieux, Marcyl'Etoile, Fransa) sistemleridir. Biotyper yazılımı, 0 ile 3 arasında değişen logaritmik skor değerleri verir; tür veya cins düzeyindeki tanımlamalar için sırasıyla ≥2 ve ≥1,7 skorlar önerilir. Vitek yazılımı için tür düzeyinde tanımlamalarda ≥%60 skor önerilir. (66).

Numune hazırlama, ön işlemler ve tanımlama algoritmaları ile ilgili farklılıklara rağmen, tüm bu sistemler küflerin tanımlanmasında güvenilir araçlar olarak görünmektedir. Genel olarak, MALDI-TOF MS küf tanımlama performansı tatmin edici olup doğru tanımlama oranlarının %72.0 ile %98.8 arasında değiştiği bildirilmektedir (65).

ITS, kalmodulin, β tubulin bölgeleri sekans analizi ile tanımlanmış 381 *Aspergillus* izolatı ile yapılan çalışmada Bruker Biotyper MALDI-TOF MS platformunun %89 oranında tür düzeyinde doğru tanımlama yaptığı saptanmıştır.

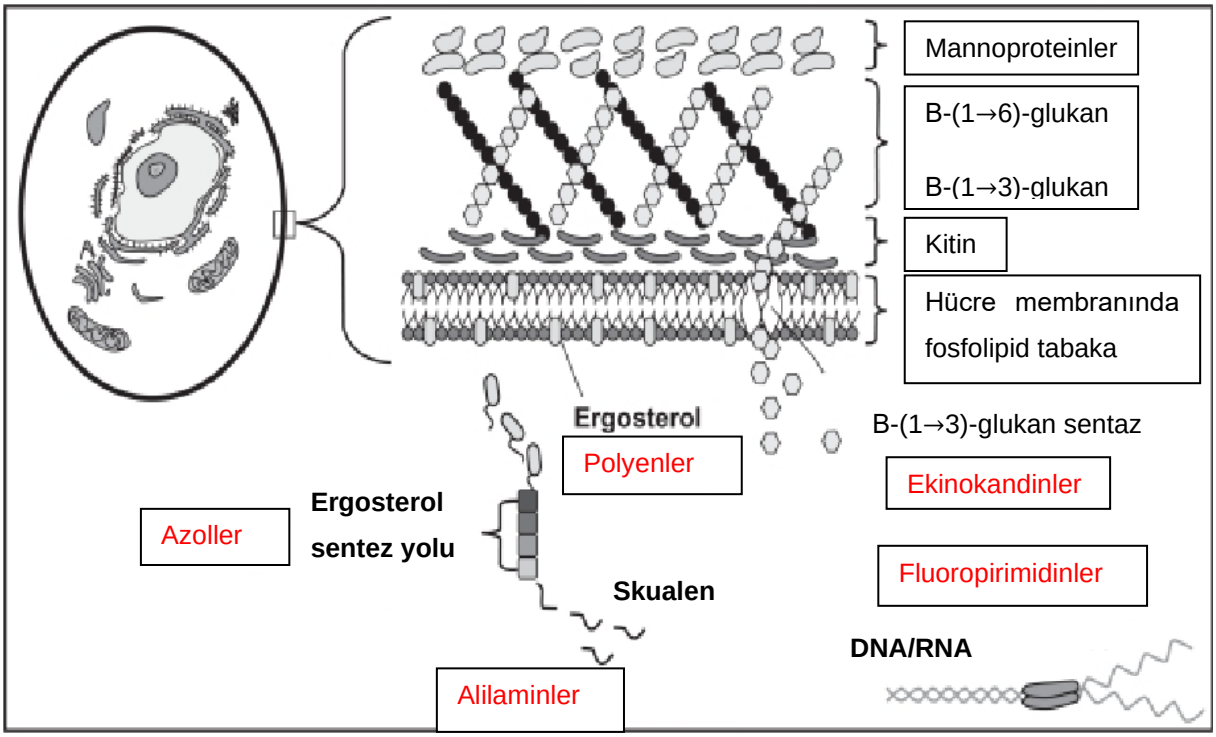
1.6. Aspergillus Enfeksiyonunda Tedavi

Bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastadaki İA tedavisi ile bağışıklık sistemi normal olan bireylerde görülen allerjik veya saprofitik tutulum durumlarındaki tedavi yaklaşımları birbirinden oldukça farklıdır. Bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastada, antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen dirençli ateş olması İA'dan şüphe edilmesi gereken bir durumdur. Bu hastalarda, hastalığın ilerleyişi oldukça hızlı olduğu için zaman kaybetmeden ampirik antifungal tedaviye başlanmalıdır (67). Çünkü tedavinin başarısı ne kadar erken başladığı ile yakından ilişkilidir. İTZ, PSZ, isavukonazol ve VOR gibi triazol antifungaller, KAS, anidilofungin ve mikafungin gibi ekinokandinler ve lipozomal AMB, İA tedavisinde klinik kullanıma sunulan ajanlardır. Tedavide kullanılan antifungaller tablo 4'de verilmiş ve bu ilaçların hedefleri şekil 6'da şematize

edilmiştir. *A. terreus* klinik olarak AMB'ye doğal dirençlidir, ancak diğer *Aspergillus* türleri de direnç geliştirebilmektedir (68,69).

Tablo 4: Aspergillozis tedavisinde kullanılan antifungal ilaçların sınıflandırılması (18,70,71)

Sınıf	**İlaç**	**Etki mekanizması**	**Veriliş yolu**	**Endikasyon**
Polyenler	AMB-deoksikolat AMB lipid kompleks Lipozomal AMB AMB kolloidal dispersiyon	Ergosterol üzerine etkilidirler, sitoplazmik zarın yapısal bütünlüğünü bozarlar	İntravenöz	Vorikonazol için alternatif bir seçenek olarak invaziv Aspergillozis primer tedavisi / kurtarma tedavisi
Triazoller	İtrakonazol	Sitokrom p450 aracılığı ile lanosterolün C-14 demetilizasyonunu inhibe ederler	İntravenöz/oral	Kronik Aspergillozis tedavisi / kurtarma tedavisi
	Vorikonazol		İntravenöz/oral	İnvaziv Aspergillozis primer tedavisi / kurtarma tedavisi
	Posakonazol		Oral	İnvazif fungal enfeksiyonların tedavisi / kurtarma tedavisi
	İsavukonazol		İntravenöz/oral	İnvaziv Aspergillozis primer tedavisi
Ekinokandinler	Kaspofungin Anidulafungin Mikafungin	(1,3)-β-D glukan sentetazın yarışmasız inhibisyonu ile hücre duvar biyosentezini engellerler	İntravenöz	Kurtarma tedavisi



Şekil 6: Sistemik antifungal ajanların hedefleri (72)

1.6.1. Klasik Amfoterisin B

AMB yaklaşık 60 yıldır kullanılmaktadır. *Streptomyces nodosus* tarafından üretilen bir polyendir. Fungus membran ve oligomerlerinde ergosterole bağlanarak, iyon kanallarının açılmasına, potasyum ve diğer hücre içi moleküllerin kaybına neden olarak fungisidal etki gösterir (73). AMB'nin ikinci bir etki mekanizması, hücre zarının lipoperoksidasyonuna bağlı bir dizi oksidatif reaksiyon yoluyla hücrenin oksidatif hasarını içerir. İntravenöz (IV) kullanım için, AMB, deoksikolat ile çözülmüştür. AMB, çoğu *Aspergillus* türüne karşı in vitro ve in vivo aktiviteye sahiptir. IV uygulamayı takiben, AMB ağırlıklı olarak retiküloendotelyal dokulara (karaciğer, dalak, kemik iliği ve akciğer) ve böbreklere dağılmadan önce yüksek oranda proteine bağlanır (22). Plazmadan temizlenmesi yavaştır, yarı ömrü 24-48 saattir ve terminal yarı ömrü 15 gündür. BOS'ta çoğunlukla saptanamayan konsantrasyonlara sahipken, AMB deoksikolat (D-AMB), kan-beyin bariyeri bozulmuşsa enfekte beyin dokusuna geçmesi sayesinde santral sinir sisteminin bazı mantar enfeksiyonlarının tedavisinde etkilidir. İnfüzyonla ilişkili olarak uygulama yerinde sertlik, ateş, titreme ve halsizlik

görülebilir. Ayrıca D-AMB ile nefrotoksisite, azotemi, idrarda potasyum ve magnezyum kaybı, renal tübüler asidoz ve bozulmuş idrar konsantrasyon yeteneği gibi yan etkiler de görülebilir (74). D-AMB'nin sürekli infüzyon yoluyla verilmesi ve AMB'nin lipid formülasyonlarının uygulanması ile tolere edilebilme oranı artar (75). *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Histoplasma* ve *Zygomyces* de dahil olmak üzere çoğu fungal patojenlere karşı etkilidir. Ancak *Candida lusitaniae*, *Scedosporium prolificans* ve *Aspergillus terreus* AMB'ye karşı doğal dirençlidir (76). Artık daha etkili ve daha az toksik ajanlar bulunduğu için D-AMB'nin, İA tedavisinde rolü azalmıştır (77).

1.6.2. Amfoterisin B Lipid Formülasyonları

Klasik AMB'ye ek olarak 3 farklı lipid formülasyonu geliştirilmiştir. Bunlar AMB lipid kompleks, AMB kolesterol sülfat, lipozomal AMB'dir. Avantajları günlük dozun arttırılabilmesi, retiküloendotelyal sistemde daha iyi dağılım göstermesi ve daha az toksik etki görülmesidir. Lipozomal AMB'nin farklı dozlarda uygulandığı çok merkezli bir çalışmada, AMB'nin doz ilişkili nefrotoksisitesi ve infüzyon ilişkili toksisitesi gözlenmemiştir (78).

1.6.3. Antifungal Trizoller

Antifungal triazoller bir izobutil çekirdeğine bağlı bir triazol halkası içeren (örn, VOR, ravukonazol ve izavukonazol) veya lipofilik kompleks fonksiyonel aromatik zincirli asimetrik karbon atomu içeren (örn., İTZ ve PSZ) sentetik bileşiklerdir. Bu iki anti-*Aspergillus* triazol sınıfı, farmakolojileri ve direnç mekanizmaları açısından farklılık gösterir (74).

Antifungal triazoller, fungal sitokrom P450'ye bağımlı lanosterol 14-α-demetilazı inhibe ederek ergosterol biyosentezini hedefler. Enzimin inhibe olması, hücre zarı fonksiyonunu değiştirir ve hücre ölümü veya hücre büyümesi ile replikasyonunun inhibisyonuyla sonuçlanır. Triazoller ayrıca, fungal solunum zincirinin sitokrom P450'ye bağımlı enzimlerini de inhibe eder. Genellikle tüm yaygın *Aspergillus* türleri, bu anti-*Aspergillus* triazollerine karşı in vivo ve in vitro duyarlı bulunmuştur. Fakat, flukanozol *Aspergillus* türlerine karşı etkili bulunmamıştır (74,79). Ayrıca son zamanlarda *A. fumigatus*'un bazı izolatlarına karşı İTZ için direnç saptanmış olup direnç oranlarının gittikçe arttığı gözlemlenmiştir (74).

1.6.3.1. İtrakonazol

İTZ, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., dermatofitler, *Histoplasma* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Fonsecaea* spp., *Cladosporium* spp., *Blastomyces dermatitidis* ve çeşitli diğer mantar türlerine karşı in vitro etkili bir triazol antifungaldir. Etkisini 14-α-demetilaz inhibisyonu yoluyla gösterir. *Aspergillus* türlerine karşı İTZ'nin in vitro aktivitesi oldukça benzerdir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda, azole duyarlı hastalardan elde edilen izolatlar da dahil, giderek artan kazanılmış direnç bildirilmiştir (74,80).

Alerjik bronkopulmoner aspergilloz ve allerjik aspergilloz sinüzitinin tedavisinde İTZ ilk seçenek olmakla birlikte kronik kaviter pulmoner aspergilloz tedavisinde ise alternatif şeçeneklerdendir. İA'nın preemptif ve ampirik antifungal tedavi alternatifleri arasında önerilmektedir (22,74).

1.6.3.2. Vorikonazol

İA'lı hastaların tedavisi için lisans verilen antifungal ilaçların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Son zamanlara kadar polyenler İA tedavisi için 'altın standart' olarak kabul edilmekteyken, klinik araştırmalar bir triazol olan VOR'un üstün bir etkinlik sergilediğini göstermiş ve klinisyenleri ilk basamak tedavi olarak VOR kullanmaya teşvik etmiştir (15).

VOR, genişletilmiş spektrumlu ikinci jenerasyon flukanozolun sentetik bir türevidir. Maya ve küf mantarlarına karşı geniş in vitro aktiviteye sahiptir. Mayaların çoğunluğuna karşı fungistatik aktivite gösterirken, bazı flamentöz mantarlara karşı ise fungisidal aktivite gösterir. Hem intravenöz (iv) hem oral yolla verilebilir ve biyoyararlanımı oldukça iyidir (81).

Oral veya iv VOR uygulamasından sonra bildirilen en sık yan etkiler, görsel bozukluklar, hepatik anormallikler ve cilt reaksiyonlarıdır. Görme bozuklukları (artmış ışık algısı, bulanık görme, fotofobi veya renkli görmedeki değişiklikler) genellikle hafif ve orta şiddettedir (82).

1.6.3.3. Posakonazol

PSZ, akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom ve graft versus host hastalığı gelişen kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda İA için profilakside onaylanmış olup ayrıca invaziv fungal enfeksiyonlarda alternatif tedavi seçeneği

olarak da onay almıştır. PSZ'nin sadece oral formu bulunmaktadır (22).

Kronik kaviter akciğer aspergillozisi olan hastalarda, progresif akciğer fonksiyon kaybı varsa altı ay antifungal tedavi alınması savunulmuştur. Bunlar arasında oral İTZ, VOR veya üçüncü seçenek olarak PSZ önerilmiştir (22).

1.6.3.4. İsavukonazol

Yeni bir triazol ajanı olan isavukonazol, oral veya iv bir formülasyon olarak ön ilaç şeklinde uygulanır (71). FDA tarafından İA ve mukormikoz tedavisinde onay almıştır (83). SECURE, çalışmalarında İA tedavisinde isavukonazol'ün, VOR kadar etkili olduğunu aynı zamanda ilaç ilişkili yan etkilerin daha az ortaya çıktığı ve daha iyi bir güvenlik profili olduğunu saptamıştır (84). 'The European Conference on Infections in Leukemia' (ECIL 6) rehberi de İA'nın birinci basamak tedavisinde VOR veya isavukonazol kullanımını önermektedir (85).

1.6.4. Ekinokandinler

Ekinokandinler, bir çok patojenik mantarın hücre duvarında bulunan (1,3)-β-D glukan sentetazın non-kompetatif inhibitörleri şeklinde hareket ederek hücre duvar sentezini engellerler. Farklı etki mekanizmaları nedeniyle, ekinokandinler, şu anda mevcut olan standart antifungal ajanlarla kombinasyon rejimlerinde kullanım potansiyeline sahiptir. Mevcut tüm ekinokandinler sadece IV uygulama için uygundur. Günde bir kez uygulanırlar, 10-15 saatlik yarı ömüre sahip olmalarıyla birlikte dozla orantılı plazma farmakokinetiği sergilerler. KAS ve mikafungin karaciğer tarafından metabolize edilir ve yavaş yavaş idrar ve dışkıyla atılır. Anidulafungin, plazmada enzimatik olmayan bir şekilde yavaş yavaş bozunur ve daha sonra hepatik olarak atılır. Araştırılan dozlarda, tüm ekinokandinler genellikle iyi tolere edilir (8).

KAS, diğer onaylanmış tedavilere dirençli veya toleranssız olan muhtemel veya kanıtlanmış İA'lı hastalarda endikedir. Mikafungin ve anidulafungin, *Aspergillus* türlerine karşı aktiviteye sahiptir, ancak İA için onaylanmamışlardır ve bu ilaçlar için optimal dozlar saptanmamıştır. Anidulafungin deneysel pulmoner aspergillozda etkin olmasına rağmen, İA tedavisinde kullanımını açıklayan az çalışma bulunmaktadır (8,22).

Ekinokandinler, daha az hepatotoksisite ve nefrotoksisite göstermesi ve ilaç ilaç etkileşiminin nadir görülmesi nedeniyle daha iyi bir güvenlik profiline sahiptir (86).

1.7. Antifungallere Direnç Gelişimi

Mikrobiyologlar ve klinisyenler, hala in vitro antifungal duyarlılık test sonuçlarını yorumlamada zorluk yaşamaktadırlar. MİK değerleri her zaman antifungal tedaviye yanıtla ilişkili bulunmamıştır. İn vivo ve in vitro veriler arasında uyumsuzluk bulunmakta olup, in vitro duyarlı suşların neden olduğu enfeksiyonların %90'ında uygun tedaviye yanıt alındığı, buna karşın in vitro dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların %60'ında tedaviye yanıt alındığını savunan 90-60 kuralı gösterilmiştir. Bu kural, in vivo ve in vitro verilerin uyumsuz olduğuna işaret etmez; sadece MİK değerlerinin klinik sonucu yalnızca belirli bir dereceye kadar etkilediği gerçeğini vurgular (87,88).

Aspergillus fumigatus, insanlarda enfeksiyona neden olan en yaygın tür olup yabani tip izolatlar, piyasadaki tüm küf aktif azollere ve ekinokandinlere duyarlıdır. Fakat, *A. fumigatus* tür kompleksi, morfolojik olarak birbirinden veya *A. fumigatus*'tan ayırt edilemeyen 30'dan fazla kardeş türü içerir. Bunların birçoğu insanlardan alınan izolatlardır ve bir veya daha fazla antifungale doğal olarak dirençli oldukları gösterilmiştir. *A. terreus*'ta doğal AMB direnci uzun yıllardır bilinmekle birlikte *A. flavus* ve diğer daha az yaygın türlerin de AMB duyarlılığı azalmıştır. Ayrıca, bu nadir *Aspergillus* türlerinin bir kısmı aynı zamanda azollere ve ekinokandinlere de dirençlidir. Bu nedenle, klinik olarak önemli izolatlar için dikkatli tür tanımlaması zorunludur (87,89).

1.7.1. Polyenlere direnç

Polyenlere karşı direnç mekanizmaları, membran sterollerindeki değişiklikleri, oksidatif hasara karşı savunma mekanizmalarını, ergosterol biyosentez genlerindeki hataları, hücre zarının yağ asidi bileşimi gibi faktörleri ve sterol/fosfolipid oranındaki değişiklikleri içerir. Plazma zarının sterol içeriğindeki değişiklikler farklı şekillerde meydana gelir. Polyen bağlayıcı sterollerin bazıları veya tümü, polyenleri daha az bağlayan fekosterol veya episterol gibi sterol ara ürünleri ile yer değiştirebilir. Ergosterol biyosentetik yolundaki veya *ERG* genlerindeki genetik değişikliklerin, polyenlere ve azollere duyarlılığı azalttığı gösterilmiştir (90).

Aspergillus terreus'da AMB direnci, daha çok AMB'nin hücre içine geçişinin azalmasına ve bu türlerin AMB'nin oksidatif hasarına karşı daha fazla koruma sağlamasına bağlanmıştır. Ergosterol içeriğinin dirençte minor rol oynadığı bulunmuştur (91).

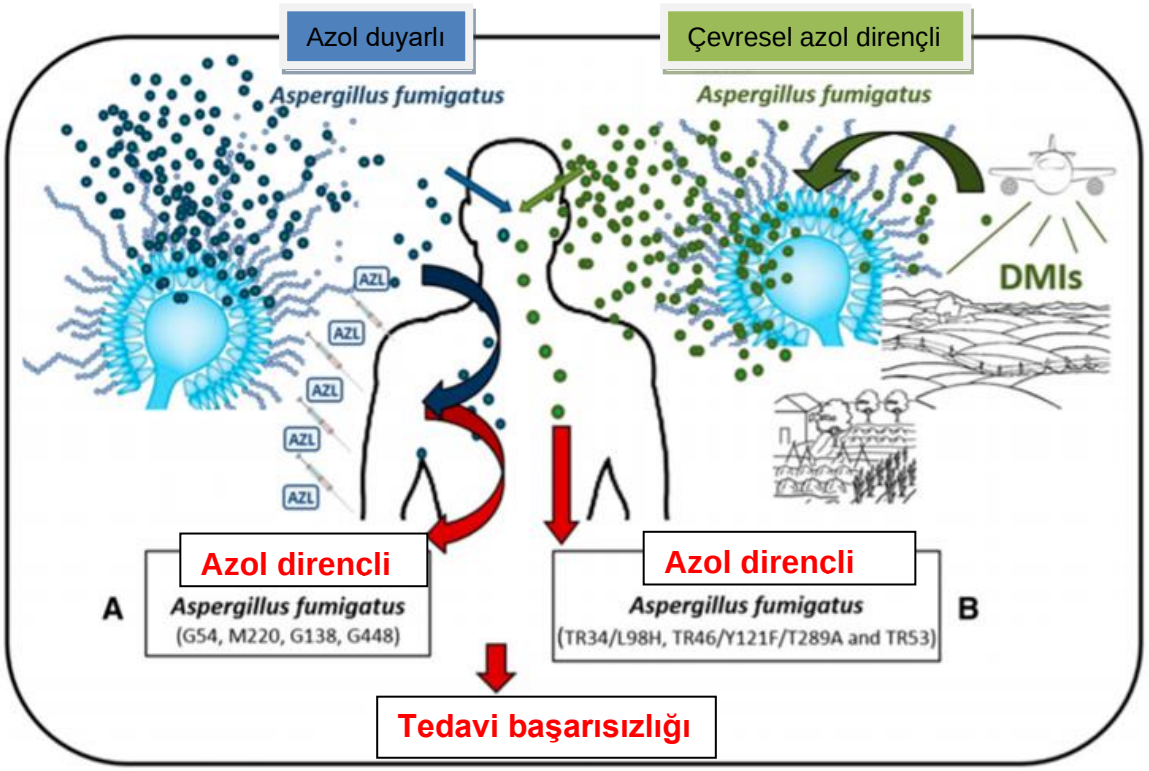
1.7.2. Azol Direnci

Azoller, çoğu *Aspergillus* enfeksiyonunun ilk basamak tedavisini oluşturduğundan, azol direnci, aspergilloz tedavisiyle ilgili, en önemli klinik endişelerdendir. Aynı zamanda bu ilaçlar, tarımda da hasat öncesi ve sonrasında mahsülü fitopatojenik küflere bağlı mantar hastalıklarından ve bozulmalarından korumak için sıkça kullanılmaktadır. Hem klinik ortamda hem de çevrede artan direnç, klinik ve tarımsal azol ilaçlarının *Aspergillus* türlerine karşı etkinliğini tehdit etmektedir (92).

Aspergillus türlerinde azol direnci ilk kez 1997-98 yıllarında ABD de uzun süreli İTZ tedavisi alan hastalarda bildirilmiştir. Azol direncinin sıklığı son on yılda artmış ve Avrupa ülkelerinde (örneğin Avusturya, Belçika, Danimarka, Fransa, Almanya, Hollanda, Norveç, İspanya ve Türkiye) triazol dirençli *A. fumigatus* enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (93,94).

A. fumigatus enfeksiyonlarında direnç mekanizmasının gelişimi için iki yol tanımlanmıştır. Uzun süreli azol tedavisi alan hastalarda gelişen tıbbi yol ve tarımda demetilasyon inhibitörü (DMI) ajanların kullanımına bağlı oluşan çevresel yoldur (Şekil 7) (95).

A. fumigatus izolatlarında çeşitli direnç sonuçları yayınlanmıştır. Bunlar genotipik olarak incelendiğinde dirence, ilacın hedef enzimi olan 14-α demetilazı kodlayan *cyp51A* genindeki nokta mutasyonların (L98H) neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca genin promotor bölgesindeki 34 aminoasitlik bölümün çift kopya oluşunun da rolü bulunmaktadır. Bu direnç mekanizması, ‘TR34/L98H’ olarak adlandırılmıştır (96). Son zamanlarda TR34/L98H mutasyonuna ek olarak TR46/Y121F/ T289A mutasyonunun da dirence neden olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların görüldüğü vakalar çoğunlukla VOR direnci ile ilişkilendirilmiştir (97).



Şekil 7: *A. fumigatus'*un azol direnci kazanma yolları

A: hasta üzerinden; hastaya azol duyarlı *A. fumigatus* izolatının bulaşması sonrasında hastanın tedavi sırasında *cyp51A* nokta mutasyonu gelişimi sonucu dirençli izolatı edinmesi B: çevre üzerinden; hasta çevreden dirençli *A. fumigatus* suşlarını alır ve bu suşlar kombine direnç mekanizması içerir (95).

1.7.3. Ekinokandinlere direnç

Genel olarak ekinokandinlere direnç daha çok *Candida* türlerinde bildirilmiştir. *FKS* genlerinin sıcak nokta bölgelerindeki mutasyonlarının *Candida* türlerine direnç kazandırdığı belirtilmiştir (98). Bu mutasyonlar, hedef enzim olan glukan sentazda amino asitlerin yer değiştirmelerine neden olur ve bu şekilde ilacın bağlanma afinitesi değişir. Bu durum da ilaç direnci ve klinik başarısızlık ile sonuçlanır. *FKS* sıcak nokta bölgelerindeki mutasyonlar, tüm ekinokandin sınıfı ilaçlara çapraz direnç kazandırır (99).

Aspergillus enfeksiyonlarının tedavisinde ekinokandinlerin sınırlı kullanımı nedeniyle, *A. fumigatus*'da ekinokandin direncinin mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Yakın zamanda, kronik pulmoner aspergillozlu bir hastadan izole edilen ilk ekinokandin dirençli *A. fumigatus* klinik olgusu bildirilmiş olup izolatın, *fks1* geninin korunmuş sıcak nokta bölgesinde, *Candida* direncinde görülenle

karşılaştırılabilir bir mutasyon olduğu gösterilmiştir. Ekinokandin tedavisi başarısız olan kronik pulmoner aspergillozlu hastalarda, *fks1* geninde mutasyon içermeyen izolatlar saptanmış, bu da yeni bir direnç mekanizmasının olabileceğini düşündürmüştür. Bu yeni direnç mekanizması, KAS'a maruz kalma sırasında hücrelerde oluşan ve ayrıca in vitro olarak ekinokandinlere karşı doza bağlı bir duyarsızlık gösteren değiştirilmiş bir glukan sentaz formudur. *Aspergillus* türlerinin üremesi sırasında KAS'a maruz kalma, plazma membranında değiştirilmiş bir lipid bileşimini indüklemiş ve bu da glukan sentazın mikroçevresinde onu ilaca duyarsız hale getiren bir değişikliğe neden olmuştur. Bu direnç mekanizması, lipid biyosentezini değiştiren hücresel sinyal gibi hareket eden mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini içeren hücrelerde KAS'ın hedef dışı bir etkisi olarak tanımlanmıştır (100).

Özetle, ekinokandin direncinin hem *fks1* mutasyonuna bağımlı hem de *fks1* mutasyonundan bağımsız mekanizmaları *Aspergillus* enfeksiyonlarının klinik başarısızlığına yol açabilir (100).

1.8. Antifungal Duyarlılık Testleri

Sistemik mantar enfeksiyonlarının insidansının artmasıyla antifungal ajanların sayısı da artmıştır. Buna bağlı antifungal tedavi seçimine yol gösteren laboratuvar uygulamaları daha da önem kazanmaya başlamıştır.

Standart geliştirme kuruluşları antifungal duyarlılık testi olarak standardize edilmiş üç yöntem tanımlamıştır: sıvı dilüsyon, DD ve azol grubu için agar tarama testi. Yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler arasında ise GD ve hızlı otomatik cihazlar yer alır.

CLSI, nondermatofit küfler için inokulum yoğunluğu, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, besiyeri içeriği ve MİK tayini gibi kriterleri belirlemiştir. 2002 yılında M38-A klavuzunda küf mantarlarının antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek için SMD yöntemi tanımlanmıştır. 2008 yılında güncellenen M38-A2 belgesinde, küf izolatları için kalite kontrol (KK) verileri ve ekinokandin test klavuzu eklenmiştir (12). 2010 yılında da M51-A klavuzunda DD yöntemi tanımlanmıştır (13).

1.8.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Hem CLSI hem EUCAST SMD yöntemi için standartlara sahiptir. Bu protokoller mayalar için uygulanan protokollerle benzerlik göstermekle birlikte, bazı değişiklikler

bulunmaktadır.

CLSI M38-A2 klavuzunda, invaziv hastalığa neden olan küfler için AMB, triazoller ve ekinokandinler için SMD test prosedürü açıklanmaktadır. Canlı konidya ve sporangiyosporlardan 0.4-5 x 10^4 KOÜ/mL aralığında sıvı RPMI 1640 besiyeri (L-glutaminli, bikarbonatsız, fenol kırmızılı, MOPS tamponlu) ile inokulum hazırlanır. İnokulum türbiditesi spektrofotometrede 530 nm de, *Aspergillus* spp.*, Paecilomyces lilacinus, Paecilomyces variotii, Exophiala dermatitidis* ve *Sporothrix Schenckii* için 0.09-0.13, *Fusarium* spp., *Scedosporium apiospermum, Ochroconis gallopava, Cladophialophora bantiana, Rhizopus oryzae* ve diğer *Zygomycetous* türleri için 0.15-0.17, *Bipolaris* spp. ve *Alternaria* spp. 0.25-0.3 olarak belirlenmiştir. İlaç dilüsyonları, test konsantrasyonlarının (AMB ve azoller, 0.03 ila 16 µg/mL ve ekinokandinler, 0.015 ila 8 µg/mL) iki katı olacak şekilde dilüsyon basamakları izlenerek hazırlanır. U tabanlı mikroplaklar kullanılır. Hazırlanan tüm SMD plakları 35°C'de inkübe edilir, inkübasyon süreleri de ilaç ve türlere göre değişkenlik göstererek 16 ile 72 saat sonrasında incelenir. Küflere karşı AMB, İTZ, PSZ, ravukonazol ve VOR için MİK değeri, tam üreme inhibisyonu (%100) gösteren görülebilir herhangi bir büyümeyi önleyen en düşük ilaç konsantrasyonudur. KAS için de minimal efektif konsantrasyon (MEK) değeri tanımlanmıştır. MEK değeri ilaçsız kontroldeki hifal üreme ile karşılaştırıldığında küçük, yuvarlak, sıkı mikrokolonilerin olduğu en düşük ilaç konsantrasyonudur (12,101). (Tablo 5)

Tablo 5: CLSI M38-A2 klavuzuna göre filamentöz mantarlar için SMD yöntemi ile antifungal duyarlılık testi (12,101)

Parametreler	Tanımlamalar
Konidyal büyüme için besiyeri	Patates dextroz agar, 35° C (7 gün veya iyi sporulasyon görülene kadar)
İnokulum morfolojisi	Konidya veya sporangiyospor
Stok inokulum için önerilen OD aralığı	*Aspergillus* spp*, Paecilomyces* spp*, Rhizopus oryzae* ve diğer zygomycetes türleri, 0.09-0.13; *Fusarium* ve *Scedosporium boydii*, 0.15-0.17; *Alternaria* spp ve *Bipolaris* spp,0.3
Test inokulumu (iki katı)	$0.4x10^4$-$5x10^4$ KOÜ/ml veya stok solüsyonun 1:50 dilüsyonu (*S. boydii*, 1:25)
Test ortamı	RPMI 1640; pH 7.0 ± 0.1
Format	Mikrodilüsyon değerlendirme; toplam volüm, 200 µl
İlaç dilüsyon aralığı	AMB ve triazoller, 0.03-16 µg/ml; ekinokandinler, 0.015-8.0 µg/ml
MİK inkübasyon koşulları: AMB ve triazoller	*Rhizopus oryzae* ve diğer Mukorales ailesi➔ 24 saat; *Alternaria* spp*, Aspergillus* spp*, Bipolaris* spp*, Exophilia* spp*, Exserohilum* spp*, Fusarium* spp*, Paecilomyces lilacinus, Trichoderma longibrachiatum, Sporothrix schenckii* ve *Wangiella dermatitis*➔ 48 saat; *Cladophialophora bantiana, Ochroconis gallopava, Scedosporium boydii* ve *Scedosporium prolificans* ➔ 72 saat, 35◦C
MEK inkübasyon koşulları: ekinokandinler	*Aspergillus* spp, *Fusarium* spp. ve *Paecilomyces* spp., 21-26 saat; *Scedosporium* spp., 46-72 saat veya ilk gün kuyucukta 35°C de yeterince üreme olması
MİK görsel değerlendirme: AMB ve triazoller	Herhangi görünür büyümeyi önleyen ilaç konsantrasyonu
MEK görsel değerlendirme; ekinokandinler	İlaçsız kontroldeki hifal üreme ile karşılaştırıldığında küçük, yuvarlak, sıkı mikrokolonilerin olduğu en düşük ilaç konsantrasyonu
Kalite kontrol izolatları	*Paecilomyces variotii* ATCC MYA-3630, *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, *Candida krusei* ATCC® 6258

EUCAST E def. 9.3.2 en son 2020 yılında güncellenen klavuz olup CLSI klavuzu ile arada bazı farklılıklar dikkat çekmektedir. Bu farklılıklar Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: CLSI M38-A2 klavuzu ile EUCAST E.Def 9.3.2 klavuzunun karşılaştırılması (12,102)

Özellik	CLSI M38-A2	EUCAST E.Def 9.3.2
Uygulanacak türler	Konidyum oluşturan küf mantarları	Konidyum oluşturan küf mantarları
İnokulum	0.4-5 x 10^4 KOÜ/ml	1-2.5 x 10^5 KOÜ/ml
İnokulum standardizasyonu	Spektrofotometrik	Hemositometrik
Besiyeri	RPMI 1640 (%0.2 glukoz içerir)	RPMI 1640 (%2 glukoz içerir)
Mikrodilüsyon plağı	U tabanlı	Düz tabanlı
Sıcaklık	35°C	35°C
İnkübasyon süresi	48 saat	24-48 saat
Sınır değer	Azol ve polyenler için üreme olmayan kuyucuk MİK, ekinokandinler için MEK	Azol ve polyenler için üreme olmayan kuyucuk MİK, ekinokandinler için MEK

CLSI tarafından referans SMD yöntemi standart olarak kabul edilmiş olsa da bu yöntem, rutindeki laboratuvarlarda kullanımı zor, yoğun iş gücü ve tecrübe gerektirdiği için daha kolay uygulanabilecek yöntemler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla DD, GD, agar dilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, çeşitli ticari sistemler, flow sitometri gibi uygulamalar denenmektedir (12,103).

1.8.2. Disk Difüzyon

DD yöntemi, duyarlılık testine yönelik en eski yaklaşımlardan biridir ve birçok klinik laboratuvarda, özellikle kaynağın sınırlı olduğu ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. DD testi ucuz, tekrarlanabilir ve yorumlanması kolaydır (104).

DD yöntemi, sabit bir antifungal ilaç konsantrasyonu içeren ticari olarak hazırlanmış kağıt disklerin kullanımını içerir. İnhibisyon bölgesi olarak adlandırılan disk çevresinde üretilen klirensin çapı, ilacın agar ortamından difüzyon hızı ve izolatın bu ilaca duyarlılığı ile ilgilidir. Zon çapları, belirli bir mantar-antifungal kombinasyonu için MİK değerleriyle ilişkilendirildiğinde, yorumlanarak kategorilere çevrilebilirler.

CLSI Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi, filamentli mantarları AMB, KAS,

İTZ, PSZ ve VOR ile test etmek için bir DD yöntemi geliştirmiştir (13). Klinik eşik değerleri belirlenmemiştir fakat, zon çapları ile MİK ve MEK değerleri karşılaştırılarak geçici epidemiyolojik sınır değerler (ECV) belirlenmiştir . ECV'ler, vahşi tip dağılım ile karşılaştırıldığında, test edilen ajana karşı duyarlılığı azalmış olan izolatları saptamak için kullanılır. ECV'ler klinik eşik değerler olarak değil, daha çok kazanılmış direnç mekanizmalarına sahip olması muhtemel izolatları tespit etmek için kullanılır. DD yönteminin önemli bir avantajı, SMD yöntemi ile 24 ila 72 saatte saptanabilecek sonuçların, bu yöntem kullanılarak genellikle 16 ila 48 saatlik inkübasyon sonrasında kalitatif olarak belirlenebilmesidir (13,105).

Önceki çalışmalarda % 2 glikoz veya % 0.5 metilen mavisi boya eklenmiş MHA önerilirken şu an çoğu küf türünün daha iyi büyümesini desteklediği, antifungal aktiviteye müdahale etmediği ve ulaşılabilirliğinin kolay olması nedeniyle saf MHA önerilmektedir (13).

1.8.3. Gradient Difüzyon Yöntemi

SMD ve DD yöntemine alternatif olarak kullanılan bu yöntemde, GD şeritlerinin kullanılmaktadır. Bunlar, önceden tanımlanmış, kurutulmuş bir antifungal ilaç gradienti içeren ince plastik veya nitroselüloz şeritlerdir. Çeşitli konsantrasyonlarda antimikrobiyal emdirilerek kalibre edilmiş bu plastik stripler, mikroorganizmanın inoküle edildiği agarlı besiyerine yerleştirilerek, 24 ile 48 saat boyunca inkübe edilir. Bu sırada antifungal ilaç, agar içine yayılır. Test, elips şeklindeki mantar büyümesinin şerit ile kesiştiği noktayı işaretlemek için inhibisyon bölgesi kullanılarak okunur ve bir MİK değeri gösterir. En yeni triazol ilaç olan isavukonazol dahil tüm onaylı antifungal ilaçlar için şeritler mevcuttur. Kullanım kolaylığına ek olarak, GD şeritlerinin DD'a göre sahip olduğu bir avantaj, bir MİK değeri verecek şekilde antifungal duyarlılığı ölçebilme yeteneğidir (14).

GD yöntemi, küf mantarlarında alternatif bir yöntem olarak kullanılmaya başlamıştır. Basit bir şekilde yapılması büyük avantaj sağlarken pahalı olması rutin labotuvarların ulaşılabilirliğini kısıtlamaktadır. GD yöntemi için farklı araştırmacılar farklı besiyerleri ile çalışmalar yapmıştır. Bunlardan bazıları; RPMI 1640 agar, casitone agar ve %2 glikozlu MHA ile saf MHA'dır. Bunlar arasında, referans SMD yöntemi ile en iyi korelasyonu RPMI 1640 agar göstermiştir (106–108).

Yapılan çalışmalarda AMB, İTZ, VOR gibi antifungaller için referans yöntemler karşılaştırıldığında % 90 ve üzerinde uyum saptanmıştır (109,110). Fakat GD testi ile

ilgili yayınlanmış bir klavuz yoktur.

1.8.4. Diğer Yöntemler

1.8.4.1. Aspergillus Azol Direnci için Agar Tarama Yöntemi

EUCAST, yakın zamanda, dört oyuklu bir agar tarama plakası (E.DEF 10.1) kullanarak *Aspergillus* izolatlarında azol direncinin belirlenmesi için bir standart geliştirmiştir. Test, İTZ (4 g/ml), VOR (2 g/ml) ve PSZ (0.5 g/ml) içeren oyuklara sahip bir RPMI 1640 agar plakası ve ilaçsız bir oyuktan oluşur. *Aspergillus* konidyaları plakaya izole edilir ve 48 saat izlenir. Duyarlı saptanan izolatlar bu şekilde rapor edilebilir, ancak büyüme kontrolünün yanında herhangi bir kuyudaki üreme, direncin mevcut olabileceğinin göstergesidir ve SMD yöntemi ile doğrulanmalıdır (111,112).

1.8.4.2. Kolorimetrik Sıvı Mikrodilüsyon Panelleri

Sensititre YeastOne kolorimetrik antifungal panel (Thermofisher, Amerika Birleşik Devletleri), ticari olarak hazırlanmış bir SMD plakasıdır. Diğer SMD formları gibi, YeastOne paneli de tanımlanmış ortamda antifungal ilacın seri seyreltilerini içeren 96 kuyulu bir mikroplakadan oluşur. Bu kuyular kolorimetrik büyüme göstergesi resazurin içerir. Bu nedenle mantar büyümesi ve MİK belirlenmesi, belirli bir büyüme miktarından ziyade kuyudaki renk değişikliğine dayanır. Mikroplakların, oda sıcaklığında yaklaşık 24 ay raf ömrüne sahip olması ve ayrı ayrı paketlenmesi nedeniyle testin seyrek yapıldığı bir klinik laboratuvarda kullanımı için idealdir. Sensititre YeastOne, filamentöz mantarlarla kullanılmak üzere tasarlanmamış veya önerilmemiştir, ancak yararlı olabileceğini gösteren birkaç çalışma vardır (14).

1.8.4.3. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, antifungal duyarlılık testinde kullanılmak üzere değerlendirilmiş mevcut bir teknolojidir. Antifungal ilacın seri bir şekilde seyreltilmesi ve mantar hücrelerinin floresan bir boya ile boyanmasının ardından, bir akış sitometresi kullanılarak hücrelerin floresanları ölçülür. Boyama için propidyum iyodür, akridin turuncusu ve etidyum bromür gibi çeşitli florokrom boyalar kullanılmaktadır. Bu yöntem, referans antifungal duyarlılık testleriyle karşılaştırıldığında , *Candida* spp. ve birçok farklı tür ve birden fazla antifungal ilaç için umut verici verilerle sonuçlanmıştır. Fakat birkaç saat içinde sonuç alınması büyük bir avantaj olmasına rağmen, yoğun emek ve yüksek teknisyen tecrübesi gerektirmesi aynı zamanda

kaynağa ulaşımın zor olması nedeniyle pratik bir yöntem değildir. Bu nedenle rutin kullanımdan ziyade araştırma amaçlı kullanılan bir yöntemdir (14).

1.8.4.4. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Kütle Spektrometresi

MALDI-TOF MS, bakteri ve mantarların tanımlanmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarında önemli bir yere sahiptir (113). Bu teknoloji, antifungal duyarlılık testlerini uygulamak için de araştırılmıştır. Genel olarak, bir izolat bir antifungal ilaç konsantrasyonuna maruz bırakılır. Ardından MALDI-TOF MS ile analiz edilir ve ilaçsız bir kontrole kıyasla proteomdaki herhangi bir değişiklik, antifungal kaynaklı hasarın bir göstergesi olarak yorumlanır (114).

Bu yöntemi araştıran bir çalışmada, *Candida albicans,* flukonazolün seri seyreltileri ile test edilmiştir. Bu çalışmada, kütle spektrum profilinde önemli bir değişikliğe neden olan en düşük ilaç konsantrasyonu olan ve minimum profil değişiklik konsantrasyonu olarak adlandırılan değerin, CLSI tarafından saptanan MİK değerleri ile iyi korelasyon gösterdiği bulunmuştur (115).

Duyarlılık testinde kullanılmak üzere MALDI-TOF MS geliştirmenin potansiyel avantajı, görsel okumada var olan öznelliğin ortadan kaldırılmasıdır (14).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada**,** 2006-2018 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Mikoloji birimine gönderilen solunum yolu örnekleri (balgam, trakeal sekret, bronşlavaj, BAL) ile yara, doku, plevral ve peritoneal sıvı gibi sistemik örneklerden izole edilen ve etken olarak kabul edilen, stoklanmış 62 *A. fumigatus*, 28 *A. flavus* ve 16 *A. terreus* izolatı olmak üzere toplam 106 adet suş yer aldı.

Daha önce rutin işlemler sırasında tanımlanmış olan *Aspergillus* izolatları araştırmamız öncesinde tekrar tanımlandı. Bu amaçla tüm suşların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOF MS yöntemi kullanıldı. Suşların tamamında CLSI M38-A2'de önerilen standart SMD yöntemi, CLSI M51-A'da önerilen DD yöntemi ve üreticinin talimatlarına göre GD yöntemiyle AMB, İTZ, VOR ve KAS'e karşı antifungal duyarlılık araştırıldı.

Belirtilen duyarlılık yöntemleri uygulanırken araştırmada yer alan izolatlarla birlikte KK suşu olarak, CLSI M38-A2 de önerilen *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 ile *C. albicans* ATCC 90028 çalışıldı. CLSI M38-A2 de önerilen KK izolatlarının MİK aralıkları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: CLSI M38-A2 referans yöntemine göre KK izolatlarının MİK aralıkları (12)

Standart suşlar	Antifungal ilaç	MİK aralığı (24 saat)	MİK aralığı (48 saat)
Candida parapsilosis ATCC® 22019	AMB	0.25-2.0	0.5-4.0
	İTZ	0.06-0.5	0.12-0.5
	VOR	0.016-0.12	0.03-0.25
	KAS	0.25-1.0	0.5-4.0
Candida krusei ATCC® 6258	AMB	0.5-2.0	1.0-4.0
	İTZ	0.12-1.0	0.25-1.0
	VOR	0.06-0.5	0.12-1.0
	KAS	0.12-1.0	0.25-1.0

2.1. İzolatların tanımlanması

2.1.1. Geleneksel yöntemler

İzolatlar ilk stoklardan SDA besiyerine (Liofilchem, İtalya) pasajlanarak canlandırıldı. SDA'da saf olarak izole ettiğimiz küf kolonileri çalışmaya alındı. Üreyen kolonilerin ilk olarak makroskobik özellikleri değerlendirildi. Daha sonra üreyen koloniden PDA'ya lam kültürü yapılarak kolonin pigmentasyon gelişimi ve mikroskobik görünümü incelendi.

2.1.1.1. Makroskobik özellikler

Makroskobik olarak mavi-yeşil renkte süet benzeri yüzeye sahip koloniler *Aspergillus fumigatus* lehine, önce beyaz–sarı sonrasında yeşile dönen koloniler *Aspergillus flavus* lehine, kum–kahverengi, tarçın renginde süet benzeri yüzeye sahip koloniler *Aspergillus terreus* lehine yorumlandı (30).

2.1.1.2. Mikroskobik özellikler

Mikroskobik olarak bölmeli hiflere sahip olan, dallanmayan konidyofor yapıları bulunan, konidyoforların ucunda vezikül adlı yapıyı bulunduran, vezikülden fiyalid

yapıları çıkan ve fiyalidlerin ucunda da yuvarlak yapılı konidya zincirlerine sahip koloniler *Aspergillus spp.* olarak değerlendirildi (30).

Konidyoforları kısa, düz olup konidyoforlardan çıkan fiyalidler tek sıralı ve vezikülün üst 2/3'ünü kaplıyorsa izolat *A. fumigatus* olarak değerlendirildi (30).

Konidyoforları düzensiz, çukurlu veya dikenli yapıda olup konidyofordan çıkan fiyalidleri tek veya iki sıralı şekilde vezikülün tamamını kaplıyorsa izolat *A. flavus* olarak değerlendirildi (30).

Konidyoforları kısa, düz olup fiyalidleri iki sıralı, vezikülü kolumnar şekilde kaplıyorsa izolat *A. terreus* olarak değerlendirildi (30).

2.1.1.3. 45°C'de Üreme Testi

Aspergillus izolatları SDA'ya ekilerek 45° C'de inkübe edildi. 45°C'de üreyen koloniler *A. fumigatus* lehine değerlendirildi.

2.1.2. MALDI-TOF MS

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *Aspergillus* izolatları MALDI-TOF MS yöntemiyle de aşağıdaki basamaklar uygulanarak tanımlandı.

2.1.2.1. Hedef plakasına örnek uygulama

Plakta üreyen kolonilerde sporların hif yapıları ile birleştiği yerden kürdan yardımıyla çizgi şeklinde sürülerek koloniler alındı. Seçilen koloniler ince bir tabaka halinde hedef plakasına sürüldü ve ardından örneğin üzerine hazırlamış olduğumuz %70'lik formik asit çözeltisinden 1 µL damlatıldı. Oda sıcaklığında kuruması beklenip, 1 µl matriks çözeltisi damlatıldı. Matriks çözeltisinin oda sıcaklığında kuruması beklendi. Hazırlanan hedef plakası analiz için MALDI-TOF MS cihazına (Bruker MALDI BIOTYPER, Almanya) yüklendi.

2.1.2.2. Değerlendirme

Cihaza yüklenen hedef plakası okutulduktan sonra skoru ≥2.0 olan tanımlamalar kesin, ≥1.7 olası tanı olarak değerlendirildi. Daha aşağıda saptanan skorlar geleneksel yöntemlerle desteklenerek tanımlandı.

2.2. Antifungal Duyarlılık Yöntemleri

Çalışmada yer alan tüm izolatların antifungal duyarlılıkları üç yöntemle araştırıldı.

2.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

2.2.1.1. Besiyerinin hazırlanması

CLSI M38-A2 referans yönteminde önerilen sentetik besiyeri olan L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren, sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Cegrogen biotech, Almanya), son konsantrasyonu 0.165 mol/l olacak şekilde morfolinopropan sulfonik asit (MOPS; Sigma Aldrich, Almanya) ile tamponlanarak hazırlandı. Besiyerinin pH'ı 1M NaOH ile 7 olacak şekilde ayarlandı. Besiyeri filtre edilerek steril hale getirildi (12).

2.2.1.2. Antifungal ilaç dilüsyonlarının hazırlanması

AMB (Fluka, İsviçre), İTZ (Carbosynth, İngiltere), VOR (Carbosynth, İngiltere) ve KAS (Sigma, Çin Halk Cumhuriyeti) toz formunda ilgili firmalardan temin edildi. CLSI M38-A2 rehberinde önerilen şekilde tüm ilaçların dilüsyonları hazırlandı. AMB, İTZ ve VOR'un stok solüsyonları dimetilsülfoksid (DMSO; Supelco Emplura, Japonya) çözeltisinde, KAS distile suda çözdürülerek hazırlandı.

İlaçların stok solüsyonu için eklenecek DMSO ve distile su miktarı CLSI M38-A2 rehberinde önerilen aşağıdaki formülle hesaplandı.

Hacim = Ağırlık (mg) x potens (µg/mg) / konsantrasyon (µg/ml)

250 mg AMB stok solüsyonu için 29.3 ml DMSO,

100 mg VOR stok solüsyonu için 15.31 ml DMSO,

250 mg İTZ stok solüsyonu için 38.3 ml DMSO,

5 mg KAS stok solüsyonu için 1.50 ml DMSO kullanıldı.

İlaç stok konsantrasyon solüsyonları AMB, VOR, İTZ için, 6400 µg/ml, KAS için 3200 µg/ml olarak hazırlandı. Daha sonra DMSO'nun etkisini azaltmak ve çalışma konsantrasyonlarını hazırlamak için ilaçların son seyreltmeleri RPMI 1640 ile 1/100 sulandırılarak yapıldı. Son konsantrasyonları elde edilen ilaçlar birer mililitrelik ependorflara dağıtılarak -20◦C'ye kaldırıldı (12).

2.2.1.3. Küf süspansiyonunun hazırlanması

CLSI M38-A2 belgesinde SMD yöntemi için, yaklaşık $0,4x10^4$ ile $5x10^4$ KOÜ aralığında canlı konidyal veya sporanjiyospor inokülasyon konsantrasyonlarının hazırlanması gerektiği belirtilmektedir.

Stoklanan suşlar SDA'a pasajlanarak canlandırıldı. Canlandırılan suşların konidyum ve sporanjiospor oluşumunu indüklemek için tüpte PDA'da (Oxoid, İngiltere) 35°C'de yedi gün boyunca veya iyi sporülasyon elde edilene kadar inkübe edildi. Daha sonra PDA'daki kolonilerin üzerine yaklaşık 1 ml steril %0,85 serum fizyolojik eklendi ve pastör pipetiyle yavaşça karıştırılarak geri çekildi. Konidya ve hifal fragmanlardan oluşan süspansiyon hazırlandı. Ağır partiküllerin çökmesi için 3-5 dakika beklendikten sonra üstteki homojen süspansiyon steril bir tüpe aktarıldı. Tüpün kapağı kapatıldı ve homojen olacak şekilde karıştırıldı. Sonra bu karışımın absorbansı spektrofotometride (Jasco V730, Amerika Birleşik Devletleri) 530 nm dalga boyunda 0,09-0,13 optik dansitede olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyon hem SMD yöntemi hem de diğer yöntemler için kullanıldı (12).

2.2.1.4. Mikroplaklara inokulasyon

2.2.1.4.1. RPMI 1640 Besiyerinin Mikroplaklara Dağıtılması

İlk olarak RPMI 1640 besiyeri, mikroplaklardaki (Citoteks, Çin Halk Cumhuriyeti) tüm kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. Her yatay sıraya bir suş bir antifungal çalışması yapılacak şekilde düzenlendi.

2.2.1.4.2. Antifungal İlaçların Mikroplaklarda Seri Sulandırımı

AMB, İTZ ve VRZ 0.0313-16 µg/ml, KAS ise 0.015-8 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu amaçla, çalışma konsantrasyonu hazırlanmış olan antifungaller, steril 96 kuyucuklu mikroplaklara, birden onuncu kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapılacak şekilde dağıtıldı. On birinci kuyucuğa (üreme kontrolü) sadece küf inoküle edilirken, on ikinci kuyucuk besiyeri kontrolü olarak değerlendirildi (12).

2.2.1.4.3. Aspergillus İnokülasyonlarının Dağıtılması

Spektrofotometride 0,09-0,13 optik dansitede ayarlanan süspansiyonlar, sıvı RPMI 1640 besiyeri ile 1/50 oranında sulandırıldı ($0.8x10^4$ -$1x10^5$ KOÜ/ml) . Oluşan bu 1/50 dilüsyonluk karışım, önceden hazırlamış olduğumuz, içinde 2 kat seri

dilüsyon şeklinde antifungal dağıtılmış mikroplaklara, her kuyucuğa 100 µl gelecek şekilde eklendi (son inokulum miktarı $0.4x10^4$-$5x10^4$ KOÜ/ml) (12).

2.2.1.4.4. Mikroplakların İnkübasyonu

Mikroplaklar 35°C'lik etüvde 24-48 saat inkübe edildi (12).

2.2.1.5. Testin analizi

Mikroplaklar, hem 24 hem de 48 saatlik inkübasyon sonunda görsel olarak değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi. CLSI M38-A2 belgesinde önerildiği şekilde AMB, VOR ve İTZ, 46-50 saat, KAS ise 21-26 saat sonra değerlendirildi (12).

AMB, İTZ ve VOR ile MİK değerleri ve KAS ile MEK değeri belirlendi. AMB, İTZ ve VOR ilaçları için üreme kontrolüne göre %100 inhibisyon (gözle görülebilir büyümeyi engelleyen) sağlayan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. KAS için üreme kontroldeki yoğun hifal üremeye göre küçük yuvarlak hifal üremenin olduğu ilk kuyucuk MEK değeri olarak belirlendi (12).

SMD çalışmasında KK izolatlarının MİK değerleri tüm ilaçlar için CLSI M38-A2 belgesinde belirtilen aralıklarda saptandı (116).

2.2.2. İzolatların GD Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıklarının Saptanması

Aspergillus türlerinin, AMB (Liofilchem, İtalya), İTZ (Liofilchem, İtalya), VOR (Liofilchem, İtalya) ve KAS (Liofilchem, İtalya) ilaçlarına karşı duyarlılıkları GD yöntemi ile GD stripleri kullanılarak araştırıldı. Striplerin her ilaç için konsantrasyon gradyanı 0.004 ile 32 µg/ml arasında bulunmaktadır. Stripler, testin yapılacağı güne kadar -20° C'de saklandı. GD, CLSI M51-A'nın DD için önerdiği yöntem referans alınarak gerçekleştirildi (107). Besiyeri olarak saf MHA (Liofilchem, İtalya) kullanıldı. SMD yönteminde anlatıldığı şekilde 530 nm dalga boyunda 0,09-0,13 optik dansitede olacak şekilde hazırlanan seyreltilmemiş inokulum süspansiyonlarına steril eküvyonlar batırıldı. Eküvyon birkaç kez döndürüldü ve sıvı seviyesinin üzerinde tüpün iç duvarına sıkıca bastırılarak eküvyondaki fazla sıvı giderildi. Eküvyon saf MHA plağının kurumuş yüzeyine 3 kez her seferinde 60° döndürülerek tüm agar yüzeyine eşit gelecek şekilde yayıldı ve üzerine GD stripleri yerleştirildi. Plaklar ters çevrilerek 35°C'de 48 saat'e kadar inkübe edildi. Plakların 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında MİK ve MEK değerleri okundu. İnkübasyondan sonra elips şeklindeki üreme inhibisyon zonunun, striple kesiştiği en düşük konsantrasyon, MİK

değeri olarak belirlendi. Sonuçlar okunurken üretici firmanın temin ettiği dökümanlardan da yararlanıldı (13,107).

GD yöntemi, üreticinin önerilerine göre ve CLSI M51-A belgesinde disk difüzyon yöntemi için verilen değerlendirme koşullarına göre değerlendirildi. Triazoller test edilirken, hafif “trailing” (sürüklenme) veya inhibisyon bölgesine uzanan hif elemanları göz ardı edildi ancak AMB için inhibisyon bölgesine uzanan hif elemanları dikkate alındı. Ayrıca KAS içinde iyi tanımlanmış inhibisyon elipsinin içindeki mikrokoloniler göz ardı edildi. GD MİK son noktaları, her iki yöntemle MİK karşılaştırmalarını kolaylaştırmak için CLSI M38-A2 SMD yöntemindeki konsantrasyon aralıklarıyla eşleşen en yakın üst dilüsyona yükseltildi (13).

KK izolatlarında GD yöntemi MİK değerleri, tüm ilaçlar için CLSI M38-A2 dökümanında SMD yöntemi için belirlenen aralıklarda saptandı.

2.2.3. İzolatların Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıklarının Saptanması

Disk difüzyon yöntemi, CLSI M51-A standardına göre ve saf MHA (Liofilchem, İtalya) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, AMB (10 mikrogram) (Bioanalyse, Türkiye), İTZ (10 mikrogram) (Bioanalyse, Türkiye), VOR (1 mikrogram) (Bioanalyse, Türkiye) ve KAS (5 mikrogram) (Bioanalyse, Türkiye) ilaç diskleri kullanıldı. Diskler, testin yapılacağı güne kadar -20°C de saklandı. SMD yönteminde anlatıldığı şekilde, 530 nm dalga boyunda 0,09-0,13 optik dansitede olacak şekilde hazırlanan seyreltilmemiş inokulum süspansiyonlarına steril eküvyonlar batırıldı. Eküvyon birkaç kez döndürüldü ve sıvı seviyesinin üzerinde tüpün iç duvarına sıkıca bastırılarak eküvyondaki fazla sıvı giderildi. Eküvyon saf MHA plağının kurumuş yüzeyine 3 kez her seferinde 60° döndürülerek tüm agar yüzeyine eşit gelecek şekilde yayıldı ve üzerine diskler yerleştirildi. 90 mm’lik plağa 2 disk yerleştirildi. KK izolatları da aynı işlemlerden geçirildi (13). Şekil 12’de *A. flavus* için İTZ ve VOR disklerinin kullanıldığı 24. ve 48 saatteki zon çapları görülmektedir.

Plaklar 35 ° C'de inkübe edilerek 24 ve 48 saat sonra yansıyan ışıkta siyah bir arka zeminde okundu. Disklerin inhibitör zon çapları, büyümenin belirgin olarak azaldığı (%80) yerdeki geçiş noktasından ölçüldü. Triazoller test edilirken CLSI M51-A’da önerildiği gibi hafif “trailing” (sürüklenme) veya inhibisyon bölgesine uzanan hif elemanları göz ardı edildi. Ancak AMB için inhibisyon bölgesine uzanan hif

elemanları da dahil edildi. Ayrıca KAS içinde iyi tanımlanmış inhibisyon bölgesi içindeki mikrokoloniler göz ardı edildi (13).

Tüm ilaçlarda KK suşlarının zon çapları beklenen değer aralığında bulundu (117).

2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

SMD ve GD yönteminde MİK ve MEK değerleri, DD yönteminde zon çapları 24. ve 48. saatlerde iki farklı kişi tarafından kör bir şekilde okundu.

GD yönteminde 24. ve 48. saatte okunan MİK ve MEK değerleri, SMD yöntemi ile 24. ve 48. saatte okunan değerler ile karşılaştırıldı. GD testi sürekli bir konsantrasyon gradientine sahip olduğundan, iki kat seyreltmeler arasındaki MİK/MEK değerleri, karşılaştırma için referans yöntemin bir sonraki üst konsantrasyona yuvarlanmıştır (10, 22).

Çalışmamızda DD yönteminin performansını belirlemek için Espinell-Ingroff ve ark.'nın (118) DD yöntemini değerlendirmek için kullandığı ve CLSI M38-A2'de de atıfta bulunulan eşik değerler kullanılmıştır. Espinel-Ingroff ve ark. (118) tarafından küf mantarları için, MİK ve MEK değerlerinin dağılım grafikleri ve her bir antifungal ajana karşılık gelen disk zon çapı sonuçları değerlendirilerek, geçici zon çapı kategorileri ve MİK/MEK eşik değerleri atanmıştır. MİK/MEK eşik değerleri; AMB, VOR, İTZ ve KAS için duyarlı (MİK veya MEK <1 µg/mL), doza bağımlı duyarlı (MİK veya MEK: 2 µg/mL) ve dirençli (MİK veya MEK > 4 µg/mL) olarak belirlenmiştir. Zon çapları ise triazoller ve KAS için ≥17 mm ve AMB için ≥15 mm duyarlı, triazoller ve KAS için 14-16 mm ve AMB için 13-14 mm doza bağımlı duyarlı, triazoller ve KAS için ≤13 mm ve AMB için ≤12 mm dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

Biz de çalışmamızda bu geçici eşik değerlerini, her ilacın zon çapı ve MİK değerleri arasındaki kategorik uyumu belirlemek için kullandık. İzolat DD yöntemiyle dirençli, ancak SMD yönteminde duyarlı olduğunda büyük hata olarak kabul edildi. SMD yönteminde sonucu dirençli olan izolatların, DD sonucu duyarlı olduğunda, çok büyük hata olarak kabul edildi. Küçük hatalar, duyarlı ve doza bağımlı duyarlı veya doza bağımlı duyarlı ve dirençli arasında kaymalar olduğunda kabul edildi.

GD ve SMD yöntemi için MİK aralıkları, $MİK_{50}$, $MİK_{90}$ değerleri ve geometrik ortalamaları belirlendi. Her iki yöntem arasındaki temel uyuma ±1 ve ±2 dilusyonda bakılarak uyumlu olan suşların sayısı yüzde olarak belirlendi. Ayrıca bu iki yöntem kategorik uyum açısından da karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

Çalışmamıza toplam 106 *Aspergillus* suşu (62 *A. fumigatus*, 28 *A. flavus*, 16 *A. terreus*) dahil edildi. Bu suşlar, sıklık sırasına göre bronş lavaj/bronkoalveolar lavaj, balgam, trakeal sekret, yara, doku, plevra, kornea, diğer aspirat ve kulak örneklerinden izole edilmiş olan suşlardan oluşmaktaydı.

Aspergillus üremesi saptanmış olan örnekler içerisinde, kontaminasyon olasılığı ekarte edilmiş olan örneklere ait izolatlar, çalışmaya dahil edildi. Tablo 8'de örneklerin sayısı ve oranları verilmiştir.

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen örneklerin türü, sayısı ve oranları

		Sayı	Yüzde
Örnek türü	Balgam	27	25,5
	Trakeal sekret	23	21,7
	Bronş lavaj/bronkoalveolar lavaj	28	26,4
	Plevra	4	3,8
	Doku	8	7,5
	Yara	10	9,4
	Diğer aspirat	2	1,9
	Kornea	3	2,8
	Kulak	1	0,9
Toplam		106	100,0

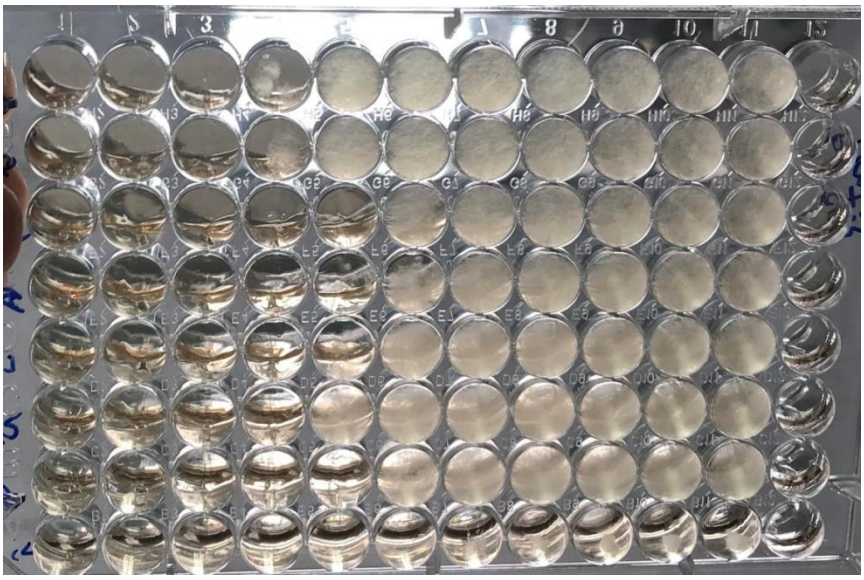
Çalışmamızda bulunan 106 suşun tanımlaması geleneksel yöntemler ve MALDI-TOF MS yöntemi ile yapıldı. Biri hariç tüm izolatlar geleneksel yöntemler ile tanımlandığı şekilde MALDI-TOF MS yöntemi ile de aynı isimle tanımlandı. Tablo 9'da izolatların MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanma skorları ve sayıları verilmiştir. Geleneksel yöntemler ile *A. flavus* olarak tanımlanan bir izolat, MALDI-TOF MS yöntemi ile *A. tamarii* olarak tanımlandı. Bu nedenle bu izolat çalışmadan çıkarıldı.

Tablo 9: *Aspergillus* türlerinin MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanma skorları ve sayıları

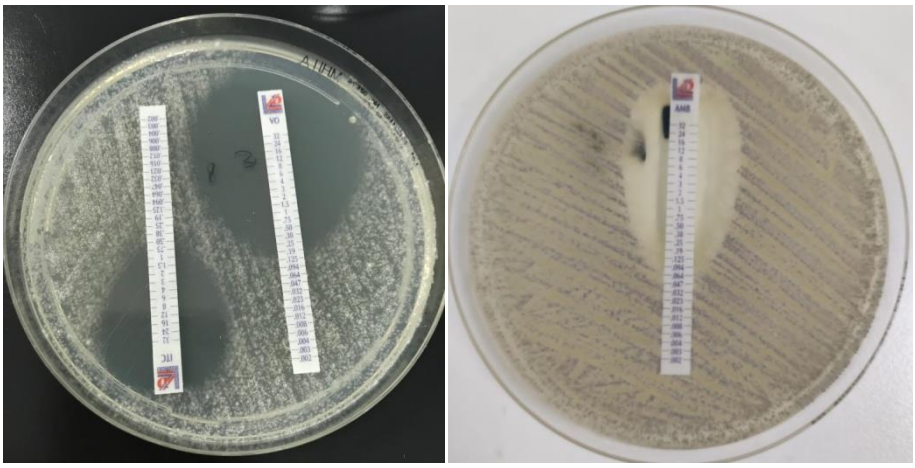
		sayı	yüzde
Tanımlanma skoru	2,0 ve üzeri	57	53,8
	1,7 - 2,0	32	30,2
	1,5 - 1,7	16	15,1
	1,5 ve altı	1	0,9
Toplam		106	100,0

Çalışmaya alınan 106 suşun, CLSI referans SMD yöntemi (M38-A2), GD ve DD yöntemi (CLSI M51-A) ile AMB, İTZ, VOR ve KAS için in vitro duyarlılıklarına bakıldı. Değerlendirmeler tüm yöntemlerde 24. ve 48. saatlerde yapıldı. SMD yöntemi ile 24. ve 48. saatte tüm okumalar yapılabilirken, DD ve GD yöntemi ile *A. terreus* izolatlarının 24. saat üremeleri zayıf olduğu için bu türün 24. saat yerine 27-28. saatte değerlendirmeleri yapıldı. CLSI M51-A da *A. terreus* için 48. saat okuması önerilmektedir.

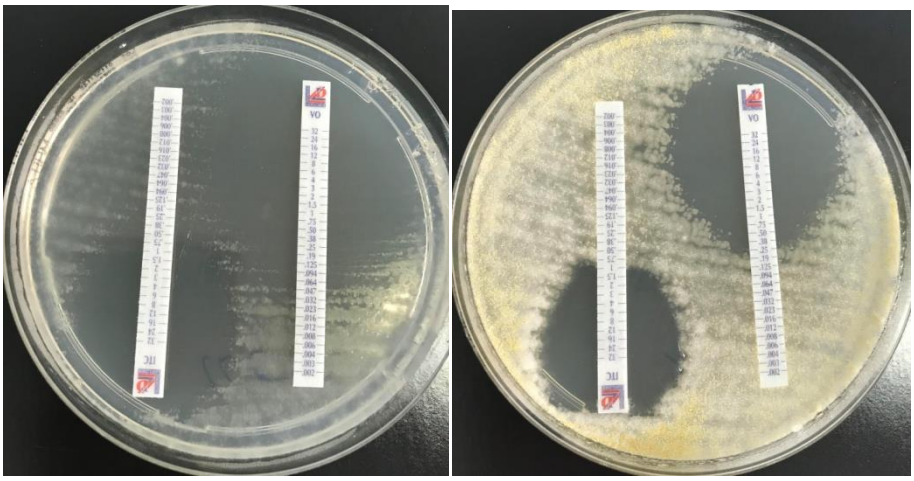
Şekil 8'de SMD yöntemi ile çalışmamıza ait bir mikroplak resmi örnek olarak verilmiştir. Şekil 9 ve 10'da sırasıyla *A. fumigatus* ve *A. flavus'*un GD yöntemiyle 24. ve 48. saat görüntüsü görülmektedir. Şekil 11'de *A. flavus* izolatlarının DD yöntemiyle 24. ve 48. saat görüntüsü görülmektedir.



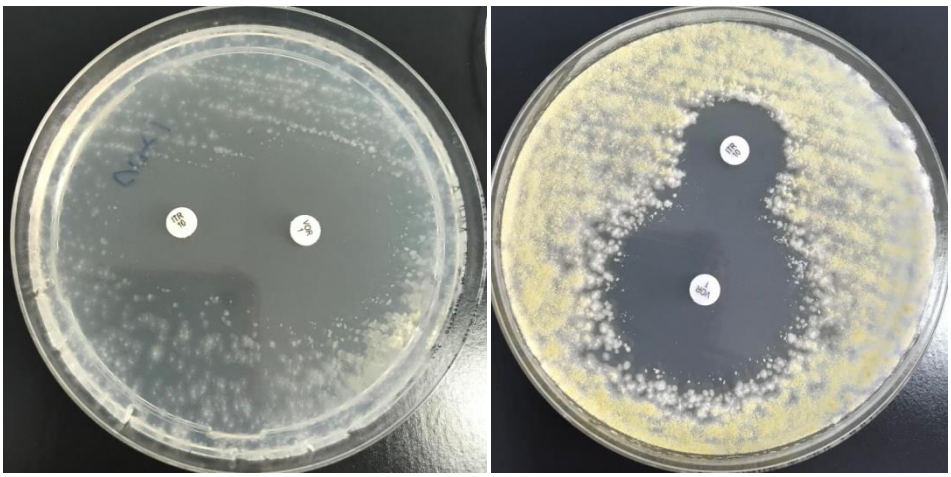
Şekil 8: SMD yöntemi ile antifungal duyarlılığın belirlenmesi *(A. flavus*; AMB; 48. saat görünümü, en alt satırdaki kuyucuklarda KK izolatının ve diğer satırlarda çalışma izolatlarının 48. saat görüntüleri görülmektedir.)



Şekil 9: *A. fumigatus* GD yöntemiyle antifungal duyarlılığın belirlenmesi (solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü)



Şekil 10: *A. flavus*, GD yöntemi ile antifungal duyarlılığın belirlenmesi (solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü)



Şekil 11: DD yöntemiyle antifungal duyarlılığın belirlenmesi (*A. flavus*; solda 24. saat, sağda 48. saat görünümü)

Tablo 10: *Aspergillus* türlerinin SMD ve GD yöntemi ile 24. ve 48. saatte elde edilen MİK/MEK aralıkları, $MİK/MEK_{50}$, $MİK/MEK_{90}$ değerleri ve G.O'ları

TÜR	ANTİFUNGAL		MİKRODİLÜSYON TESTİ				E TEST			
			ARALIK	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	G.O*	ARALIK	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	G.O*
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	24.saat	0.12-0.5	0.25	0.5	0.25	0.06-0.5	0.12	0.5	0.13
		48.saat	0.25-1	0.5	1	0.54	0.12-2	0.5	1	0.46
	Vorikonazol	24.saat	0.06-1	0.12	0.25	0.12	0.06-0.5	0.12	0.25	0.15
		48.saat	0.12-2	0.12	0.25	0.18	0.12-1	0.25	0.25	0.2
	İtrakonazol	24.saat	0.25-4	1	1	0.73	0.5-2	1	2	1.06
		48.saat	0.5-8	1	2	1.16	1-8	2	2	1.87
	Kaspofungin	24.saat	0.015-0.06	0.03	0.06	0.02	0.12-0.50	0.25	0.5	0.25
		48.saat	0.015-0.5	0.03	0.25	0.04	0.12-1	0.25	0.5	0.34
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	24.saat	0.5-2	1	2	0.92	0.5-2	1	2	1.07
		48.saat	1-4	2	2	1.64	1-32	4	32	5.51
	Vorikonazol	24.saat	0.03-0.5	0.12	0.25	0.12	0.06-0.25	0.12	0.25	0.11
		48.saat	0.12-05	0.25	0.5	0.22	0.06-0.5	0.12	0.5	0.15
	İtrakonazol	24.saat	0.12-0.5	0.25	0.25	0.21	0.12-0.5	0.5	1	0.46
		48.saat	0.25-1	0.25	1	0.35	0.5-1	1	1	0.72
	Kaspofungin	24.saat	0.015-0.06	0.03	0.03	0.02	0.015-0.06	0.12	0.5	0.14
		48.saat	0.015-0.6	0.03	0.06	0.02	0.06-0.5	0.25	0.5	0.22
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	24.saat	0.25-2	1	2	0.7	0.5-2	1	2	0.91
		48.saat	0.5-4	2	4	1.91	1-32	4	16	4
	Vorikonazol	24.saat	0.06-0.5	0.12	0.25	0.13	0.06-0.25	0.25	0.25	0.19
		48.saat	0.12-0.5	0.5	0.5	0.33	0.12-0.5	0.25	0.5	0.21
	İtrakonazol	24.saat	0.12-0.5	0.25	0.5	0.28	0.25-1	0.5	1	0.59
		48.saat	0.25-1	0.5	1	0.56	0.5-1	1	1	0.84
	Kaspofungin	24.saat	0.015-0.06	0.015	0.03	0.02	0.015-0.12	0.06	0.12	0.04
		48.saat	0.015-0.12	0.03	0.03	0.04	0.03-0.12	0.06	0.12	0.07
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	24.saat	0.12-2	0.25	1	0.41	0.06-2	0.25	2	0.3
		48.saat	0.25-4	1	2	0.88	0.12-32	1	4	0.78
	Vorikonazol	24.saat	0.03-1	0.12	0.25	0.12	0.06-0.5	0.12	0.25	1.23
		48.saat	0.12-2	0.25	0.5	0.21	0.06-1	0.25	0.25	1.29
	İtrakonazol	24.saat	0.12-4	0.5	1	0.46	0.12-2	1	1	0.14
		48.saat	0.25-8	1	2	0.76	0.5-8	1	2	0.16
	Kaspofungin	24.saat	0.02-0.06	0.03	0.06	0.024	0.015-0.5	0.12	0.5	0.19
		48.saat	0.015-0.5	0.03	0.06	0.036	0.03-1	0.25	0.5	0.24

*G.O: Geometrik ortalama, KAS için MEK değerleri verilmiştir.

Tablo 10'da görüldüğü gibi, SMD yöntemi ile MİK/MEK$_{50}$, MİK/MEK$_{90}$ ve G.O değerlerine göre, tüm *Aspergillus* türlerinde en düşük MEK değerleri KAS ile saptandı. GD yöntemi ile, *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatları için en düşük MİK değerleri VOR ile saptanırken, *A. terreus* izolatları için KAS ile saptandı.

İnkübasyon sürelerine göre MİK$_{90}$ değerleri karşılaştırıldığında, GD yönteminde *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için AMB'nin 24. ve 48. saatte okunan değerleri ve *A. terreus* izolatları için SMD yönteminde VOR'un 24. ve 48. saatte okunan değerleri arasında >±2 dilüsyon artış saptandı. Her iki yöntemde de diğer ilaçlarda böyle bir fark saptanmamış olup, 24. ve 48. saatteki sonuçları arasındaki yükselme en fazla ±1 dilüsyon ile sınırlı kalmıştır (Tablo 10).

Her iki inkübasyon süresinde SMD ve GD yöntemi verileri dikkate alındığında *A. fumigatus* için AMB MİK değerleri düşük (≤1 µg/ml) saptanırken bu izolatlara karşı AMB'nin etkin kullanılabileceği ön görüldü. Fakat *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için AMB MİK değerleri yüksek (≥1 µg/ml) saptandı. İTZ de ise AMB'nin aksine *A. fumigatus* için MİK değerleri yüksek (≥1 µg/ml) saptanırken, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için daha düşük (≤1 µg/ml) bulundu. KAS ve VOR için de tüm *Aspergillus* türlerinde MİK/MEK değerleri düşük (≤1 µg/ml) saptandı (VOR MİK değeri 2 µg/ml bulunan bir *A. fumigatus* izolatı hariç) (Tablo 10).

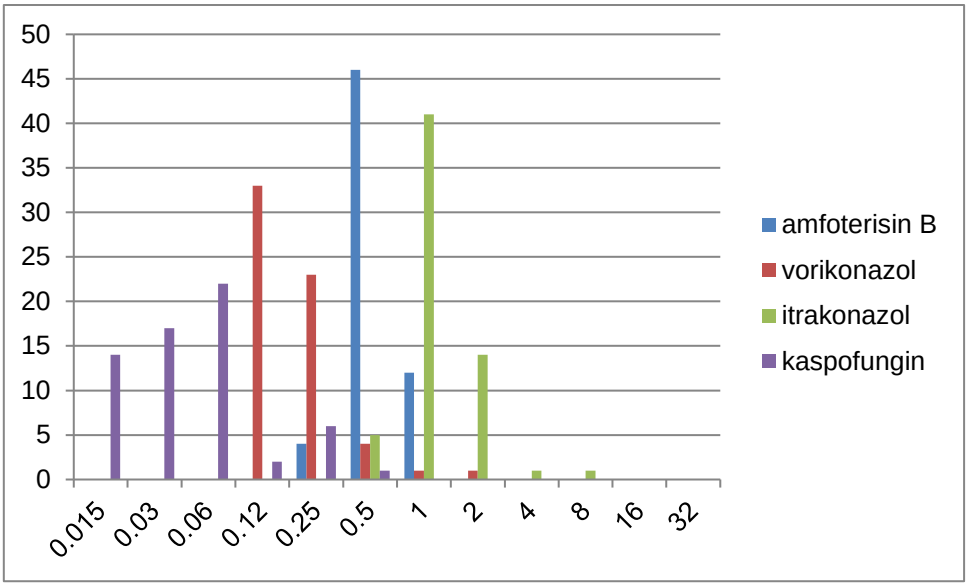
Tablo 11: SMD ve GD yöntemlerinin 24. ve 48. saatlerdeki temel uyum oranları

TÜR	ANTİFUNGAL	SMD-GD (saat)	±1 uyum (%)	±2 uyum (%)
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	24-24	75.9	95.2
		48-48	66.1	92
		48-24	12.9	72.6
	Vorikonazol	24-24	93.5	98.4
		48-48	96.8	100
		48-24	95.2	98.4
	İtrakonazol	24-24	95.2	100
		48-48	96.8	100
		48-24	96.8	100
	Kaspofungin	24-24	0	15.8
		48-48	14.5	33.2
		24-48	0	8
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	24-24	96.4	100
		48-48	57.2	84
		48-24	85.7	100
	Vorikonazol	24-24	92.8	100
		48-48	89.2	96.4
		48-24	82.2	92.9
	İtrakonazol	24-24	71.4	100
		48-48	75	100
		48-24	100	100
	Kaspofungin	24-24	7.2	50.1
		48-48	10.7	21.4
		24-48	7.2	21.5
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	24-24	93.7	100
		48-48	81.1	93.7
		48-24	74.9	93.7
	Vorikonazol	24-24	93.7	100
		48-48	87.5	100
		48-24	81.2	100
	İtrakonazol	24-24	74.9	100
		48-48	100	100
		48-24	100	100
	Kaspofungin	24-24	68.7	100
		48-48	75.1	87.5
		24-48	31.4	87.5
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	24-24	84.2	97.2
		48-48	79.3	91.6
		48-24	46.3	83.1
	Vorikonazol	24-24	93.5	99.1
		48-48	93.6	99.1
		48-24	88.8	97.2
	İtrakonazol	24-24	86.8	100
		48-48	91.5	100
		48-24	98.2	100
	Kaspofungin	24-24	12.2	38.6
		48-48	22.5	38.4
		24-48	6.6	23.6

Tablo 11'de *Aspergillus* izolatları için SMD ve GD yöntemlerinin 24-24 saat, 48-48 saat ve AMB, İTZ ve VOR için 48-24 saat, KAS için ise 24-48 saat sonuçlarının, ±1 ve ±2 dilüsyondaki temel uyum oranları verilmiştir. SMD yöntemi CLSI M38-A2 belgesinde önerilen saatlerde, GD yöntemi de 24. ve 48. saatte değerlendirildiğinde iki yöntem arasında ±2 dilüsyonda uyum %15.8-100 arasında bulunurken, en iyi sonuç İTZ (%100) ile alındı. AMB ve VOR için de (>%90) çok iyi uyum elde edildi. Fakat KAS ile temel uyum oranları düşük (%38.6) saptandı. Buna rağmen KAS için kategorik uyuma bakıldığında uyum oranının %100 olduğu görülmektedir.

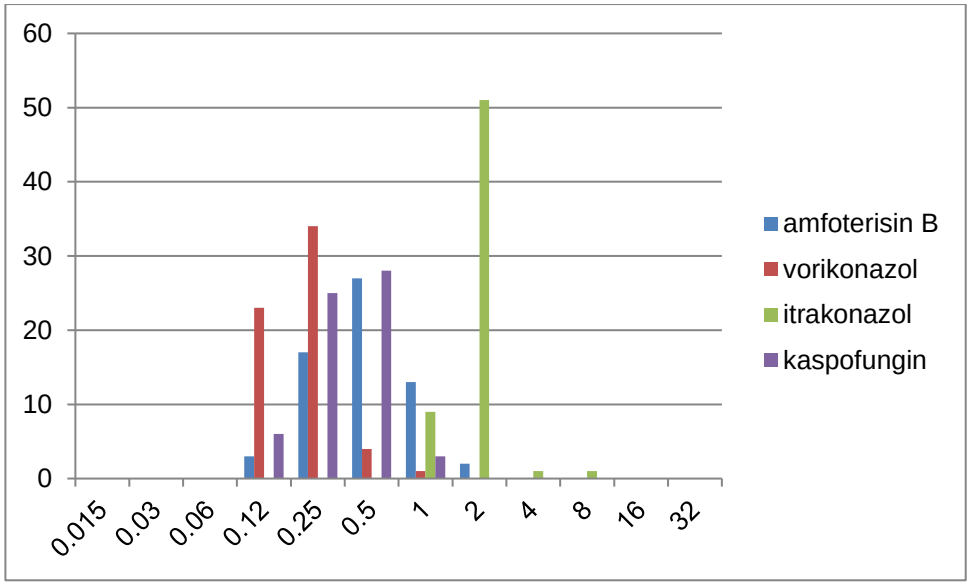
AMB ve VOR ile en yüksek temel uyum oranları, SMD ve GD yöntemlerinin her ikisi de 24. saatte okunduğunda elde edildi. Ancak CLSI M38-A2 de SMD yöntemi için AMB ve triazollerin 48. saatte okunması önerilmektedir. Buna göre SMD yönteminde AMB 48. saatte okunduğunda, en yüksek temel uyum GD yönteminde *A. fumigatus* ve *A. terreus* izolatlarının 48. saatte okunmasıyla, *A. flavus* izolatlarının ise 24. saatte okunmasıyla saptandı. Tüm *Aspergillus* türleri için VOR ile en yüksek temel uyum, GD yöntemi 48. saatte okunduğunda saptandı. GD yönteminin İTZ için temel uyum oranları, hem 24 hem de 48. saatte okunduğunda aynı saptandı (±2 dilüsyonda her iki zaman diliminde de %100 uyum bulundu). KAS ile genel olarak oranlar düşük olmakla birlikte en yüksek uyum, iki yöntem de 24. saatte okunduğunda saptandı (Tablo 11).

Şekil 12'de *A. fumigatus* için SMD yönteminde elde edilen MİK/MEK değerlerinin dağılımı görülmektedir. Çalışmamızda en düşük MEK değerleri KAS ile alınırken en yüksek MİK değerleri ise İTZ ile alındı. AMB hariç tüm ilaçlarda GD yöntemi ile göre daha geniş MİK aralıkları saptandı (Şekil 13).



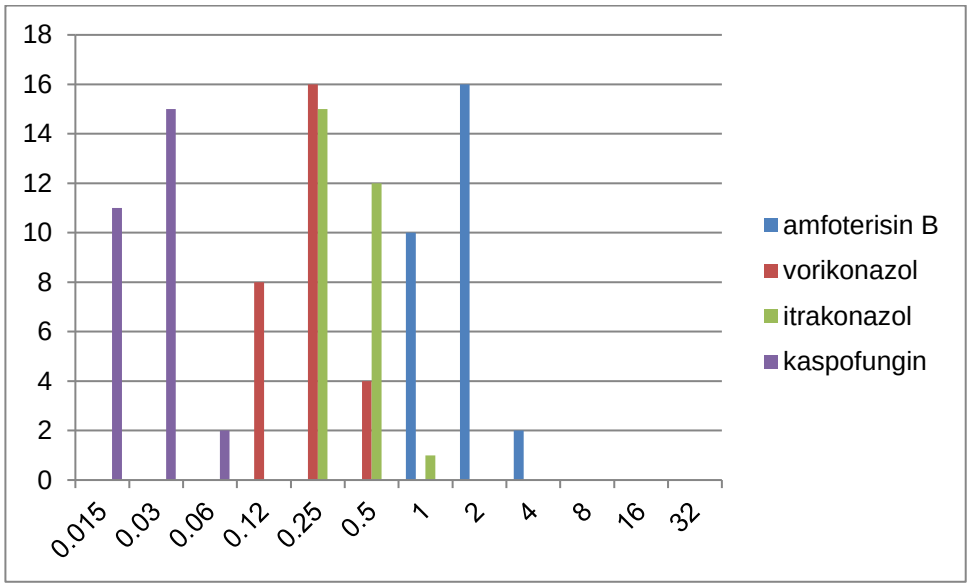
Şekil 12: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. fumigatus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

GD yöntemiyle *A. fumigatus* izolatları için MİK/MEK değerlerinin dağılımı Şekil 13'de verilmiştir. Burada en düşük MİK değerleri VOR ile saptanırken, AMB ve KAS için de VOR'a yakın MİK/MEK değerleri saptandı. En yüksek MİK değerleri ise İTZ ile saptandı.



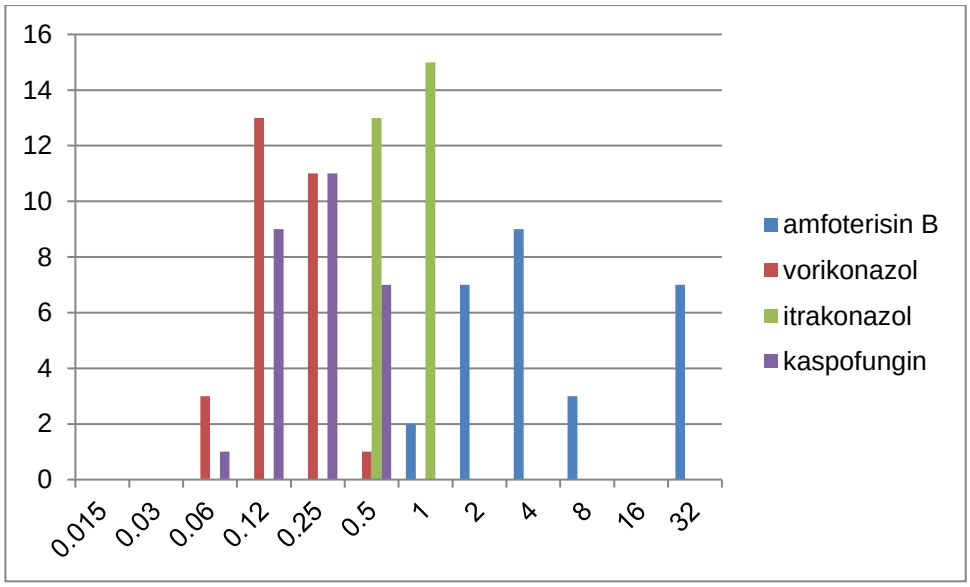
Şekil 13: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. fumigatus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

A. flavus izolatları için SMD yönteminde elde edilen MİK/MEK değerlerinin dağılımı Şekil 14'de verilmiştir. En düşük MEK değerleri KAS ile alınmış olup en yüksek MİK değerleri ise AMB ile alındı. GD yöntemi ile karşılaştırıldığında İTZ hariç MİK aralıkları daha geniş bulundu (Şekil 15).



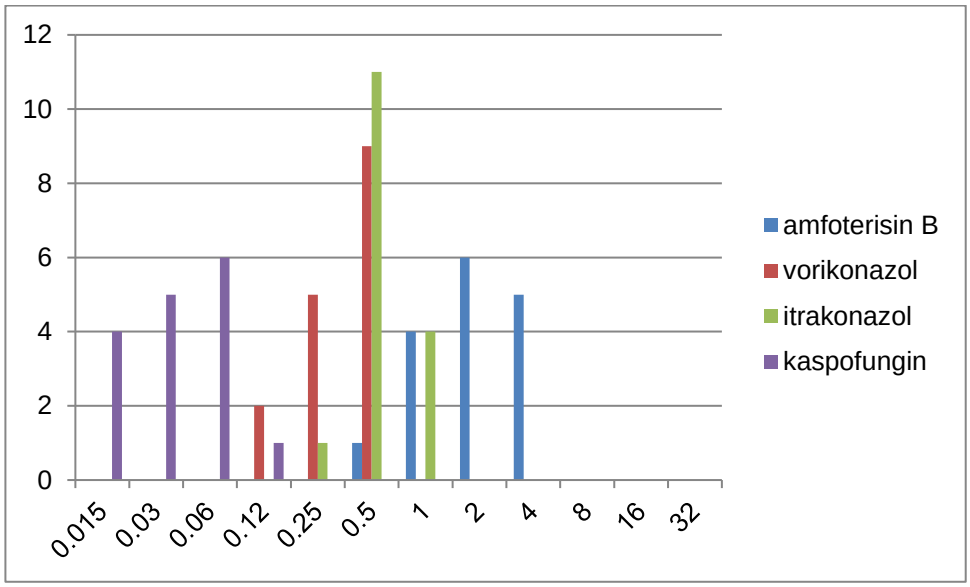
Şekil 14: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. flavus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

A. flavus için GD yöntemi ile 48. saatte elde edilen MİK/MEK değerlerinin dağılımı Şekil 15'de verilmiştir. Burada en düşük MİK/MEK değerleri VOR ve KAS ile saptanmış olup en yüksek MİK değerleri SMD yöntemindeki gibi AMB ile saptandı.



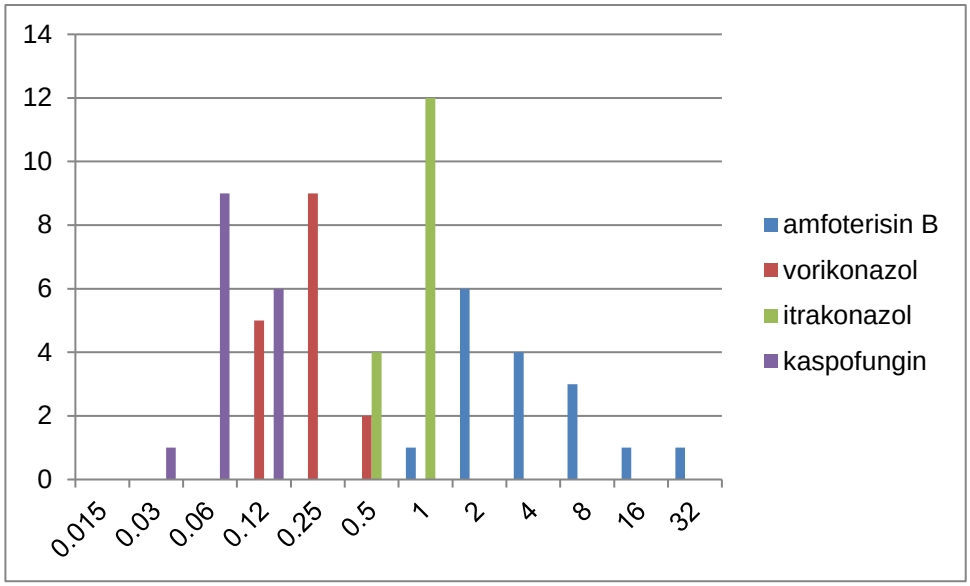
Şekil 15: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. flavus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

A. terreus izolatları için SMD yönteminde elde edilen MİK/MEK değerlerinin dağılımı Şekil 16'da verilmiştir. En düşük MEK değerleri diğer türlerde de olduğu gibi KAS ile saptandı. En yüksek MİK değerleri, *A. flavus* izolatlarında olduğu gibi AMB ile saptandı.



Şekil 16: SMD yöntemi sonuçlarına göre *A. terreus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

A. terreus için GD yöntemi ile 48. saatte MİK değerlerinin dağılımı Şekil 17'de verilmiştir. En düşük MEK değerleri SMD yönteminde saptandığı gibi KAS ile saptandı. En yüksek MİK değerleri de SMD yönteminde saptandığı gibi AMB ile saptandı.



Şekil 17: GD yöntemi sonuçlarına göre *A. terreus* MİK/MEK dağılımı (48. saat)

Küf mantarları için her ne kadar standart eşik değerleri bulunmasa da, bazı çalışmalarda, AMB, VOR, İTZ ve KAS için MİK≤1 µg/ml, duyarlılık sınırı olarak belirtilmektedir (12,118). Bu nedenle tüm suşlarda dört ilacın MİK değerleri ≤1 µg/ml olanların yüzdesi SMD ve GD yöntemleri için hesaplanarak Tablo 12'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi her iki yöntemle de MİK/MEK değerleri en düşük saptanan ilaçlar VOR ve KAS'dır. SMD yöntemiyle *A. fumigatus* izolatlarının tamamında AMB MİK≤1 µg/ml saptanırken, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının çoğunda AMB MİK değerleri yüksek (≥1 µg/ml) saptandı. VOR ve İTZ MİK değerleri *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının tümünde MİK≤1 saptanırken, *A. fumigatus* izolatları için VOR ile bir suş MİK:2 µg/ml olarak, İTZ ile 16 suş MİK≥1 µg/ml saptandı. Tüm *Aspergillus* türleri için KAS MEK değerleri ≤1 µg/ml saptandı.

Tablo 12: *Aspergillus* türlerinde SMD ve GD yöntemi ile MİK/MEK ≤1 saptananların sayı ve yüzdesi

TÜR	ANTİFUNGAL	MİK/MEK	SMD (48. SAAT)	%SMD (48.SAAT)	GD (24.SAAT)	%GD (24.SAAT)	GD (48. SAAT)	% GD (48. SAAT)
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	MİK≤1	62	100	62	100	60	96.8
	Vorikonazol	MİK≤1	61	98.4	62	100	62	100
	İtrakonazol	MİK≤1	46	74.2	52	83.9	9	14.5
	Kaspofungin	MEK≤1	62	100	62	100	62	100
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	MİK≤1	10	35.7	19	67.9	2	7.1
	Vorikonazol	MİK≤1	28	100	28	100	28	100
	İtrakonazol	MİK≤1	28	100	28	100	28	100
	Kaspofungin	MEK≤1	28	100	28	100	28	100
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	MİK≤1	5	31.3	13	81.3	1	6.3
	Vorikonazol	MİK≤1	16	100	16	100	16	100
	İtrakonazol	MİK≤1	16	100	16	100	16	100
	Kaspofungin	MEK≤1	16	100	16	100	16	100
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	MİK≤1	77	72.6	94	88.7	63	59.4
	Vorikonazol	MİK≤1	105	99.1	106	100	106	100
	İtrakonazol	MİK≤1	90	84.9	96	90.6	53	50
	Kaspofungin	MEK≤1	106	100	106	100	106	100

Küf mantarlarının duyarlılık testleri için eşik değerler belirlenmemiştir. Ancak Espinell-Ingroff ve ark. (118), 2007 yılında yaptıkları çalışmada, DD yönteminin AMB, İTZ, VOR, KAS ve PSZ için performansını değerlendirmek amacıyla bazı eşik değerler atamıştır. Biz de çalışmamızda, yöntemler arası karşılaştırma yapabilmek için bu geçici eşik değerleri kullandık. Tüm yöntemlerle aldığımız sonuçlarımızı da bu eşik değerlere göre duyarlı, dirençli ve doza bağımlı duyarlı olarak sınıfladık.

Tüm *Aspergillus* türleri SMD ve DD yönteminde CLSI belgelerinde önerilen saatlerde yapılan değerlendirmelere göre duyarlı, dirençli, orta duyarlı olarak Tablo 13'de sınıflandırılmıştır. Her iki yöntemle, tüm türler VOR (bir izolat hariç) ve KAS'a duyarlı bulundu (SMD yönteminde bir *A. fumigatus* izolatı VOR ile doza bağımlı duyarlı bulundu). *A. fumigatus* izolatlarının hepsi SMD yöntemi ile AMB'ye duyarlı saptanırken, DD yöntemiyle doza bağımlı duyarlı saptanan bir suş dışında, diğerleri AMB'ye duyarlı bulundu. Tüm *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları DD yöntemiyle AMB'ye dirençli saptanırken, SMD yöntemiyle *A. flavus* izolatlarından iki izolat dirençli, 16 izolat doza bağımlı duyarlı, 10 izolat ise duyarlı olarak saptandı. *A. terreus* izolatları için ise beş izolat dirençli, altı izolat doza bağımlı duyarlı, beş izolat duyarlı olarak

saptandı. Bu iki yöntem arasındaki kategorik uyum yüzdeleri tablo 15'de verilmiştir. Hem DD hem de SMD yöntemiyle *A. fumigatus* izolatlarının 46'sı İTZ'ye duyarlı, 14'ü doza bağımlı duyarlı ve ikisi dirençli olarak saptandı. *A. flavus* izolatları, *A. fumigatus*'a göre İTZ'ye daha duyarlı bulundu (SMD: %100, DD: %92). *A. terreus* izolatlarının tümü SMD yönteminde İTZ'ye duyarlı saptanırken, DD yönteminde dokuz izolat duyarlı, altı izolat doza bağımlı duyarlı ve bir izolat dirençli bulundu.

GD yönteminde, duyarlılık sonuçlarının kaçıncı saatte değerlendirileceğine dair bir standart bulunmamaktadır. Bu nedenle SMD yöntemiyle önerilen değerlendirme saatleri (AMB, VOR, İTZ 48. saat, KAS 24. saat) sonuçları ile GD yönteminin hem 24. hem de 48. saat sonuçları karşılaştırıldı. Her iki yöntemin kategorik değerlendirme verileri Tablo 14'te özetlenmiştir. Bu tabloya göre *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının tümü, her iki yöntemle tüm saatlerde, VOR, İTZ ve KAS'a duyarlı saptandı. GD yöntemi 24. saatte değerlendirildiğinde *A. fumigatus* izolatlarının tümü VOR ve KAS'a duyarlı saptanırken, İTZ'ye 10 izolat doza bağımlı duyarlı, diğerleri ise duyarlı bulundu. GD yöntemi 24. saatte değerlendirildiğinde, diğer yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de A. *flavus* ve *A. terreus* izolatlarının, *A. fumigatus* izolatlarına göre AMB'ye karşı duyarlılığı daha düşük saptandı (GD 24. saatte; *A. fumigatus* için %100, *A. flavus* için %67.9, *A. terreus* için %6.3).

Tablo 13: Tüm *Aspergillus* türlerinin SMD ve DD yöntemi duyarlılık sonuçları

			YORUMLANAN KATEGORİ (%)		
TÜR	ANTİFUNGAL	TEST	S	I	R
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	100		
		DD 24 sa	98.4	1.6	
	Vorikonazol	SMD 48 sa	98.4	1.6	
		DD 24 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	74.2	22.6	3.2
		DD 24 sa	74.2	22.6	3.2
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		DD 24 sa	100		
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	35.7	57.1	7.1
		DD 24 sa			100
	Vorikonazol	SMD 48 sa	100		
		DD 24 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	100		
		DD 24 sa	92.9	7.1	
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		DD 24 sa	100		
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	31.3	37.5	31.3
		DD 48 sa			100
	Vorikonazol	SMD 48 sa	100		
		DD 48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	100		
		DD 48 sa	56.3	37.5	6.3
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		DD 48 sa	100		
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	72.6	20.8	6.6
		DD 24 sa-48 sa	57.5	0.9	41.5
	Vorikonazol	SMD 48 sa	99.1	0.9	
		DD 24 sa-48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	89.9	13.2	1.9
		DD 24 sa-48 sa	76.4	20.8	2.8
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		DD 24 sa-48 sa	100		

*:*A. terreus* izolatları için DD yöntemiyle önerilen 48. saat sonuçları toplama eklenmiştir

Tablo 14: Tüm *Aspergillus* türlerinin SMD ve GD yöntemi duyarlılık sonuçları

TÜR	ANTİFUNGAL	TEST	YORUMLANAN KATEGORİ (%)		
			S	I	R
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	96.8	3.2	
	Vorikonazol	SMD 48 sa	98.4	1.6	
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	74.2	22.6	3.2
		GD 24 sa	83.9	16.1	
		GD 48 sa	14.5	82.3	3.2
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	35.7	57.1	7.1
		GD 24 sa	67.9	32.1	
		GD 48 sa	7.1	25	67.9
	Vorikonazol	SMD 48 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	31.3	37.5	31
		GD 24 sa	6.3	37.5	56.3
		GD 48 sa	6.3	37.5	56.3
	Vorikonazol	SMD 48 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	SMD 48 sa	72.6	20.8	6.6
		GD 24 sa	88.7	11.3	
		GD 48 sa	59.2	14.2	26.4
	Vorikonazol	SMD 48 sa	99.1	0.9	
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		
	İtrakonazol	SMD 48 sa	84.9	13.2	1.9
		GD 24 sa	90.6	9.4	
		GD 48 sa	50	48.1	1.9
	Kaspofungin	SMD 24 sa	100		
		GD 24 sa	100		
		GD 48 sa	100		

DD yönteminin SMD yöntemiyle karşılaştırılarak AMB, VOR, İTZ ve KAS için farklı saatlerdeki kategorik uyumu ve küçük hata, büyük hata ile çok büyük hata oranları Tablo 15'te verilmiştir. Aşağıda iki yöntem arasında yapılan değerlendirmeler, SMD yöntemi için CLSI M38-A2 belgesinde ve DD yöntemi için CLSI M51-A belgesinde önerilen saatlere göre yapıldı. Tüm türler için iki yöntem arasında en iyi uyum VOR ve KAS ilaçları ile saptandı (%99.1 ve %100). En düşük uyum AMB ile bulundu (%65.1). İTZ ile %77.3 uyum saptandı.

Aspergillus türlerini ayrı ayrı değerlendirdiğimizde, *A. fumigatus* izolatları için DD ile SMD yöntemi arasında, AMB (%98.4), VOR (%98.4), KAS (%100) ilaçları için yüksek uyum oranları bulundu. İTZ için uyum oranları (%66.2) ise diğer ilaçlara göre daha düşük bulundu. İki yöntem arasında AMB ve VOR için küçük hata %1.6 saptanmış olup, İTZ için %32.2 küçük, %1.6 oranında çok büyük hata saptandı.

A. flavus izolatları için İTZ (%92.9), VOR (%100), KAS (%100) ilaçlarında DD ve SMD yöntemi arasındaki kategorik uyum yüksek saptandı. AMB için ise uyum oranı düşük (%7) olup hata oranı yüksek (%36'sı çok büyük hata) bulundu.

A. terreus izolatları için VOR ve KAS ile kategorik uyum oranı %100 bulundu. İTZ ve AMB ile uyum daha düşük (sırasıyla %56.3 ve %31.3) bulundu. Çok büyük hata iki ilaç için de saptanmadı. İTZ ile %37.5 küçük, %6.3 büyük hata saptanırken, AMB ile %37.5 küçük, %31.3 büyük hata saptandı.

Tablo 15 : Tüm *Aspergillus* türlerinin DD yönteminin SMD yöntemiyle kategorik uyum ve hata oranları

TÜR	ANTİFUNGAL		HATA (%)			
		SMD-DD (saat)	KÜÇÜK	BÜYÜK	ÇOK BÜYÜK	UYUM (%)
A. fumigatus (n=62)	Amfoterisin B	24-24	1.6			98.4
		48-48	14.5	43.5		41.9
		48-24	1.6			98.4
	Vorikonazol	24-24				100
		48-48	1.6			98.4
		48-24	1.6			98.4
	İtrakonazol	24-24	22.6	1.6		75.8
		48-48	36.1	11.3		51.6
		48-24	32.2		1.6	66.2
	Kaspofungin	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100
A. flavus (n=28)	Amfoterisin B	24-24	10.7	89.3		0
		48-48	57.1	35.7		7.1
		48-24	57.1		36	7.1
	Vorikonazol	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100
	İtrakonazol	24-24	7.1			92.9
		48-48	21.4			78.6
		48-24	7.1			92.9
	Kaspofungin	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100
A. terreus (n=16)	Amfoterisin B	24-24	25	50		25
		48-48	37.5	31.3		31.3
		48-24	37.5	31.3		31.3
	Vorikonazol	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100
	İtrakonazol	24-24	6.3			93.8
		48-48	37.5	6.3		56.3
		48-24	37.5	6.3		56.3
	Kaspofungin	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100
Toplam (n=106)	Amfoterisin B	24-24	7.5	31.1		61.3
		48-48	29.3	39.6		31.1
		48-24	23.6	11.3		65.1
	Vorikonazol	24-24				100
		48-48	0.9			99.1
		48-24	0.9			99.1
	İtrakonazol	24-24	16	0.9		83
		48-48	33	7.5		59.4
		48-24	21.7		0.9	77.3
	Kaspofungin	24-24				100
		48-48				100
		48-24				100

GD yönteminin SMD yöntemiyle karşılaştırılarak AMB, VOR ve İTZ için 24-24, 48-48 ve 48-24. saatlerdeki; KAS ile 24-24, 48-48, 24-48. saatlerdeki kategorik uyumu ve küçük hata, büyük hata, çok büyük hata oranları Tablo 16'da verilmiştir. Aşağıda yapılan değerlendirmelerde SMD yöntemi için CLSI M38-A2 de önerilen saatlerdeki, GD yöntemi için tüm ilaçların 24. saatteki sonuçları dikkate alındı. Tüm türler için iki yöntem arasında uyum değerlendirildiğinde, en yüksek kategorik uyum oranları, DD yönteminde olduğu gibi VOR ve KAS (%99.1-%100) ile saptandı. AMB ve İTZ ile uyum oranları (sırasıyla %79.2 ve %87.8), VOR ve KAS'a göre düşük olmakla birlikte DD yöntemindeki uyum oranlarına göre (sırasıyla %65.1 ve %77.3) daha yüksek bulundu. Tüm ilaçlar için en iyi kategorik uyum zamanı, DD yönteminde bulunduğu gibi SMD yönteminin 48. saatte, GD yönteminin 24. saatte okunduğu zaman olarak belirlendi.

Tüm türler için ayrı ayrı değerlendirdiğimizde, *A. fumigatus* izolatları için iki yöntem arasında AMB, VOR, KAS ile yüksek uyum oranları (sırasıyla %100, %98.4, %100) bulundu. Diğer ilaçlar ile karşılaştırıldığında İTZ ile uyum görece olarak daha düşük (%79.1) saptanmış olup, %19.3 küçük hata, %1.6 çok büyük hata oranı belirlendi (Tablo 16).

A. flavus izolatları için, GD yöntemiyle AMB hariç tüm ilaçlar için kategorik uyum %100 olarak saptandı. AMB ile uyum, DD yönteminden (%7.1) daha yüksek olmakla birlikte diğer ilaçlara göre düşük (%57.1) bulundu.

A. terreus izolatları için. *A. flavus* izolatlarında saptandığı gibi AMB hariç diğer tüm ilaçlarda uyum %100 saptanırken AMB'de uyum DD yönteminde saptanan değer ile aynı (%31.3) bulundu. Fakat DD yönteminden (%31.3 büyük hata, %37.5 küçük hata) farklı olarak hiç büyük veya çok büyük hata saptanmamış sadece küçük hata (%62.6) saptanmıştır. SMD ve GD yöntemlerinin her ikisi de 24. saatte okunduğunda *A. terreus* izolatlarında, AMB için uyum %93.7 olarak saptanmıştır.

Tablo 16: Tüm *Aspergillus* türlerinin GD yönteminin SMD yöntemiyle kategorik uyum oranları

		HATA				
TÜR	ANTİFUNGAL	SMD-GD (saat)	KÜÇÜK	BÜYÜK	ÇOK BÜYÜK	UYUM (%)
		24-24				100
		48-48	3.2			96.8
	Amfoterisin B	48-24				100
		24-24				100
		48-48	1.6			98.4
	Vorikonazol	48-24	1.6			98.4
		24-24	19.4			80.6
		48-48	62.9			37.2
	İtrakonazol	48-24	19.3		1.6	79.1
		24-24				100
		48-48				100
A. fumigatus (n=62)	Kaspofungin	48-24				100
		24-24	35.7			64.3
		48-48	67.9	14.3		17.8
	Amfoterisin B	48-24	39.3		3.6	57.1
		24-24				100
		48-48				100
	Vorikonazol	48-24				100
		24-24				100
		48-48				100
	İtrakonazol	48-24				100
		24-24				100
		48-48				100
A. flavus (n=28)	Kaspofungin	48-24				100
		24-24	6.3			93.7
		48-48	62.4			37.6
	Amfoterisin B	48-24	62.6			31.3
		24-24				100
		48-48				100
	Vorikonazol	48-24				100
		24-24				100
		48-48				100
	İtrakonazol	48-24				100
		24-24				100
		48-48				100
A. terreus (n=16)	Kaspofungin	48-24				100
		24-24	10.4			89.6
		48-48	29.2	3.8		67
	Amfoterisin B	48-24	16		3.8	79.2
		24-24				100
		48-48	0.9			99.1
	Vorikonazol	48-24	0.9			99.1
		24-24	11.3			88.7
		48-48	36.7			63.3
	İtrakonazol	48-24	11.2		0.9	87.8
		24-24				100
		48-48				100
Toplam (n=106)	Kaspofungin	48-24				100

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda artan, hasta bakım teknolojileri ve tedavilerindeki yenilikler, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların kullanım alanlarının genişlemesi, hastaların, ciddi maya ve küf enfeksiyonlarına duyarlılığının hızla artmasıyla sonuçlanmıştır. Yaygın ve nadir saptanan küf türlerine karşı ortaya çıkan direncin yaygınlığı ve direnç mekanizmaları hala araştırılmaktadır. Bu direnç oranlarının artması nedeniyle küflere karşı yapılan antifungal duyarlılık testi, küf enfeksiyonlarının tedavileri için kullanılacak antifungal ajanların seçiminde yol gösterici olmaktadır (101,119).

Çok merkezli çalışmalar sonucunda CLSI, küf türleri için referans sıvı mikro-makrodilüsyon yöntemi geliştirmiştir (M38-A2) (12). Bu yöntemin zahmetli olması, çok zaman alması ve tecrübe istemesi nedeniyle basit, hızlı, uygun maliyetli duyarlılık yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. CLSI 2010 yılında, ortak bir çalışma ile dermatofit dışındaki filamentli mantarlara karşı kullanılan beş antifungal ajan için (AMB, VOR, İTZ, KAS ve PSZ) DD yöntemini önermiştir (M51-A). Bu yöntem, hem SMD yöntemine göre 8 ile 24 saat önce sonuç vermekte, hem de klinik laboratuvarlarda rahatça ulaşılabilecek saf MHA kullanılarak daha uygun maliyet sağlamaktadır (13). DD yönteminin dezavantajı, MİK/MEK değerlerinin belirlenememesi ve kalitatif sonuç vermesidir. Bunun için GD yöntemi geliştirilmiş ve pek çok çalışma yapılmıştır. Fakat günümüzde GD yöntemi için onaylanan standart bir klavuz bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 106 *Aspergillus* izolatının (62 *A. fumigatus*, 28 *A. flavus* ve 16 *A. terreus*), AMB, İTZ, VOR ve KAS'e karşı in vitro antifungal duyarlılığı SMD, GD ve DD yöntemi ile araştırıldı. Tüm yöntemlerle 24. ve 48. saatte yapılan okumalar kaydedildi. SMD ve DD yöntemi, CLSI M38-A2 ve CLSI M51-A klavuzundaki önerilere göre çalışıldı. GD yönteminde standart bir klavuz bulunmadığı için, CLSI M51-A'da DD yöntemi için önerilen saf MHA kullanılarak ve üreticinin önerileri de dikkate alınarak çalışıldı.

SMD yöntemi ile tüm izolatlar için 24. saat sonuçları çok rahat okunabildi. VOR ve İTZ için okunan 24. ve 48. Saat $MİK_{90}$ değerleri arasında ±1 dilüsyondan daha az fark bulundu. VOR ile bazı izolatlarda 24. ve 48. saat sonuçları arasında ±2 dilüsyon fark olsa da her iki zaman diliminde elde edilen VOR MİK değerleri ≤1 µg/ml olduğundan, literatürdeki çalışmaların önerdiği gibi bizim verilerimiz de İTZ ve VOR

sonuçlarının daha erken sonuç vermek adına 24. saatte de değerlendirmelerinin yapılabileceğini desteklemektedir (107,120).

Çalışmamızda SMD yöntemiyle AMB'nin 24. ve 48. saatte okunan $MİK_{90}$ değerleri arasındaki fark ±1 dilüsyon içinde kalsa da, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için AMB MİK değerleri 48. saatte genellikle yüksek (*A. flavus* $MİK_{90}$: 2 µg/ml, *A. terreus* $MİK_{90}$: 4 µg/ml) bulunmuştur. Aslında net eşik değerler olmasa da bu sonuçlarda saptanan AMB MİK değerleri, duyarlılığın değiştiği eşik değerlere denk geldiği için, triazoller için yaptığımız öneriyi AMB için yapamıyoruz.

Çalışmamızda SMD yöntemiyle 48. saatte AMB ile en düşük MİK değerleri (AMB $MİK_{90}$: 1 µg/ml) *A. fumigatus* izolatlarında saptandı (Tablo 10). Farklı çalışmalarda *A. fumigatus* izolatları için 48. saat $MİK_{90}$ değerleri 2-4 µg/ml aralığında saptanmış olup bizim izolatlarımıza göre daha yüksek bulunmuştur (110,120,121). Çalışmamızda *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının SMD yöntemiyle 48. saat AMB $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 2 µg/ml ve 4 µg/ml olup, *A. fumigatus* izolatlarına ($MİK_{90}$: 1 µg/ml) göre daha yüksek saptanmıştır. Literatürde de bizim çalışmamıza benzer şekilde, aynı yöntem ve saatlerde *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarında AMB $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 2 µg/ml ve ≥4 µg/ml olarak saptanmıştır (110,120,121). *A. terreus* için AMB direnci beklenen bir durum iken, *A. flavus* için de son zamanlarda AMB MİK değerlerinin yüksek saptandığı yayınlar bulunmaktadır (110,120,122). Fakat standart eşik değerleri olmadığı için bu yüksekliğin direnci gösterip göstermediği konusunda net bilgi yoktur.

Çalışmamızda, referans SMD yöntemiyle 48. saatte VOR $MİK_{90}$ değerleri 0.5 µg/ml saptanmış olup literatürdeki verilerle benzer (0.5-2 µg/ml) bulunmuştur. Tür düzeyinde incelediğimizde, *A. fumigatus* izolatları için çalışmamızda VOR $MİK_{90}$ değeri 0.25 µg/ml saptanırken diğer çalışmalarda VOR $MİK_{90}$ değerleri 1-2 µg/ml arasında bulunmuştur. *A. flavus* ve *A. terreus* için VOR $MİK_{90}$ değerlerimiz (iki tür için de 0.5 µg/ml) literatürle (iki tür için de 0.5-1 µg/ml) benzer bulunmuştur (112,124,125).

Çalışmamızda, *Aspergillus* türleri için SMD yöntemiyle 48. saat İTZ $MİK_{90}$ değeri 2 µg/ml bulunurken, farklı çalışmalarda daha düşük (0.25-1 µg/ml) saptanmıştır .Tür düzeyinde baktığımızda, çalışmamızda *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 2 µg/ml, 1 µg/ml ve 1 µg/ml olarak

belirlendi. Espinel-Ingroff ve ark.'ın (110) 2002 yılında yaptıkları çalışmada İTZ $MİK_{90}$ değerleri aynı sırayla 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml ve 0.25 µg/ml, Şirin Efe ve ark.'ın (120) 2007 yılındaki çalışmasında sırasıyla 1 µg/ml, 1 µg/ml ve 0.25 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara baktığımızda, tüm *Aspergillus* türleri için İTZ MİK değerlerinin yıllar içinde arttığı söylenebilir.

Çalışmamızda, SMD yöntemiyle 24. saatte KAS MEK_{90} değerleri *A. fumigatus* izolatlarında, 0.06 µg/ml, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarında 0.03 µg/ml olarak saptandı. Lamoth ve ark.'ın (121) çalışmasında, KAS MEK_{90} değerleri *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için sırasıyla 0.06 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.03 µg/ml olarak saptanmış olup çalışmamıza yakın değerler bulunmuştur.

Tüm ilaçlar ve tüm *Aspergillus* türleri dikkate alındığında çalışmamızda da önceki çalışmalara benzer şekilde SMD yönteminde en düşük MEK değerleri KAS ile saptanmıştır (Şekil 12-17) (121,123,124).

Aspergillus türleri için ülkemizde yapılan çalışmalarda SMD yöntemiyle 48. saatte, AMB, VOR ve İTZ ile saptanan $MİK_{50}$ değerleri sırasıyla 0.25-2 µg/ml, 0.25-0.5 µg/ml, 0.25-1 µg/ml aralıklarında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da aynı koşullarda AMB, VOR ve İTZ için saptanan $MİK_{50}$ değerleri sırasıyla 1 µg/ml, 0.25 µg/ml ve 1 µg/ml olarak bulunmuş olup önceki çalışmalarda saptanan aralıklar içindedir (120,124,125).

A. fumigatus izolatları için SMD yöntemiyle 24. saatte, çalışmamızda saptanan KAS MEK değerleri (MEK_{50}: 0.03), Gürcan ve ark.'ın (124) çalışmasında saptadıkları KAS MEK değerlerine (MEK_{50}: 0.06) yakın bulunmuştur.

Tüm *Aspergillus* türleri için GD yöntemiyle 24. saatte, çalışmamızda saptadığımız KAS MEK değer aralıkları (0.015-0.5 µg/ml), ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan (Şirin Efe ve ark. ≤0,032-0,25, Direkel ve ark. ≤0.006-0.12 µg/ml) daha geniş bulunmuştur (120,126). Ayrıca çalışmamızda saptanan KAS MEK_{90} değeri de (0.5 µg/ml), Şirin Efe ve ark'ın (120) çalışmasına göre (0.064 µg/ml) daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni GD yöntemini okumadaki zorluklar ve kullanılan besiyeri farklılıkları olabilir.

GD yöntemi için şu ana kadar farklı çalışmalarda pek çok farklı besiyeri kullanılmıştır. Espinel-Ingroff ve ark. (110) tarafından *Aspergillus* türleri için, SMD ve

GD yöntemi ile dört ilacın (AMB, İTZ, VOR ve PSZ) duyarlılıkları karşılaştırılmış ve GD yöntemi için %2 dekstrozlu RPMI1640 agar kullanılmıştır. Bu çalışmada, %2 dekstrozlu RPMI1640 agar 24. saatte beş türden dördünün üremesini desteklemiştir. *A. terreus* izolatlarının 24. saatte üremesini desteklememiştir (110). Bizim çalışmamızda GD yönteminde kullandığımız saf MHA, 24. saatte *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatlarının üremesini desteklerken, bazı *A. terreus* izolatlarının sonuçları 24. saatte değerlendirilemeyip, 27. ve 28. saatlerde tekrar değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda GD yönteminin (24. saat sonuçları) SMD yöntemiyle (48. saat sonuçları) en iyi temel uyum oranları, İTZ ile ±1 ve ±2 dilüsyonlarda sırasıyla %98.2 ve %100 olarak elde edildi. Her iki yöntem 48. saatte değerlendirildiğinde ise en iyi temel uyum oranları, VOR ile ±1 ve ±2 dilüsyonlarda sırasıyla %93.6 ve %99.1 olarak bulundu.

Çalışmamızda GD yöntemi SMD yöntemi (bu değerlendirmeler SMD yönteminin AMB, VOR, İTZ için 48. saat sonuçları, KAS için 24. saat sonuçları ile karşılaştırılarak yapılmıştır) ile karşılaştırıldığında, AMB ile ±2 dilüsyonda temel uyum oranları, tüm izolatlar için, en yüksek GD yönteminin 48. saatte okunduğu zamanda %91.6 olarak saptandı (Tablo 11). Espinel-Ingroff ve ark. (110), AMB ile ±2 dilüsyonda en iyi temel uyum oranını, bizim çalışmamızdan farklı olarak GD yöntemini 24. saatte okuduklarında %91.7 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda VOR için GD yöntemiyle 24. ve 48. saatte değerlendirdiğimiz temel uyum oranları (%97.2 ve %99.1), iki zaman diliminde de Espinel-Ingroff ve ark.'nın uyum oranlarından (%93.8 ve %96.3) daha yüksek bulunmuştur. İTZ için, bizim çalışmamızda 24. ve 48. saatlerde (%100 ve %100), Espinel-Ingroff ve ark.'nın (110) yaptığı çalışmadaki uyum oranlarından (%91.8 ve %82.2) daha yüksek uyum oranları bulundu. Szekely ve ark. (127), 10 farklı cins ve türde filamentöz mantar ile yaptıkları çalışmada GD yöntemi için %2 glikozlu RPMI1640 agar kullanmışlardır. Bu çalışmada, GD yöntemi 48. saat sonuçlarını, SMD yöntemiyle karşılaştırdıklarında ±1 ve ±2 dilüsyondaki uyumları AMB için sırasıyla %54 ve %71, İTZ için %69 ve %88 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda her iki ilaç ve dilüsyon için uyum daha yüksek (AMB: %79.3 ve 91.6, İTZ: %91.5 ve 100) saptandı. Lamoth ve ark. (121) da GD yönteminde besiyeri olarak %2 glikozlu RPMI1640 agar kullanmışlardır. Bu çalışmada, *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatları için AMB ve VOR ile saptanan temel uyum oranları, bizim çalışmamız ile saptanan temel uyum oranlarına yakın (>%90) bulunmuştur. Aynı çalışmada, *A.*

terreus izolatları için AMB ilacında uyum %16, bizim çalışmamızda ise %93.7 bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatları için KAS uyum oranları sırasıyla %96 ve %100 olarak saptanırken, bizim çalışmamızda ise bu türler için KAS uyum oranları sırasıyla %15.8 ve % 50.1 olarak belirlendi. Lamoth ve ark.'nın (121) SMD yöntemi ile 24. saatte *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* türleri için elde ettiği KAS MEK_{90} değerleri (sırasıyla 0.06 µg/ml, 0.015 µg/ml ve 0.06 µg/ml) aynı türler için çalışmamızda SMD yöntemiyle elde edilen değerlere (0.06 µg/ml, 0.03 µg/ml ve 0.03 µg/ml) yakın bulunmuştur. Fakat Lamoth ve ark.'larının (121) GD yöntemi ile *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* için saptadığı MEK_{90} değerleri (sırasıyla 0.06 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.06 µg/ml) çalışmamızda GD yöntemi ile elde ettiğimiz MEK_{90} değerlerinden (sırasıyla 0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.12 µg/ml) düşük bulunmuştur. Bu durum çalışmamızda GD yöntemi ile elde ettiğimiz KAS MEK90 değerlerinin SMD ile elde ettiğimizden bir miktar yüksek olduğunu vurgulamaktadır.

Pfaller ve ark. (128), *Aspergillus* türleri için GD yöntemini SMD yöntemiyle, İTZ ve VOR ilaçları için karşılaştırdıklarında, her iki yöntem de 48. saatte okunduğunda temel uyum oranlarını sırasıyla % 95.8 ve %97,6 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da aynı koşullarda elde ettiğimiz uyum oranları (sırasıyla %100 ve %99.1) benzer bulundu.

Denardi ve ark. (123), İTZ dirençli *A. fumigatus* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada, azoller ve ekinokandinler için GD yöntemiyle SMD yöntemini karşılaştırmışlardır. Çalışmamızdan farklı olarak, SMD yöntemi, EUCAST kurallarına göre çalışılmış ve GD yöntemi için %2 glukoz eklenmiş RPMI 1640 agar kullanılmıştır. VOR, İTZ ve KAS için temel uyum oranları (sırasıyla %100, %93.3, %46,6) bizim çalışmamızdaki *A. fumigatus* izolatlarının aynı ilaçlarla, temel uyum oranlarına (sırasıyla %100, %100, %15.8) yakın (KAS hariç) saptanmıştır. KAS için temel uyum oranının bizim çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da düşük olduğu göze çarpmaktadır. Belirtilen çalışmada, KAS için her iki yöntemle saptanan MEK_{90} değerleri (GD yöntemiyle 24.saatte 0.5 µg/ml, SMD yöntemiyle 24. saatte 0.06 µg/ml) bizim çalışmamızla aynı bulunmuştur.

Fuller ve ark.'nın (129), SMD ve GD yöntemini KAS için karşılaştıran çalışmasında, temel uyum oranları *A. fumigatus, A. flavus* ve *A. terreus* için sırasıyla %11, %23 ve %67 olarak bulunmuştur. Bu oranlar, bizim çalışmamızda saptadığımız

oranlardan (sırasıyla %15.8, %50.1, %100) çok daha düşüktür. Belirtilen çalışmada, *Aspergillus* izolatlarında KAS MEK_{90} değerleri SMD yöntemiyle GD yöntemine göre daha yüksek bulunurken çalışmamızda bu durum tam tersi şekilde gerçekleşmiştir. Espinel-Ingroff'un (130) çalışmasında, SMD ve GD yöntemi arasında ±2 dilüsyonda KAS temel uyum yüzdeleri *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için sırasıyla %80, %38 ve %69.2 bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla (sırasıyla %15.8, %50.1 ve %100) örtüşmemektedir. Bu çalışmada bulunan KAS MEK_{90} değerleri de bizim çalışmamızla farklılık göstermektedir. Literatürdeki bu veriler, *Aspergillus* türleri için yapılan KAS duyarlılık testinde farklı yöntemler arasında uyumun yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Martos ve ark.'ın (131) çalışmasında, SMD ve GD yöntemiyle 24. saatte ±2 dilüsyonda KAS temel uyum oranları, *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için sırasıyla %90.4, %83.3, %82.4 olarak bulunmuş olup, *A. terreus* izolatları hariç uyum bizim çalışmamızdan daha yüksek saptanmıştır. Bu çalışmada, tüm türler için SMD yöntemiyle saptadıkları KAS MEK değerlerinin geometrik ortalamaları ise bizim değerlerimize yakındır.

KAS MEK değerleri için, literatürdeki çalışmaların kendi aralarında ve çalışmamız ile arasındaki uyumsuzluklarının nedeni, hem SMD hem de GD yönteminin sonuç değerlendirme zorlukları (mikrokoloniler ayırtedebilme), kişiler arası değerlendirme farklılıkları ve GD yöntemi için kullanılan besiyeri farklılıkları olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda, SMD ve GD yöntemleri arasındaki KAS için temel uyum oranları düşük bulunsa da, tüm türler için, her iki yöntemle KAS MEK değerleri genellikle ≤1 µg/ml saptandığı için bu durum SMD ve GD yöntemi arasındaki kategorik uyumu etkilememiştir.

Ülkemizde yapılan iki ayrı çalışmada, Şirin Efe ve ark. (120) ile Özkütük ve ark. (125) farklı *Aspergillus* türleri için, SMD yöntemi ile besiyeri olarak %2 glukoz ilaveli RPMI1640 agar kullandıkları GD yöntemini karşılaştırmışlardır. Şirin Efe ve ark.'ın (120) yaptıkları çalışmada, her iki yöntem sonuçları 48. saatte değerlendirildiğinde ±2 dilüsyonda temel uyum oranları, AMB, VOR ve İTZ için sırasıyla %75, %96 ve %86 olarak saptanmıştır. Özkütük ve ark.'ın (125) yaptığı çalışmada iki yöntem arasında aynı değerlendirme saatlerinde ±2 dilüsyonda temel uyum oranları, AMB, VOR ve İTZ için sırasıyla %69, %81 ve %72 olarak

saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da her iki yöntem aynı saatlerde değerlendirildiğinde ±2 dilüsyonda temel uyum oranları, tüm ilaçlar için iki çalışmaya göre daha yüksek (AMB, VOR ve İTZ için sırasıyla %91.6, %99.1 ve %100) bulunmuştur.

SMD ve GD yöntemleriyle 48. saatte elde ettiğimiz uyum oranlarını tür düzeyinde literatür ile karşılaştırdığımızda, Şirin Efe ve ark.'ın (120) yaptığı çalışmada, *A. fumigatus* izolatları için, ±2 dilüsyonda temel uyum oranları AMB, VOR ve İTZ ile sırasıyla %71, %99 ve %88 olarak saptanırken, bizim çalışmamızda aynı ilaçlar için ±2 dilüsyonda temel uyum oranları (sırasıyla %92, %100 ve %100) daha yüksek saptandı. *A. flavus* izolatları için Şirin Efe ve ark.'nın (120) çalışmasında, ±2 dilüsyonda temel uyum oranları AMB ile %48, VOR ile %91, İTZ ile %84 olarak saptanırken bizim çalışmamızda ±2 dilüsyonda uyum oranları aynı ilaçlar için sırasıyla %84 (AMB sonuçları GD yöntemiyle 24. Saatte okunduğunda %100), %96.4 ve %100 olarak saptandı. *A. terreus* izolatları için aynı çalışmada, AMB, VOR ve İTZ için sırasıyla %50, %100 ve %90 uyumlu bulunurken, bizim çalışmamızda bu ilaçlar için sırasıyla %93.7, %100 ve %100 uyumlu bulundu. Belirtilen bu çalışmaya göre, bizim çalışmamızda iki yöntem arasında başta AMB olmak üzere, tüm türler ve ilaçlarda daha yüksek uyum elde edildi (120). Şirin Efe ve ark. (120), tür düzeyinde iki yöntem arasındaki en iyi uyumu, *A. fumigatus* izolatları için saptarken, biz çalışmamızda tür düzeyinde en iyi uyumu, *A. terreus* izolatları ile saptadık.

Bu sonuçlara göre, *Aspergillus* türleri için GD yönteminde saf MHA kullanarak, diğer besiyerlerine benzer hatta bazı ilaçlar için çok daha uyumlu (KAS temel uyum oranları hariç) sonuçlar elde ettik (120,121,125). Saf MHA, aynı zamanda tüm rutin laboratuvarlarda bulunan ucuz ve kolay ulaşılabilir bir besiyeri olmasıyla ve diğer kullanılan besiyerlerine göre daha kolay hazırlanmasıyla avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızda SMD yöntemiyle 48. saat AMB MİK değerleri, *A. fumigatus* izolatlarının tümünde ≤1 µg/ml saptanırken, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının sırasıyla %64.3 ve %68.7'sinde MİK değerleri >1 µg/ml saptandı. Farklı çalışmalarda da, bizim çalışmamıza benzer şekilde SMD yöntemiyle 48. saat AMB MİK değerleri *A. fumigatus* izolatları için daha düşük (≤1 µg/ml), *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için daha yüksek (>1 µg/ml) saptanmıştır (112,124,125).

Çalışmamızda *A. fumigatus* izolatlarının biri (MİK:2 µg/ml) hariç tüm *Aspergillus* izolatlarında SMD yöntemiyle 48. saat, GD yöntemiyle 24. saatte değerlendirildiğinde VOR MİK değerleri ≤1 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir (Tablo 12) (112,124,125).

Çalışmamızda SMD yöntemiyle 48. saatte İTZ MİK değerleri, tüm türler bir arada değerlendirildiğinde %84.9'unda ≤1 µg/ml saptandı. *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının tümünde İTZ MİK değerleri ≤1 µg/ml saptanırken, *A. fumigatus* izolatlarının %26'sında >1 µg/ml bulundu. Şirin Efe ve ark.'nın (120) yaptığı çalışmada SMD yöntemiyle 48. saatte, tüm türlerin %91.4'ünün İTZ MİK değerleri ≤1 µg/ml olarak saptanmış olup bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamız ve literatür verilerine baktığımızda, *A. fumigatus* izolatlarında İTZ MİK değerlerinin yükselme eğiliminde olduğunu söyleyebiliriz (110,120).

Çalışmamızda tüm *Aspergillus* türlerinde hem SMD hem GD yöntemiyle 24. saatte KAS MEK değerleri ≤1 µg/ml saptandı. Literatürdeki diğer çalışmalarda da genellikle KAS MEK≤1 µg/ml bulunmuştur (121,123,124,130,131).

Tablo 15'de SMD yöntemi ve DD yönteminin duyarlılık sonuçları karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasında kategorik uyum, küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata oranları karşılaştırılırken, Espinell-Ingroff ve ark.'ın (118) *Aspergillus* türleri ile birlikte çeşitli küf mantarlarını dahil ettiği çalışmalarındaki eşik değerler kullanılmıştır. Fakat bu eşik değerler CLSI veya başka bir kuruluş tarafından onaylanmamıştır. Prashant Gupta ve ark.'ın (107) SMD, DD ve GD yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada, *A. fumigatus, A. flavus* ve *A. terreus* türleri çalışmaya dahil edilmiş ve eşik değer olarak da tüm ilaçların türlere göre ECV'leri kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda ve bahsedeceğimiz diğer çalışmalarda tüm *Aspergillus* türleri için, DD yönteminin SMD yöntemiyle kategorik uyum oranları, CLSI M38-A2 ve CLSI M51-A da önerilen inkübasyon zamanlarında değerlendirilen sonuçlara göre karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, tüm *Aspergillus* türleri bir arada değerlendirilerek SMD ve DD yönteminin kategorik uyum oranları karşılaştırıldığında, Espinell-Ingroff ve ark.'ın (118) (%96) ve Gupta ve ark.'ın (107) (%100) sonuçlarına benzer şekilde en yüksek kategorik uyum oranı KAS (%100) ile saptandı. Ayrıca, çalışmamızda VOR ile uyum %99.1 (Espinell-Ingroff ve ark. %86, Gupta ve ark. %93.8), İTZ ile

uyum %77.3 (Espinel-Ingroff ve ark %83) bulundu. Çalışmamızda tüm ilaçlar arasında en düşük uyum AMB ile %65.1 (Espinell ve ark.%73, Gupta ve ark. %87.5) olarak saptandı (107,118). Genel olarak tüm ilaçlar için iki yöntem arasındaki kategorik uyum verileri, diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda tür düzeyinde AMB ile kategorik uyuma baktığımızda *A. fumigatus* izolatları için %98.4 saptanırken, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarında (sırasıyla %7.1 ve %31.1) daha düşük bulunmuştur. Gupta ve ark.'nın (107) yaptığı çalışmada AMB ile *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatlarında %75, *A. terreus* izolatlarında %100 kategorik uyum bulunmuştur. Çalışmamızda *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarında AMB için uyum oranlarının düşük olmasının nedeninin, bu suşlar için saptanan MİK değerlerinin eşik değerlere yakın bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde, SMD ve DD yöntemlerini kategorik uyum açısından tür düzeyinde karşılaştıran az sayıdaki araştırmada, farklı eşik değerlerinin kullanılması ve farklı cinsteki küf mantarlarının sonuçlarının birlikte verilmesi nedeniyle çalışmamızda *A. flavus* ve *A. terreus* için saptanan düşük uyum oranları hakkında tam bir yorum yapamıyoruz (107,118). Bu nedenle her iki yöntem arasındaki uyumu incelemek için daha fazla sayıda izolat ile yapılacak çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Bu çalışmalara göre eşik değerler de tekrardan gözden geçirilebilir.

Çalışmamızda, GD yönteminin SMD yöntemi ile tür düzeyinde kategorik uyumu (SMD yöntemi CLSI M38-A2 klavuzunda önerilen saatlerde, GD yöntemi 24. saatte okunduğunda) tüm ilaçlar için en iyi *A. fumigatus* izolatlarında (AMB %100, VOR %98.4, İTZ %79.1, KAS %100) saptandı. *A. flavus* izolatları için kategorik uyum AMB, VOR, İTZ ve KAS ile sırasıyla %57.1, %100, %100 %100 olarak belirlendi. *A. terreus* izolatları için kategorik uyum AMB için %31.3, VOR, İTZ ve KAS için %100 saptandı. Gupta ve ark.'ın (107) yaptığı çalışmada her iki yöntem 48. saatte değerlendirildiğinde, *A. fumigatus* ve *A. terreus* izolatları için AMB, VOR ve KAS ile %100, *A. flavus* izolatları için AMB ve VOR ile %75, KAS ile %100 kategorik uyum saptanmıştır. Bu çalışmada saptanan uyum oranlarının bizim çalışmamızdan yüksek olmasının nedeni, bu çalışmada doza bağımlı duyarlı kategorisinin bulunmaması olabilir (107). Literatürde, SMD ve GD yöntemi arasındaki kategorik uyumu karşılaştıran başka çalışma bulamadığımız için sonuçlarımızı tek bir çalışma ile karşılaştırabildik.

Çalışmamızda GD yönteminin SMD yöntemiyle, kategorik uyum verilerine baktığımızda, DD yöntemindeki gibi diğer ilaçlara göre AMB ile daha düşük uyum (%79.2) saptandı. AMB ile tür düzeyinde kategorik uyum oranları değerlendirildiğinde, *A. fumigatus* (%100) izolatlarında daha yüksek uyum, *A. flavus* (%57.1) ve *A. terreus* (%31.3) izolatlarında ise daha düşük uyum bulundu. Bu durumun, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarının çoğunda AMB MİK değerlerinin her iki yöntemle de '1-2 µg/ml' arasında bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bu izolatların SMD ve GD yöntemleri ile ±1 (*A. flavus* %85.7, *A. terreus* %81.1) ve ±2 dilüsyon temel uyum oranlarının (*A. flavus* %100, *A. terreus* %93.7) yüksek bulunması bu düşüncemizi desteklemektedir. Ayrıca, iki yöntem arasında AMB'de büyük veya çok büyük hata değil daha çok küçük hata oranının bulunması da (%3.8) görüşümüzü destekleyen başka bir noktadır.

DD ve GD yöntemini, SMD yöntemi ile karşılaştırdığımızda, kategorik uyum oranları, GD yöntemi ile DD yöntemine göre daha yüksek elde edildi. Bu sonuç GD yönteminde saf MHA kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

GD yöntemini SMD yöntemi ile karşılaştırdığımızda, en iyi kategorik uyum, referans SMD yöntemi sonuçları CLSI M38-A2 klavuzunda önerilen saatlerde değerlendirildiğinde, tüm *Aspergillus* türleri için (*A. terreus*/AMB hariç) GD yöntemi 24. saatte okunduğunda saptandı. *A. terreus* izolatları için ise AMB için en iyi uyum, her iki yöntem 24. saat okunduğunda elde edildi. Bu nedenle MHA kullanılarak uygulanan GD yönteminin 24. saatte değerlendirilmesinin daha uygun olduğu düşünülebilir.

A. terreus izolatları için CLSI M51-A'da DD yöntemiyle tüm ilaçlar için sonuçların 48. saatte okunması önerilmektedir. Bizim çalışmamızda DD ve GD yöntemlerinin SMD yöntemi ile kategorik uyum oranlarının 24. saat (bazı izolatlar 27. saatte değerlendirilebilmiş) ve 48. saat sonuçları benzer bulunmuştur. Bu nedenle sonuçların daha erken verilebilmesi için diğer türlerde önerildiği gibi *A. terreus* izolatlarının da 24. saatte değerlendirilmesi düşünülebilir.

5. SONUÇ

Aspergillus türleri için SMD yöntemiyle 24. ve 48. saatte değerlendirdiğimiz VOR ve İTZ $MİK_{90}$ değerleri arasında ±1 dilüsyondan daha az fark bulundu. VOR ile bazı izolatlarda 24. ve 48. saat sonuçları arasında ±2 dilüsyon fark olsa da her iki zaman diliminde elde edilen MİK değerleri ≤1 µg/ml olarak belirlendi. Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde bizim verilerimiz de, İTZ ve VOR MİK değerlerinin, daha erken sonuç verebilmek adına 24. saatte de değerlendirmelerinin yapılabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızda referans SMD yöntemi ile en düşük MİK/MEK değerleri, KAS ile alındı. Bunu VOR izlemektedir. AMB ve İTZ MİK sonuçları türler arasında farklılık göstermekle birlikte, *A. fumigatus* izolatlarında, AMB MİK değerleri, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatlarına göre daha düşük bulunmuştur. *A. terreus* izolatları için AMB direnci bilinirken son zamanlarda farklı çalışmalarda *A. flavus* izolatları için de AMB MİK değerleri yüksek saptanmaya başlamıştır. Saptanan MİK değerlerinin in vivo yansımasını tahmin etmek için ileri çalışmalar gereklidir. İTZ MİK değerleri ise, *A. fumigatus* izolatları için yüksek bulunurken, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için daha düşük saptanmıştır. Literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında tüm *Aspergillus* türleri için İTZ MİK değerlerinin yıllar içinde yükselmeye başladığı söylenebilir.

GD yöntemi SMD yöntemiyle karşılaştırıldığında, kategorik ve temel uyum oranlarının yüksek bulunması, GD yönteminin antifungal duyarlılığı belirlemek için kullanılabileceğini göstermektedir. GD yönteminin, kantitatif sonuç vermesi, uygulama kolaylığı ve kısa zamanda sonuçlanması gibi nedenlerle SMD yöntemine iyi bir alternatif olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca GD yöntemi için kullandığımız saf MHA'nın diğer besiyerlerine göre daha ucuz ve kolay ulaşılabilir olması ve kolay hazırlanması nedeniyle avantaj sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu konuyu tam olarak aydınlatmak için saf MHA ile RPMI 1640 agarın GD yönteminde kullanımlarını karşılaştıran daha kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

DD yöntemi ile SMD yöntemi arasında, her iki yöntem için önerilen saatlerde VOR ve KAS için yüksek kategorik uyum oranları bulunurken, AMB ve İTZ için daha düşük kategorik uyum oranları saptandı. Literatürde bu iki yöntemi karşılaştıran fazla sayıda araştırma olmadığı için çalışmamızda saptanan düşük uyum oranları hakkında tam bir yorum yapamıyoruz. Bu nedenle her iki yöntem arasındaki uyumu

incelemek için daha fazla sayıda izolat ile yapılacak çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

DD ve GD yöntemlerini, SMD yöntemi ile karşılaştırdığımızda, tüm *Aspergillus* türleri için en iyi kategorik uyumu, SMD yöntemi CLSI M38-A2 klavuzunda önerilen saatlerde okunduğunda, diğer iki yöntem ise 24. saatte değerlendirildiğinde saptadık (GD yöntemi *A. terreus* izolatları/AMB hariç). *A. terreus* izolatlarında AMB için en iyi kategorik uyum, SMD ve GD yöntemlerinin her ikisi de 24. saatte değerlendirildiğinde elde edildi.

Antifungal duyarlılık testleri için standart eşik değerler mevcut olmadığından, in vitro sonuçların klinik önemi henüz belirlenmemiştir. Bu nedenle in vitro sonuçlar ile klinik uyumu araştıran çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, et al. Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. 2013 Mar 15; 74(1):1–29.

2. Gülmez D. *Aspergillus fumigatus* kompleksi: zorlu bir patojende yeni bir sorun, azol direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2018;48(3):153–66.

3. Bhat RK, Ravichandra G. Invasive aspergillosis. Indian J Radiol Imaging. 2002;12(4):570–1.

4. Chen SCA, Sorrell T.A, Meyer W. Fungi- Aspergillus and Penicillium, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW , editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2015. p.2030-56

5. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. Sci Transl Med. 2012 Dec 19 ;4(165):165

6. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non- *fumigatus Aspergillus* species of significance. Mycoses 2009 May;52(3):206–22.

7. Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and ın vitro susceptibility to triazoles. J Clin Microbiol. 2014 Oct 1;52(10):3633–40.

8. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2008 Feb 1;46(3):327–60.

9. Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in ınvasive fungal ınfections. Drugs . 2011 Dec 24; 71(18):2405–19.

10. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, et al. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus CYP51A* based on protein homology modeling. Antimicrob agents chemother. 2010 Jun 1; 54(6):2425–30.

11. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an ıncreasing threat to human health. Heitman J, editor. PLoS Pathog. 2013 Oct 24; 9(10):e1003633.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard—2nd ed. M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for

antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi; Informational supplement, 1st ed. M51-A Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA,USA

14. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: Current approaches. Clin Microbiol Rev. 2020;33(3):1–30.

15. Sigler L, Kennedy MJ. *Aspergillus, Fusarium* and Other Opportunistic Moniliaceus Fungi, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1999. P.1212-42

16. Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: Lack of correlation. Med Mycol. 1998 Jun;36(3):165–8.

17. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. J Clin Microbiol . 1998 Jun;36(6):1494–500.

18. Kleinkauf N, Verweij PE, Arendrup MC, Donnelly PJ, et al. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. This report was sent for consultation to the European Food Safety Authority (EFSA). European Centre for Dise ase Prevention and Control. February 2013, Stockholm.

19. Lin S-J, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. Clin Infect Dis. 2001 Feb 1;32(3):358–66.

20. Gavaldà J, Meije Y, Fortún J, Roilides E, et al. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. Clin Microbiol Infect. 2014 Sep;20:27–48.

21. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? Clin Infect Dis. 2016 Feb 1;62(3):362–8.

22. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America., Clinical Infectious Diseases. Oxford University Press; Vol. 63, 2016. p. e1–60.

23. Kustimur S. *Aspergillus, Fusarium* ve diğer küf mantarları. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, ed. Topçu AW, Söyletir G, Doganay M, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1833-40.

24. Özyaral O. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. Ener B (ed). *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2006. p.30-41.

25. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect. 2018 May 1;24:e1–38.

26. Varga J, Szigeti G, Baranyi N, Kocsubé S et al. *Aspergillus*: Sex and Recombination. Mycopathologia. 2014 Nov 20;178(5–6):349–62.

27. Kantarcıoğlu Ay A.S. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 2003;34(3):140–57.

28. Krijgsheld P, Bleichrodt RJ, Veluw GJ van, Wang F, et al. Development of *Aspergillus*. Studies in Mycology 2013; 74: 1–29.

29. Kıdd S, Hallıday C, Alexıou H, Ellis D. *Aspergillus* Micheli ex Link. Descrıptıons of Medıcal Fungı. 3th Australia Newstyle Printing; 2016. p. 12-26

30. Larone DH.The genus Aspergillus. Medically important fungi : a guide to identification. Fifth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press:2011. p. 281-93

31. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999 Apr;12(2):310-50

32. Wasylnka JA, Moore MM. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. Infect Immun. 2000 Jun ;68(6):3377–84.

33. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 2003 Jul;16(3):497-516.

34. Yentür G, Er B. The evaluation of the aflatoxin presence in foods. Turk Hij ve Deney Biyol Derg. 2012; 69(1):41–52.

35. Zinedine A, González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, et al. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. Int J Food Microbiol. 2007 Feb;114(1):25–9.

36. Móricz Á, Fatér Z, Otta K, Tyihák E, et al. Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in red paprika. Microchem J - Microchem J. 2007 Jan 31;85:140–4.

37. Vijayalakshmi A, Sharmila R, Gowda NKS, Sindhu G. Study on antifungal effect of herbal compounds against mycotoxin producing fungi. 2014;10(6):1587–97.

38. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus.* Acta Biochim Pol. 2009; 56(2):211–24.

39. Tsai H, Washburn RG, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Aspergillus fumigatus* arp1 modulates conidial pigmentation and complement deposition . Mol Microbiol. 1997 Oct; 26(1):175–83.

40. Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, et al. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in modulation of conidial morphology and virulence. J Bacteriol. 1998 Jun;180(12):3031–8.

41. H F Kauffman , J F Tomee, M A van de Riet, A J Timmerman, P Borger. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to

morphologic changes and cytokine production. J Allergy Clin Immunol. 2000 Jun;105 (6 Pt 1):1185-93.

42. Rhodes JC, Bode RB, McCuan-Kirsch CM. Elastase production in clinical isolates of *Aspergillus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1988;10(3):165–70.

43. Donnelly JP. Revised definitions of ınvasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer/ınvasive. Clin Infect Dis. 2008; 46(12):1813–21.

44. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microb Biotechnol. 2017;10(2):296–322.

45. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for ıdentification of molds in the clinical mycology laboratory. J Clin Microbiol. 2014 Aug; 52(8):2797-803

46. Barton RC. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. Scientifica (Cairo). 2013;2013: 459405.

47. Andreas S, Heindl S, Wattky C, Möller K, et al. Diagnosis of pulmonary aspergillosis using optical brighteners. Eur Respir J. 2000;15(2):407–11.

48. Mcclenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Med Mycol. 2005 May;43 Suppl 1:S125-8.

49. Samson RA. The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. Contrib Microbiol. 1999;2:5–20.

50. Tümbay E. Fırsatçı mikozlar. Başustaoğlu AC (çeviri editörü), Murray PR, Rosenthal KS ve Phaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji kitabında. Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010; 751-774

51. Verweij PE, Poulain D, Obayashi T, Patterson TF et al. Current trends in the detection of antigenaemia, metabolites and cell wall markers for the diagnosis and therapeutic monitoring of fungal infections. Med Mycol. 1998;36 Suppl 1:146–55.

52. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invaziv aspergilloz mikoloji, patogenez, laboratuvar tanimi, antifungallere direnç ve duyarlilik deneyleri. Cerrahpaşa Tıp Derg. 2014;34(3):140-157

53. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, et al. Evaluation of a (1→3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol. 2005;43(12): 5957–62.

54. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, et al. Contribution of the (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol. 2008 Mar;46(3):1009–13.

55. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue

specimens. J Clin Microbiol. 2007 Feb;45(2):380–5.

56. Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. Future Microbiol. 2009 Nov;4(9):1185–222.

57. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from ımmunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. Clin Infect Dis. 2001 Aug 15;33(4):428–35.

58. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. J Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3652–8.

59. Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, Villaescusa T, et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am. 2015 Feb;60(3):405–14.

60. Morrissey CO, Chen SC-A, Sorrell TC, Milliken S, et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. 2013 Jun;13(6):519–28.

61. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. Future Microbiol. 2010 Nov;5(11):1733–54.

62. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48(3):900–7.

63. Cassagne C, phane Ranque S, cile Normand A-C, Fourquet P, et al. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. PLoS One. 2011;6(12):e28425.

64. Ahmed FE. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. Expert Rev Proteomics. 2008 Dec;5(6):841–64.

65. Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S, et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. Mycoses. 2016;59(11):678–90.

66. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):369-379.

67. Aktürk B, Çelebi S, Hacımustafaoğlu M. Aspergilloz. Güncel Pediatri. 2007; 5:

62-69.

68. Steinbach WJ, Benjamin DK, Kontoyiannis DP, Perfect JR, et al. Infections Due to *Aspergillus terreus*: A Multicenter Retrospective Analysis of 83 Cases. Clin Infect Dis. 2004 Jul 15;39(2):192–8.

69. Traunmüller F, Popovic M, Konz KH, Smolle-Jüttner FM , et al. Efficacy and safety of current drug therapies for invasive aspergillosis. Pharmacology 2011;88:213–224

70. Erdem İ, Doğan M, Karaali R, Elbasan Omar Ş, et al. Review İnvaziv aspergilloz tedavisi treatment of ınvasıve aspergıllosıs. Namık Kemal Tıp Dergisi.2017; 6(2): 64 - 82

71. Ledoux MP, Toussaint E, Denis J, Herbrecht R. New pharmacological opportunities for the treatment of invasive mould diseases. J Antimicrob Chemother. 2017 Mar 1;72:i48–58.

72. Lat A, Thompson GR. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. Infection and Drug Resistance. 2011;4:43–53.

73. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Immunocompromised Hosts: Immunopharmacology of Modern Antifungals. Clin Infect Dis. 2008 Jul 15;47(2):226–35.

74. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, et al. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. 2008;327.

75. Bellmann R. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antifungals for treatment of ınvasive aspergillosis. Curr Pharm Des. 2013 Apr 27;19(20):3629–47.

76. Arnold TM, Dotson E, Sarosi GA, Hage CA. Traditional and emerging antifungal therapies. Proc Am Thorac Soc. 2010 May;7(3):222–8.

77. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikkos G, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. Haematologica. 2017 Feb 28;102(3):433–44.

78. Walsh TJ, Goodman JL, Pappas P, Bekersky I, et al. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: Maximum tolerated dose study. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(12):3487–96.

79. Edlind TD, Henry KW, Metera KA, Katiyar SK. *Aspergillus fumigatus CYP51* sequence: potential basis for fluconazole resistance. Med Mycol. 2001 Jun;39(3):299–302.

80. Lestner J, Hope WW. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013 Jul;9(7):911–26.

81. Johnson LB, Kauffman CA, John S. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. Clinical Infectious Diseases. 2003 Mar 1;36(5):630-7

82. Herbrecht R. Voriconazole: Therapeutic review of a new azole antifungal. expert review of anti-ınfective therapy. Future Drugs Ltd; 2004;2: 485–97.

83. Ledoux MP, Toussaint E, Denis J, Herbrecht R. New pharmacological opportunities for the treatment of invasive mould diseases. J Antimicrob Chemother. 2017;72:48–58.

84. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi: A phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. Lancet. 2016 Feb 20;387(10020):760–9.

85. Patterson TF, Thompson Iii GR, Denning DW, Fishman JA, et al. Executive Summary: Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the ınfectious diseases society of America. Clinical Infectious Diseases, Issue 4, 15 August 2016;63: 433–442

86. Heinz WJ, Buchheidt D, Ullmann AJ. Clinical evidence for caspofungin monotherapy in the first-line and salvage therapy of invasive Aspergillus infections. Vol. 59, Mycoses. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 480–93.

87. Lass-Flörl C. In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. Future Microbiol. 2010 May;5(5):789–99.

88. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am. 2002 Oct;35(8):982–9.

89. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005 Mar;4(3):625–32.

90. McCarthy M, O'Shaughnessy EM, Walsh TJ. Amphotericin B: Polyene resistance mechanisms. Antimicrob Drug Resist. 2017;(20):387–95.

91. Blum G, Hörtnagl C, Jukic E, Erbeznik T, et al. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1583–8.

92. Van der Linden JWM, Arendrup MC, Melchers WJG, Verweij PE. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* in ımmunocompromised patients with ınvasive aspergillosis. Emerg Infect Dis. 2016 Jan;22(1):158–9.

93. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, et al. Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. Vol. 41. 1997.

94. Nabili M, Shokohi T, Moazeni M, Khodavaisy S, et al. High prevalence of clinical and environmental triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Iran: is it a challenging issue? J Med Microbiol 2016 Jun;65(6):468-475

95. Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in Aspergillus Species: An Emerging Problem. Drugs. 2017 Apr 1;77(6):599–613.

96. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis. 2009;9(12):789–95.

97. Wiederhold NP, Patterson TF. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus*. Semin Respir Crit Care Med. 2015 Oct;36(5):673–80.

98. Perlin DS. Echinocandin Resistance in Candida. Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am. 2015 Dec;61 Suppl 6(Suppl 6):S612-7.

99. Jiménez-Ortigosa C, Moore C, Denning DW, Perlin DS. Emergence of echinocandin resistance due to a point mutation in the *fks1* gene of *Aspergillus fumigatus* in a patient with chronic pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Nov 22;61(12):e01277-17.

100. Satish S, Perlin DS. Echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus* has broad ımplications for membrane lipid perturbations that ınfluence drug-target ınteractions . Microbiol Insights. 2019;12:1-4

101. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J. Updates in antifungal susceptibility testing of filamentous fungi., Current Fungal Infection Reports. 2009; 3:133–41.

102. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrous K, et al. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds Version 9.3.2. Czech Republic, H Järv. 2020;12(3):4.

103. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, et al. Antifungal susceptibility testing: Current role from the clinical laboratory perspective. Vol. 6, Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases. Universita Cattolica del Sacro Cuore; 2014; Apr 7;6(1):e2014030.

104. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, et al. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, e test, and disk diffusion methods. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):1781–4.

105. Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1811–20.

106. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3359–61.

107. Gupta P, Khare V, Kumar D, Ahmad A, et al. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in Susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates. J Clin Diagnostic Res. 2015;9(1):DC04-7.

108. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):643–58.

109. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of E test and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1126–9.

110. Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):2101–7.

111. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, et al. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother. 2018 Aug 1;73(8):2274.

112. Buil JB, Van Der Lee HAL, Rijs AJMM, Zoll J, et al. Single-center evaluation of an agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* by using VIPcheck. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(12):1–9.

113. Wolk DM, Clark AE. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. Clin Lab Med. 2018 Sep;38(3):471–86.

114. Sanguinetti M, Posteraro B. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential. Expert Rev Proteomics. 2016 Oct;13(10):965–77.

115. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of Candida albicans and fluconazole. Proteomics. 2009 Oct;9(20):4627–31.

116. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M-27A. 1997.

117. Mec C. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi ; Informational Supplement (M51-S1) Table 1 . Tentative Zone Diameter Epidemiological Cutoff Values (ECV) and Corresponding Minimal Inhibit. 2014;(January):1–2.

118. Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1811-20.

119. Carol Garcia-Vidal, Arlo Uptan, Katharine AKirby, Kieren A Marr Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation Clin Infect Dis 2008 Oct 15;47(8):1041-50.

120. Efe Ş. Alt solunum yolu örneklerinden üretilen *Aspergillus* türlerinin in-vitro antifungal duyarlılığının mikrodilüsyon ve e test yöntemleriyle araştırılması. Tez çalışması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bursa. 2007

121. Lamoth F, Alexander BD. Comparing e test and broth microdilution for

antifungal susceptibility testing of the most-relevant pathogenic molds. J Clin Microbiol. 2015;53(10):3176–81.

122. Hadrich I, Makni F, Neji S, Cheikhrouhou F, et al. Amphotericin B in vitro resistance is associated with fatal *Aspergillus flavus* infection. Med Mycol. 2012 Nov;50(8):829–34.

123. Denardi LB, Keller JT, de Azevedo MI, Oliveira V, et al. Comparison between etest and broth microdilution methods for testing ıtraconazole-resistant *Aspergillus fumigatus* susceptibility to antifungal combinations. Mycopathologia. 2018;183(2):359–70.

124. Gürcan Ş, Tikveşli M, Eryıldız C, Evci C, et al. İnvazif aspergillozlu olgulardan izole edilen *Aspergillus* spp. suşlarının antifungal duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2010; 44 (2):273-8.

125. Ozkutuk A, Metin DY, Ergon C, Yucesoy M, et al. Comparison of disk diffusion, E-test and broth microdilution test in determination of susceptibility of *Aspergillus* species to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. J Chemother 2008; 20: 87-92.

126. Direkel S, Otağ F, Aslan G, Ulger M, et al. Identification of filamentous fungi isolated from clinical samples by two different methods and their susceptibility results. Mikrobiyol Bul. 2012; 46(1):65–78.

127. Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1480–3.

128. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and ıtraconazole MICs. J Clin Microbiol. 2003;41(3):1126–9.

129. Fuller J, Schofield A, Jiwa S, Sand C, et al. Caspofungin Etest endpoint for *Aspergillus* isolates shows poor agreement with the reference minimum effective concentration. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):479-82

130. Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). J Clin Microbiol. 2003;41(1):403–9.

131. Martos AI, Romero A, González MT, González A, et al. Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. Med Mycol. 2010;48(6):858–61.

EKLER

EK 1. DEÜ GOEK onayı