



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN ÜRETİLEN ASPERGİLLUS
TÜRLERİNİN İN-VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIĞININ MİKRODİLÜSYON
VE E TEST YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şirin EFE

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2007



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN ÜRETİLEN ASPERGİLLUS
TÜRLERİNİN İN-VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIĞININ MİKRODİLÜSYON
VE E TEST YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şirin EFE

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2007

ÖZET

Son yıllarda, antifungal duyarlılık testleri, invaziv mikozların artan insidansı nedeniyle gittikçe daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Bu çalışmada da, 222 *Aspergillus* suşunun (136 *A fumigatus*, 56 *A flavus*, 20 *A niger* ve 10 *A terreus*), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) referans mikrodilüsyon ve E test yöntemleriyle amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve vorikonazol aktivitesi değerlendirildi. Kaspofungin etkinliğine ise sadece E test ile bakıldı. 35°C'de, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda her iki yöntemle de; MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalamalar belirlendi. Yöntemler arasındaki % uyum, ± 1 ve ± 2 dilüsyonlarda hesaplandı. Mikrodilüsyon yönteminde, en etkili ilaç vorikonazol olarak bulundu ve izolatların %90'dan fazlası ≤ 1 µg/ml MİK değerleriyle inhibe oldu. Bunu itrakonazol, amfoterisin B ve ketakonazol takip etti. E test yönteminde ise kaspofungin MİK değerleri, vorikonazolden daha iyi idi ve tüm suşlar $\leq 0,5$ µg/ml MİK değerleriyle inhibe oldu. Vorikonazol ve kaspofunginin, tüm *Aspergillus* türlerine etkinliği çok iyi bulundu, fakat amfoterisin B'nin, aktivitesinin, *A flavus* ve *A terreus*'da düşük olduğu görüldü. İki yöntem arasındaki % uyumun, ± 1 ve ± 2 dilüsyonlarda her iki inkübasyon süresinde de, en yüksek vorikonazolde olduğu saptandı (sırasıyla % 83-97 ve %82-96). Bu çalışmaya göre, yeni antifungal ajanlar, *Aspergillus* türlerine karşı amfoterisin B'den daha etkin görülmüştür ve E test yönteminin, filamentöz mantarların duyarlılığını test etmede uygun bir alternatif olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, antifungal duyarlılık, mikrodilüsyon, E test

SUMMARY

IN-VITRO DETECTION OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY of *ASPERGILLUS* SPP ISOLATES from LOWER RESPIRATORY TRACT SPECIMENS by MICRODILUTION AND E TEST METHODS

Antifungal susceptibility tests have gained greater importance in recent years due to increasing incidence of invasive mycoses. This study evaluated the activities of amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, and voriconazole by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference microdilution and E test methods against 222 *Aspergillus* species (136 *A fumigatus*, 56 *A flavus*, 20 *A niger* and 10 *A terreus*). Caspofungin activity was evaluated only by E test method. MIC ranges, MIC₅₀, MIC₉₀ and geometric means were determined for both of the methods after 24 and 48 hours of incubations at 35°C. The percent agreements between methods were calculated within ± 1 and ± 2 dilutions. Among the drugs, voriconazole was most active, inhibiting more than 90% of isolates at ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, followed by itraconazole, amphotericin B and ketoconazole by CLSI M38-A method. By E test method the MIC values of caspofungin were found better than voriconazole and all of the isolates were inhibited $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ MIC values. The activity of voriconazole and caspofungin to all *Aspergillus* species were found excellent but amphotericin B showed decreased activity against *A flavus* and *A terreus*. The agreements within ± 1 and ± 2 dilutions between methods for voriconazole were found highest at both incubation times (83-97% and 82-96% respectively). According to this study, the new antifungal agents have seen better than amphotericin B against *Aspergillus* species and the E test appears to be a suitable alternative procedure for testing the susceptibility of filamentous fungi.

Key words: *Aspergillus*, antifungal susceptibility, microdilution, E test

GİRİŞ

Aspergillus türleri doğada; toprak, gübre, çürüyen bitkiler, depolanmış hububat ve saman üzerinde yaygın olarak bulunan saprofitik küf mantarlarıdır. Nem oranı yüksek ilkbahar ve sonbahar aylarında sayıları artış gösterir. Sporları insanlar tarafından alınarak solunum yollarında hastalık oluşturmaksızın kolonize olabilir. Atopik kişilerde alerjik hastalıklara neden olabilirken, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ciddi invaziv enfeksiyonlara yol açabilmektedir (1-4).

1980'lerden sonra, kanserli ve otoimmün hastalığı olanlarda yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar ve kortikosteroidler hastaların yaşam süresini uzatmıştır. Bunun yanı sıra kemik iliği ve solid organ transplantasyonları yaygınlaşmış ve bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonundaki bu artış, invaziv mantar enfeksiyonlarının daha sık görülmesine yol açmıştır. Gelişen enfeksiyonların mortalitesinin yüksek seyretmesi de dikkatleri küf mantarları üzerine çekmiştir (4-8).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastanelerinde, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) verilerine göre nozokomiyal mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı 1980'lerde %0.2 iken, 1990'larda %0.38'e yükselmiştir. Bu enfeksiyonların büyük bir kısmını (%80'ini) invaziv kandidoz oluşturmakta, ikinci sıklıkta görülen mantar enfeksiyonları ise *Aspergillus* türleri ile gelişmektedir. Genellikle görülme sıklığı %1.3 iken, kemik iliği transplantasyon üniteleri gibi özel birimlerde daha yüksek oranlarda saptanmaktadır (6-9). ABD'de her yıl ortalama 8.000-10.000 invaziv aspergilloz olgusunun görüldüğü ve bu olgular için yaklaşık 550-650 milyon \$

harcama yapıldığı bildirilmektedir (10,11). Dasbach ve ark (11), 1976'da yayınlanan verilerle kıyasladıklarında, 1996'da invaziv aspergillozda yaklaşık sekiz kat artış olduğunu raporlamışlardır.

Bugün, çok sayıda *Aspergillus* türü (Raper ve Fennel'in sınıflandırmasında 700 civarında *Aspergillus* türü) tanımlanmakla birlikte, insanlar için patojen olduğu kabul edilenlerin sayısı sınırlıdır (1-4,12). Ciddi aspergillozların büyük çoğunluğundan (%80-90) *Aspergillus fumigatus* sorumludur. Bunun yanında *A flavus*, *A niger* ve *A terreus* izole edilen diğer *Aspergillus* türleridir ve olguların çok büyük kısmında bu dört tür etkindir. Diğer türlere ise hastalık etkeni olarak nadiren rastlanmaktadır (1-4,6,7). Tablo-1'de hastalık etkeni olarak karşımıza çıkabilen *Aspergillus* türleri görülmektedir (2).

Tablo-1: Enfeksiyon etkeni olabilen *Aspergillus* türleri

• <i>A fumigatus</i>	• <i>A versicolor</i>
• <i>A flavus</i>	• <i>A glaucus</i>
• <i>A niger</i>	• <i>A sydowii</i>
• <i>A terreus</i>	• <i>A candidus</i>
• <i>A nidulans</i>	• <i>A restrictus</i>
• <i>A oryzae</i>	• <i>A amstelodami</i>
• <i>A ustus</i>	• <i>A clavatus</i>

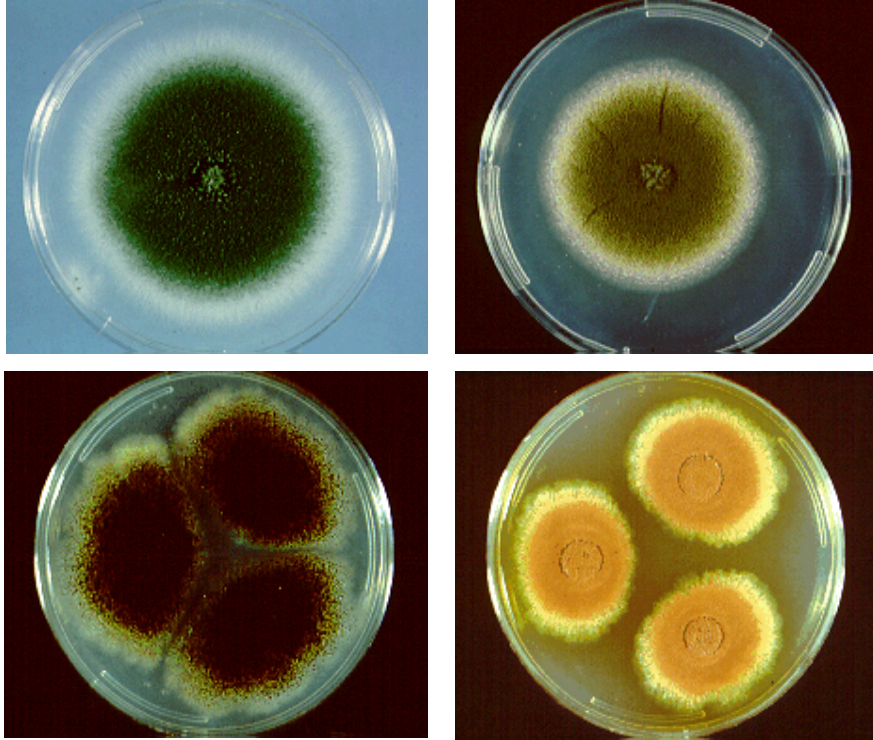
***Aspergillus* Türlerinin Genel Özellikleri**

*Aspergillus*lar, hem anamorf (eşeysiz, aseksüel) hem de telemorf (eşeyli, seksüel) şekilleri tanımlanmış küf mantarlarıdır. Hifler (filamentöz uzantılar) ve sporlar (aseksüel sporlar; konidiya, klamidospore vb; seksüel sporlar; askospor) yardımıyla, aseksüel ve seksüel olarak üreyebilir. Ancak seksüel üreme fazını laboratuvarında göstermek kolay olmadığından birçok

küfün tanımlanması, besiyerlerinde üretildikten sonra hif ve konidiyası yardımıyla yapılmaktadır (1,2,13).

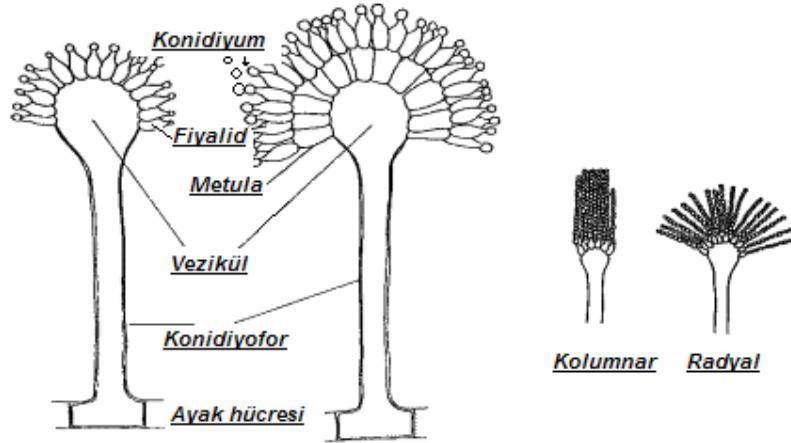
Küflerin tür düzeyinde tanımlanmasında morfolojik kriterler çok önemlidir. *Aspergillus* türleri için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Standart Czapek-Dox agar, %20-30 glukoz eklenmiş Czapek-Dox agar ve %2 Malt Extract agar gibi besiyerleri uygundur. *Aspergillus*lar, termotoleran mikroorganizmalardır ve insanda patojen olan türler 37°C'de üreyebilir. Bu besiyerlerinde ürediğinde, koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri değerlendirilerek identifikasyon yapılır (1,2,13).

Tür ve üreme şartlarına bağlı olarak, *Aspergillus* kolonileri siyah, kahverengi, sarı, kırmızı, yeşil veya diğer renklerde olabilir. Koloni kenarları önemli bir özellik olup, yoğun ve keskince, ince ve yaygın, düzgün ve kesintisiz, düzensiz loplu, batık veya kalkık; koloni yüzeyi ise kadifemsi, yünümsü veya granüllü olabilir (Şekil-1) (2,12,13).



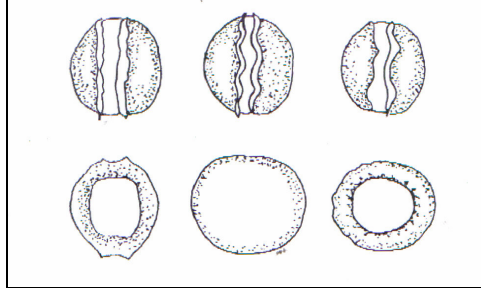
Şekil-1: *Aspergillus* türlerinin koloni görünüşleri (14)

Aseksüel tanımlamada (anamorfik yapı) ilk değerlendirme konidiyanın oluşumuna göre yapılmaktadır. Konidiya; tek hücreli bölmesiz, düzgün ya da üzeri desenli, şekilli (pürtüklü, tüylü, dikensi, vb), şeffaf ya da renkli aseksüel üreme evresinde üremeyi sağlayan yapıdır. Konidiyofor (=fertil hif), *Aspergillus* başını taşıyan özelleşmiş hiftir. *Aspergillus*'ların konidiyoforu düzenli bir yapılanma içerisindedir. Bu konidiyoforlar apikalde genişleyerek düzgün veya düzensiz, hiyalin veya pigmentli vezikül oluşturur. Vezikül üzerinde konidiya doğuran yapılara fiyalid denir ve fiyalidler direk vezikül üzerinde bulunabildikleri gibi (tek sıralı/uniseriat) metula (fiyalid taşıyan hücre) denen yapılar üzerinde de bulunabilirler (çift sıralı/biseriat). Fiyalidlerin ucunda yuvarlak, oval, pigmentli konidiya zincirleri oluşur. Mikroskopik özelliklerin tanımlanmasında, veziküllerin şekil ve boyutu yanında fiyalid ve metulaların düzeni de önemlidir. Bu yapılar kolumnar veya radyal dizilim gösterebilirler (2,13) (Şekil-2).



Şekil-2: *Aspergillus*larda mikroskopik görünüm(15)

Eşeyli tanımlamada (teleomorfik yapı) ise, özel bir hif yapısı üzerinde, içinde askosporların olduğu askus keseleri önemlidir. *A nidulans* türünde askosporlar kırmızı-kahve veya mor-menekşe renklerindedir. Çoğu türde askus içinde 8 spor bulunur (2,13) (Şekil-3).



Şekil-3: Farklı formlardaki askosporlar (üstte yandan, altta önden görünümü)(13)

Tablo-2'de tıbbi önemi olan dört *Aspergillus* türünün koloni ve mikroskopik morfolojileri özetlenmiştir (12).

***Aspergillus* Türlerinin Virülans Faktörleri**

Aspergillus'un canlı dokuya yayılmasında konak faktörlerinin yanısıra virülans faktörleri de rol oynayabilir. *Aspergillus* türlerinin salgıladığı çeşitli **proteazlar** konağın bariyer yapısını bozarak dokuda mantarın yayılmasına yardım eder. *A. fumigatus* elastinolitik aktivite gösteren iki elastaz (serin proteaz ve metalloproteaz) salgılar. *A. fumigatus* konidyumları insan fibrinojeni ve lamininine bağlanır. Bu bağlanma konidyumun aderensini sağlarken proteaz üretimi hifin konakçı hücreye invazyonuna yardımcı olur. Germinasyona uğrayan konidyum ve hif, nötrofil ve ürünleri tarafından öldürülmeye hazırdır. Ancak konidyum çevre şartları karşısında yaşamaya adapte olursa nötrofil savunmasına karşı koyabilir. Mantar ile primer ilişkiyi çoğunlukla pulmoner makrofajlar kurmakta, nötrofiller savunmanın ikinci sırasında yer almaktadır. Konidyumun dış yüzeyindeki hidrofobik protein mikrofibrilleri (hidrofobin) mantarın havada dağılmasını ve kimyasal sindirime direnç göstererek fagositozdan korunmasını sağlamaktadır (2).

Tablo-2: Tıbbi önemi olan *Aspergillus* türlerinin özellikleri

Türler	Fiyalid dizilimi		Koloni özellikleri	Mikroskopik özellikleri		
	Tek sıralı	Çift sıralı		Konidiyofor	Vezikül	Konidiyum
<i>A fumigatus</i>	+		Koyu yeşil Grimsi kahve Beyaz bordürle sınırlı	300-500 µm uzunlukta Renksiz Düzensiz duvarlı	20-30 µm çapta Lobut biçimli Fiyalid ucunda zincir şeklinde dizilim	Küresel, 2-3.5 µm Eşit çaplı Güneş ışını görünüm
<i>A flavus</i>	+	+	Sarı Sarımsı-yeşil	400-800 µm uzunlukta Renksiz, düzensiz olmayan çeperli	25-45 µm çapta Küresel	Küresel, elipsoid Düzensiz yüzeyli Zincir şeklinde dizilim
<i>A niger</i>		+	Siyah Sarı bordürle sınırlı Siyah granüler yüzey	400-3000 µm uzunlukta Renksiz, açık kahverengi	30-75 µm çapta Küresel Açık kahverengi	Sferik, 3-5 µm Düzensiz olmayan yüzeyli Kalın duvarlı, Siyah renkte Vezikül üzerine yığın halinde çöker
<i>A terreus</i>		+	Taba rengi Turuncu kahve Koloni merkezinden perifere radyal oluklu	100-250 µm uzunlukta Renksiz Düzensiz duvarlı	25-45 µm çapta Küçük küresel	Sferik, 2-2.5 µm Düzensiz yüzeyli Uzun zincirler yapar

Aspergillus'un **katalazı**, kronik granüloamatöz hastalıkta rolü olan virülans faktörüdür. Makrofaj fagositozunu, T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eden **gliotoksin**, *A fumigatus*'ta gösterilen bir virülans faktörüdür. Ökaryotik ribozomun fosfodiester bağlarını ayıran **sitotoksin** ise invaziv ve alerjik aspergilloz patogenezinde önemli rol oynamaktadır. **Aflatoksin**, *A flavus* ve *A parasiticus*'un oluşturduğu bir mikotoksindir ve aflatoksinin insan aspergillozunda virülans faktörü olduğuna dair bir kanıt yoktur (2).

***Aspergillus* Türlerinin Oluşturduğu Hastalıklar**

Aspergilloz; *Aspergillus*'lara karşı gelişen alerjik reaksiyonlardan, yüzeysel enfeksiyon ya da dokulara yayılmasıyla oluşan invaziv hastalıklara kadar değişen klinik tabloları tanımlar (2,3). Tablo-3'de *Aspergillus* türleri ile gelişen belli başlı hastalıklar özetlenmiştir (12).

Aspergillus hastalıkları yaş, cinsiyet ve ırk farklılığı göstermez. Hastadan hastaya bulaşma nadir olup esas kaynak çevredir. Hastane içinde veya yakınında inşaat çalışmalarının bulunması nütropenik hastalarda nozokomiyal aspergillozun görülmesinin önemli bir nedenidir (2,4). Konidyumlar genellikle solunum yoluyla alınmakla birlikte deri ve kornea da giriş yolu olabilir. Enfeksiyon gelişiminde belirleyici faktör, mantar ile temasın yoğunluğu yanı sıra kişilerin bağışıklık durumudur (2). Bağışıklığı baskılanmış ve özellikle nütropenik kişilerde, antifungal tedavi gerektiren akut invaziv aspergilloz gelişme riski oldukça yüksektir. İnvaziv enfeksiyon tuttuğu organla/organlarla uyumlu belirti ve bulgular verir (3,16,17).

Tablo 3: *Aspergillus* türleri ile gelişen klinik tablolar

I-Sağlıklı konakta

- A-Toksikoz mikotoksikoz
 - mikotoksin alınması
 - diğer metabolitlerin alınması
 - B-Alerjik manifestasyonlar
 - alerjik astma
 - alerjik rinit
 - alerjik sinüzit
 - ekstresek alerjik alveolit
 - hipersensivite pnömonisi
 - alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA)
 - C-Yüzeyel enfeksiyonlar
 - kütanöz enfeksiyon
 - otomikoz
 - sinüzit
 - trakeobronşit
 - D-İnvaziv enfeksiyonlar
 - tek organ tutulumu
 - çoğul organ tutulumu
-

II-Doku hasarı ve yabancı cismin eşlik ettiği enfeksiyonlar

- A-Keratit ve endoftalmit
 - B-Yanık yara enfeksiyonları
 - C-Osteomyelit
 - D-Prostetik kapak endokarditi
 - E-Vasküler greft enfeksiyonu
 - F-Aspergilloma
 - G-Ampiyem ve plevra aspergillozu
 - H-Peritonit
-

III- Bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfeksiyon

- A-Primer kütanöz aspergilloz
 - B-Sino-orbital enfeksiyon
 - C-Pulmoner aspergilloz
 - invaziv trakeobronşit
 - kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz
 - akut invaziv pulmoner aspergilloz
 - D-Santral sinir sistemi aspergillozu
 - E-İnvaziv dissemine aspergilloz
-

Aspergillus sporlarının solunum yolunu kullanmalarına bağlı olarak, en sık karşılaşılan invaziv aspergilloz tablosu, **invaziv pulmoner aspergillozdur (İPA)**. İPA, genellikle bağışıklığı baskılanmışlarda, özellikle de nötropenik olan kemik iliği alıcılarında, lösemili ve lenfomalı hastalarda görülür. *A fumigatus* ve *A flavus* sıklıkla görülen iki tür olmakla birlikte, *A terreus* ve *A niger*'de etken olarak karşımıza çıkabilir (3,12,17).

İPA'nın semptomları özgül değildir. İlerleyici kuru öksürük, solunum zorluğu, plöretik yan ağrısı ve ateş en sık görülen belirtilerdir. Ateş, bazı hastalarda, özellikle de yüksek doz steroid alanlarda görülmeyebilir. Bunların yanında hemoptizi, plevral effüzyon ve pnömotoraks karşılaşılabilen diğer bulgulardır. Radyolojik olarak çekilen grafiler tamamen normal olabildiği gibi, tek veya birden fazla nodüller, kaviteler veya alveoler konsolidasyonlar saptanabilir. Bilgisayarlı tomografide nodüler lezyonların etrafında "halo belirtisi"nin bulunması karakteristiktir ve invaziv aspergillozun erken bulgusudur (ilk hafta). Ancak nadir görülen bu bulgu *Zygomycetes*, *Fusarium* gibi diğer angioinvaziv organizmalarla da saptanabilir. Laboratuvar bulguları nonspesifiktir (3,12,17). Galaktomannan antijeninin serumda saptanması, tanıda son yıllarda gündeme gelmiştir ve yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu testin duyarlılığı, nötropenik olmayan ve antifungal tedavi altındaki hastalarda düşüktür ve bazı koşullarda yalancı pozitif sonuçlarla da karşılaşılabilir (18,19).

İPA bazı durumlarda (genellikle nötropeniden çıktıktan sonra) kronikleşebilir ya da ilerleyerek dissemine aspergilloz tablosu gelişir. Dissemine aspergilloz olgularında en sık tutulan bölge santral sinir sistemidir (3,12,17).

Paranasal sinüs aspergillozu, İPA'dan sonra ikinci sıklıkta görülen invaziv aspergilloz tablosudur. Tedavi edilmez ise bu tablo da dissemine enfeksiyona sebep olabilir (3,12,17).

Aspergillus türlerinin oluşturduğu ve Tablo-3'de belirtilen diğer hastalıkların morbidite ve mortalite açısından önemleri daha azdır ve birçoğunda sistemik antifungal tedavi gerekli değildir.

Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar

İnvaziv aspergillozun, çoğunlukla bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonunda ortaya çıkması, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyretmesi, tedavisinde kullanılan antifungal seçeneklerinin azlığı ve konakla ilgili birçok faktöre bağlı olarak yaşanan zorluklar yeni ilaçların geliştirilmesi yönündeki çalışmalara hız kazandırmıştır.

1959'da sistemik kullanıma giren **amfoterisin B**, yaklaşık 40 yıl boyunca invaziv mikozların tedavisinde tek aktör olarak rol almıştır. Amfoterisin B, mantar hücre duvarında bulunan ergosterole irreversibl bağlanarak etki eden poliyen grubu bir antifungal ajandır. Bu bağlanmayla membran geçirgenliği bozular ve intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin dışarı sızması sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Lipid formülleri de aynı mekanizmayla etki eder (20-22).

Amfoterisin B oldukça geniş spektrumlu bir antifungal ajandır. *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp, *Mucor* spp, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve bazı protozoon enfeksiyonlarında etkilidir (21,23). Ancak *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei* ve *Aspergillus terreus* gibi bazı türler, amfoterisin B'ye karşı direnç veya azalmış duyarlılık gösterebilir. *Trichosporon*, *Fusarium*, *Pseudallescheria boydii* ve *Sporothrix schenckii* izolatlarının da amfoterisin B'ye karşı duyarlılıkları değişkendir (21). Amfoterisin B kullanılmakta olan antifungaller içinde en etkili ajan olmasına karşın, invaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisinde (doku dağılımı iyi olmadığı ve yan etkileri fazla olduğu için) başarı oranı istenilen

düzeyde değildir. Nefrotoksisite, ateş, hipokalemi gibi ciddi yan etkileri lipid formülerinin geliştirilmesiyle azaltılmıştır (20,21).

5-Fluorositozin (Flusitozin=5-FC), ilk olarak antineoplastik bir ajan olarak üretilen, daha sonra antifungal etkisi olduğu da anlaşılan bir nükleozid analogudur. Pirimidin metabolizmasını bozarak antifungal aktivite gösterir. 5-FC fungal hücreye girişini takiben permeaz enziminin yardımıyla 5-fluorourasil'e (5-FU) dönüşür ve fosforillenerek ribonükleik asit (RNA) ile birleşir. Bu birleşme protein sentezinin inhibisyonuyla sonuçlanır. Diğer taraftan, 5-FU'in 5-fluorodeoksiüridin monofosfata dönüşümü; timidilat sentezinin inhibisyonuna ve fungal deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinin bozulmasına sebep olur. 5-FC'in dar bir etki spektrumu vardır. *Candida* türleri, *C neoformans* ve kromoblastomikoza sebep olan dematiaceous (koyu renk pigmentli) mantarlara etkilidir. Monoterapi sırasında direnç geliştirebildiğinden amfoterisin B ile kombine kullanılır (21-24).

Azoller fungistatik etkili ajanlar olup, sitokrom p450 aracılığıyla lanosterolün C-14 demetilasyonunu inhibe eder ve hücre zarında farklı sterol birikimine ve ergosterol konsantrasyonunda azalmaya neden olurlar. Sonuçta hücre membran sentezi yapılamaz (21,22).

Bu grupta imidazol ve triazoller bulunur. İlk üretilen ve topikal etkili olan imidazol türevleri benzimidazol, klotrimazol ve ekonazolden sonra, 1978 yılında sistemik etkili **mikonazol** kullanıma girmiştir. Sistemik kandidozlar ve bazı refrakter kriptokok menenjit olgularında etkili olduğu görülmesine rağmen, ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır. 1981 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından kullanımı onaylanan **ketokonazol** ise, sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde günümüzde de kullanılan tek imidazoldür (25). *H capsulatum*, *C immitis*, *B dermatitidis*, *P brasiliensis* ve *P boydii*'ye karşı aktivitesi iyidir. *Candida* spp ve *C neoformans*'a karşı da etkili olmakla birlikte, bunlara karşı etkisi klinikte kullanımda olan triazollerle (flukonazol ve itrakonazol) karşılaştırıldığında

sınırlıdır. *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp ve *Zygomycetes* grubu mantarlar ise ketokonazole dirençlidir (21). Toksikite potansiyeli, özellikle de hepatotoksikite, gastrik toksikite, testosteron, kortizol gibi hormonların düzeylerinde düşme gibi endokrinolojik yan etkiler ve daha az toksik alternatiflerinin olması nedeniyle günümüzde ketokonazol, nadiren kullanılmaktadır (22,25).

Azol halkasında iki azot içeren imidazollerden sonra, daha geniş spektrumlu, yan etkileri daha az olan ve azol halkasında üç azot içeren triazoller geliştirilmiştir. 1990'da ilk kullanıma giren triazol **flukonazol**dür (25). Flukonazol yaygın olarak kandidozların tedavisinde kullanılır. Çoğu *Candida* türlerine ve *C neoformans*'a etkilidir. *C krusei* flukonazole intrinsek olarak dirençlidir. *C glabrata* izolatlarının bazıları doz bağımlı olarak flukonazole duyarlılık gösterirken, %15 kadarı gerçek direnç gösterebilir. Uzun süre flukonazol profilaksisi ya da tedavisi alan mukokutanöz kandidozlu hastalardan izole edilen *C albicans* suşlarında da, flukonazol direnci görülebilir. Ancak sistemik enfeksiyonlarda flukonazole dirençli *C albicans* oldukça nadirdir. Flukonazolün *B dermatitidis*'e etkisi sınırlıdır ve histoplazmoz tedavisinde kullanıldığında da direnç gelişebilir. Küflere ise pratik olarak etkisi yoktur (21).

1992'de flukonazole göre daha geniş spektrumlu ikinci triazol, **itrakonazol** kullanıma girmiştir (24,25). Flukonazole dirençli *C krusei* ve *C glabrata* izolatları da dahil *Candida* türlerine, *C neoformans*, *Aspergillus* spp, dermatofitler, *P boydii*, *Paecilomyces* spp, *C immitis*, *H capsulatum*, *B dermatitidis*, *P brasiliensis*, *Penicillium marneffe* ve *S schenckii*'ye karşı etkilidir. İtrakonazol zigomikoz etkenlerine ve *Scopulariopsis* spp'ye karşı etkisiz ve *Fusarium* türlerine karşı da sınırlı etkinliğe sahiptir (21). Bu ilaç flukonazole göre daha geniş bir etki spektrumuna sahip olsa da oral alındığında biyoyararlılığının az olması kullanımını kısıtlamaktadır.

Flukonazol ve itrakonazol ile tatmin edici yanıtla ulaşamaması üzerine, yapılan çalışmalar sonunda ikinci jenerasyon triazol; vorikonazol, ravukonazol ve posakonazol geliştirilmiştir. 2002 yılında FDA tarafından onaylanan **vorikonazol**, flukonazolun ikinci kuşak sentetik derivativesidir. Flukonazole bir metil grubunun ilavesiyle 14- α -sterol demetilaza afinitesi artmış, bu sayede *Aspergillus* için fungisitik aktivite sağlamıştır. Flukonazolle kıyaslandığında vorikonazolün yaptığı inhibisyon daha güçlüdür ve doz bağımlıdır (26,27,28).

Vorikonazolün etki spektrumu geniştir. Hem *Candida* spp, *C neoformans* gibi mayalara fungistatik olarak, hem de *Aspergillus* spp, *Penicillium marneffeii*, *Scedosporium* spp, *Fusarium* spp ve *Paecilomyces* gibi küflere fungisitik etkilidir. *Zygomycetes*'lere ise etkisi kısıtlıdır. İlaç etkileşimleri ve yan etkileri açısından ideal bir azol değildir. Vorikonazol alan hastalarda infüzyonla ilişkili olarak hipokalemi ve dozla ilişkili geçici görsel bozukluklar yanında infüzyondan bağımsız görme halusinyasyonları da rapor edilmiştir (25,27,28).

Posakonazol, itrakonazolün hidroksillenmiş derivativesidir. Etki spektrumu geniştir. *Zygomycetes*'ler ve bazı koyu pigmentli küf mantarlarını da içeren fırsatçı ve endemik fungal patojenlere karşı etkilidir. İn vitro olarak *Aspergillus* türlerine oldukça etkili olup, *Candida* türlerine de flukonazolle karşılaştırıldığında en az 8 kat daha fazla etkili olduğu saptanmıştır. Hayvan çalışmalarında, posakonazolün amfoterisin B, flukonazol ve itrakonazol ile karşılaştırıldığında çok daha etkili olduğu gösterilmiştir (25,28). Ayrıca posakonazol sitokrom p450 3A4'ü selektif olarak inhibe ettiğinden, diğer yeni triazol türevleri gibi sitokrom p450 enzim aktivitesini inhibe etmez ve ilaç etkileşimleri daha azdır (29).

Ravukonazol yine flukonazolün bir derivativesidir. Özellikle de *C krusei* ve *C neoformans*' a karşı olmak üzere flukonazol ve itrakonazolden daha

geniş bir etki spektrumuna sahiptir. İn vitro olarak *Fusarium* türlerine etkili değildir. Sadece oral formu vardır (25,28).

Hücre zarına etkili olan poliyen ve azol grubu antifungaller dışında son yıllarda, hücre duvarı sentezini inhibe eden ilaçlara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Mantar hücre duvarı glukan sentez inhibitörlerinin geliştirilmesiyle, antifungal kemoterapide önemli bir ilerleme sağlanmıştır. Bilinen (1,3)- β -D glukan sentaz inhibitörleri; asidik terpenoidler, papulokandinler ve ekinokandinlerdir (30).

Ekinokandinler geniş etki spektrumlu lipopeptidlerdir. Glukan sentezini inhibe ederek mantar hücre duvarı sentezini engellerler. Sistemik kullanımında ciddi yan etkilere sebep olan ilk ekinokandin silofungindir. Birkaç yıl sonra ise yan etkisi az yeni ekinokandinler; kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin geliştirilmiştir. **Kaspofungin** bu nonkompetitif inhibitörlerin ilkidir ve pnömokandin B₀'ın semisentetik bir derivativesidir. Kaspofungin, erişkinde invaziv kandidoz, orofaringeal ve özefagus kandidozu ve refrakter veya diğer tedavilere (amfoterisin B, lipid formları ve/veya itrakonazol) yanıtız hastalarda invaziv aspergilloz tedavisi için FDA onayı almıştır. Ekinokandinler, *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı genelde etkili olmakla birlikte, *C parapsilosis*, *C guilliermondii* ve *Trichosporon spp*'ye karşı sınırlı aktivite gösterirler. *C neoformans* ve *Fusarium spp*'ye karşı da aktivitesi pratik olarak yok veya oldukça sınırlıdır (21,28,30).

Yeni ekinokandin türevlerinden mikofungin ve anidulafunginin *Candida* ve *Aspergillus* türleri ile azol dirençli *Candida* türlerine etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ilaçlarla ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir (28).

Antifungal Duyarlılık Testleri

Bağıışıklığı baskılanmış hastalarda invaziv mantar enfeksiyonların insidansında artma; uygun tedavilere rağmen bu enfeksiyonların mortalitesinin yüksek seyretmesi; farklı mantar türlerinde antifungal direncinin olması ve yeni antifungal ilaçların keşfi antifungal duyarlılık testlerine ihtiyacı arttırmış ve bu ihtiyacın bakterilerdeki kadar büyük olduğu anlaşılmıştır (31-33).

İlk kez 1982 yılında Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (eski adıyla NCCLS) tarafından antifungal duyarlılık testleri ile ilgili bir alt komite kurulmuş ve mantarlarda antifungal duyarlılık testleri ve standardizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu konuda yapılan ön araştırmalar sonucunda en sık test edilen türlerin *C albicans* ve diğer mayalar olduğu ve en yaygın kullanılan ilaçların da amfoterisin B, ketokonazol ve 5-FC olduğunun görülmesi üzerine öncelikle mayalarla ilgili testlerin geliştirilmesine odaklanılmıştır (32,34,35). Bu konuda yapılan çok merkezli ve birçok çalışma sonucunda belirlenen test prosedürleri ilk olarak 1992'de M27-P dökümanı olarak yayınlanmış, 1995 ve 1997'de iki kez revize edilerek onaylanmış, 2002'de M27-A₂ referansı olarak son halini almıştır (31,35,36). Bu referansta; inokulumun hazırlanması ve büyüklüğü, test besiyeri, inkübasyon ısısı, süresi ve amfoterisin B, 5-FC, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol ve yeni triazololler için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin belirlenmesiyle (endpoint değerleri) ilgili konular anlatılmıştır. Başlangıçta bu referans yöntem, bir makrodilüsyon yöntemi iken, sonra, daha kolay uygulanabilmesi nedeniyle mikrodilüsyon formatı geliştirilmiştir (31).

M27-A'daki referans yöntemin *Aspergillus* spp, *S schenckii*, *R arrhizus*, *P boydii*, *Fusarium* spp gibi filamentöz mantarlara direkt adaptasyonu ile, tekrarlanabilir sonuçların ortaya çıktığı ve çok merkezli yapılan birçok araştırmalar sonucunda laboratuvarlar arası uyumun da oldukça iyi olduğu gösterilmiştir (31,37). İnokulum hazırlama yöntemleri,

inokulum büyüklüğünün seçimi, okuma zamanı ve MİK değerinin belirlenmesi gibi konular bu çalışmalarda değerlendirilmiş ve standardizasyon sağlanmıştır. Konidiya oluşturan küf mantarları için standart yöntem 1998 yılında M38-P dökümanı ile kullanıma sunulmuştur. Daha sonra revize edilerek 2002 yılında son halini almıştır (M38-A) (38). Tablo-4'de bu referansda yer alan yöntem özetlenmiştir (39).

Tablo-4: Filamentöz mantarların duyarlılık testleri için en son önerilenler.

Parametre	Tanımlama
Konidial üreme için besiyeri	Patates dekstroz agar <i>Aspergillus</i> türleri için 35 °C'de 7 gün inkübasyon <i>Fusarium</i> spp için önce 35 °C'de 48-72 sa, sonra 7.güne kadar 25-28 °C'de inkübasyon
İnokulum morfolojisi	Konidiya veya sporangiospor
Optik dansite (530 nm absorbands)	<i>Aspergillus</i> türleri ve <i>S schenckii</i> için 0,09-0,11 <i>R arrhizus</i> , <i>Fusarium</i> ve <i>P boydii</i> için 0,15-0,17
İnokulum konsantrasyonu (final)	0,4x10 ⁴ – 5x10 ⁴ kob/ml
Test besiyeri	RPMI 1640, pH 7,0±0,1 (MOPS ile tamponlu)
Format	Mikrodilüsyon
İlaç konsantrasyonu	0,03-16 µg/ml
İnkübasyon süresi	<i>R arrhizus</i> için 24 sa, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp ve diğer küfler için 48 sa <i>P boydii</i> için 72 sa
MİK değerini belirleme (görsel)	Üreme kontrolüne göre berrak olması

Küflerde uygulanan referans antifungal duyarlılık testinde, mayalarda uygulanandan bazı farklar mevcuttur. Bu farklar Tablo-5'de özetlenmiştir (31).

Tablo-5: Mayalar ve küfler için önerilen referans yöntemlerdeki farklar

Özellik	CLSI M27-A2 (2002)	CLSI M38-A (2002)
Form	Maya	Konidiyum veya sporangiospor oluşturan mantarlar
İnokulum	0,5x10 ³ -2,5x10 ³ kob/ml	0,4x10 ⁴ -5x10 ⁴ kob/ml
İnokulum standardizasyonu	Spektrofotometrik, 0,5 McFarland	Spektrofotometrik (530 nm) <i>Aspergillus</i> spp ve <i>S schenckii</i> için; 0,09-0,11 absorbans <i>R arrhizus</i> , <i>Fusarium</i> ve <i>P boydii</i> için; 0,15-0,17 absorbans
Besiyeri	RPMI 1640 (MOPS tamponlu)	RPMI 1640 (MOPS tamponlu)
Format	Makrodilüsyon, Mikrodilüsyon	Mikrodilüsyon
İnkübasyon ısısı	35 °C	35 °C
İnkübasyon süresi	<i>Candida</i> spp için 48 sa <i>C neoformans</i> için 72 sa	<i>R arrhizus</i> için 24 sa, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp ve diğer küfler için 48 sa <i>P boydii</i> için 72 sa
MİK* değerini belirleme	Görsel AmB: MİK-0 5-FC: MİK-1 Azoller: MİK-2	Görsel AmB ve triazoller: MİK-0

* MİK-0: Optik olarak temiz veya üremenin olmaması,
MİK-1: Hafif üreme veya kontrol kuyucuğunun %25'i kadar üreme olması,
MİK-2: Üremede belirgin azalma veya kontrol kuyucuğunun %50'si kadar üreme olması,
MİK-3: Üremede hafif azalma veya kontrol kuyucuğunun %75'i kadar üreme olması,
MİK-4: Üremede azalma yok

Diğer Antifungal Duyarlılık Testleri

CLSI tarafından referans mikrodilüsyon yöntemi bir standart olarak belirlenmiş olsa da bu yöntem, rutin laboratuvarlarda kullanımı zor ve yoğun iş gücüne gereksinim gösteren bir yöntemdir. Bunun yanında elde edilen sonuçların doğru okunması ve değerlendirilebilmesi de özel deneyim gerektirir. Bu nedenle referans mikrodilüsyon yönteminin geliştirilmesini takiben, uygulanması ve sonuçlarının değerlendirilebilmesi açısından daha kolay olan yöntemlerle ilgili araştırmalar önem kazanmıştır (33,39). Bu amaçla kolorimetrik mikrodilüsyon, E test, disk difüzyon, agar dilüsyon, çeşitli ticari sistemler ve flow sitometre gibi farklı uygulamalar denenmektedir (33, 35,39).

Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi

Standart mikrodilüsyon yönteminde kısmi inhibisyon nedeni ile azollerde yaşanan MİK değerlerinin zor belirlenmesi sorununu aşmak amacı ile bazı modifikasyonlar geliştirilmiştir. Alamar mavisi, MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] ve XTT(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) gibi tetrazolyum tuzları kolorimetrik indikatör olarak dilüsyon sistemlerine eklendiğinde MİK değerlerinin okunmasında kolaylık sağlanmış ve indikatörlü sistemler referans yöntemler ile uyumlu sonuçlar vermiştir (40,41). Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri hem maya hem de küf mantarlarında kullanılabilir. Çeşitli çalışmalar sonunda bunlardan bir tanesi güvenilir hale getirilmiştir (Sensititre Colorimetric Antifungal Panel; Trek Diagnostic System). Henüz ülkemizde bulunmayan bu ticari kitin, ileride rutin laboratuvarlar için kolay bir alternatif olacağı düşünülmektedir (31,35,42).

E test Yöntemi

E test, antimikrobiyal duyarlılık testi için ticari olarak piyasada bulunan tescilli bir agar difüzyon yöntemidir. Bu yöntemde, çeşitli konsantrasyonlarda antimikrobiyal emdirilerek kalibre edilmiş plastik stripler, mikroorganizmanın ekildiği agarlı besiyerine yerleştirilerek MİK değerleri belirlenir. MİK, E test stripleri etrafındaki üreme inhibisyon zonunun striple kesişme noktasıdır. Kolay ve pratik bir test olmakla birlikte pahalıdır. Ticari olarak antifungal stripler de bulunmaktadır ve E test yöntemi hem maya hem de küf mantarları için alternatif bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, özellikle küf mantarlarında hem üremenin uniform olmaması hem de sıklıkla tüylenme olması değerlendirmede zorluk yaratabilir. Yine de standart teknikler ve deneyimlerle, E test ve referans yöntem arasında iyi korelasyonlar elde edilmiştir (31,39,43-47).

Son yıllarda E test özellikle amfoterisin B duyarlılığını ölçmede daha fazla değer kazanmıştır. Referans yöntem ile çalışıldığında, amfoterisin B oldukça dar MİK aralığı oluşturmakta ve hem maya hem de küf mantarları için dirençli suşları ayırmak mümkün olamamaktadır. Oysa E test ile MİK aralıkları genişlemiş ve suşlar arasındaki duyarlılık farkları daha rahat gözlemlenir hale gelmiştir (43,44). E test yönteminde de besiyeri olarak RPMI-1640 önerilmekle beraber, amfoterisin B için antibiyotik medium-3'ü (AM-3) önerenler de vardır (31,39,48).

Disk Difüzyon

Disk difüzyon testleri rutin laboratuvarlar için uygun ve ekonomik testlerdir. Ancak antifungal duyarlılık testleri arasında yeri sınırlıdır. Flukonazol/vorikonazol-mayalar için, referans mikro ve makro dilüsyon yöntemleri ile iyi korelasyon tespit edilmiş ve CLSI tarafından referans disk difüzyon yöntemi geliştirilmiştir (CLSI M-44) (49). Küf mantarları için ise henüz bir standardizasyon sağlanmamıştır (31,32).

Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon yöntemi eski yıllarda sıklıkla kullanılmakla beraber broth dilüsyon yöntemlerinin standardize edilmesi ile değerini yitirmiştir. Günümüzde sadece dermatofitlerin antifungal duyarlılık çalışmasında kullanım alanı bulmaktadır (31,39).

Diğer Ticari Sistemler

Antifungal duyarlılık testlerinin daha pratikleşmesi amacı ile çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. Ancak bunların standart yöntem ile korelasyonu çok kötü ya da sınırlıdır. Bu nedenle yukarıda bahsettiğimiz Sensititre sistemi dışında ticari kitlere ilgi gösterilmemelidir (31).

Flow Sitometri

Flow sitometri antifungal duyarlılık testleri için uygun bir yöntem olarak tanımlanmış ve esas olarak *Candida* spp'ye odaklanmış çalışmalarda mayalar için geliştirilmiştir. Flow sitometri yönteminde, DNA'ya bağlanan vital boyalar yardımıyla ölü ve canlı hücreler birbirinden ayrılabilir. Floresanlı boyalar antifungal ajana bağlı olarak membran hasarı varlığında hücre içine girebilmektedir. Yapılmış bazı çalışmalarda amfoterisin B ve azol türevlerinin fungisidal konsantrasyonlarının 1-9 saat içinde değerlendirilebildiği, hatta MİK değerlerinin de saptanabildiği belirtilmiştir. Son çalışmalar, flow sitometri tekniklerinin referans yöntemle belirgin korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bir çalışma, flow sitometrinin özellikle amfoterisin B direncinin saptanması için faydalı olabileceğini ifade etmektedir (31,35,50,51).

Antifungal Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Son dekadda hızla gelişmesine ve uygun bir klinik araç haline gelmesine rağmen in vitro antifungal duyarlılık testlerinde henüz istenilen noktaya gelinmemiştir. Üzerinde durulması gereken önemli bir konu da in

vitro duyarlılık testlerinin in vivo sonuçlarla korele olmasıdır. Verilen antifungal tedavi (süresi, dozu, yan etkileri), konak faktörleri (altta yatan hastalık, immünite durumu ve diğer risk faktörleri), ilacın farmakokinetik özellikleri, hastanın tedaviye uyumu gibi faktörler de klinik yanıtın belirlenmesinde önemli olmaktadır (31,39). Dolayısıyla in vitro duyarlılık, klinik yanıtı etkileyen faktörlerden sadece biridir. Günümüze kadar yapılmış olan in vivo-in vitro korelasyon çalışmaları en çok *Candida* enfeksiyonları ile olup, 5-FC, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için break-point değerleri belirlenmiştir (52,53) Küf mantarlarında ise bu konuyla ilgili sınırlı veriler olmakla birlikte, çalışmalar in vitro sonuçlar ile klinik yanıt arasında bir korelasyon olduğunu düşündürmektedir (33,54,55). Ancak henüz break-point değerleri belirlenmemiştir.

Günümüzde antifungal duyarlılık testlerinin yapılması rutin olarak önerilmemektedir (31-33). Ancak tedaviye yanıt alınamayan ve tekrarlayan mukokütanöz kandidozlardan (AIDS'li ve kronik mukokütanöz kandidozlu hastalar) izole edilen ve bazı *C albicans* dışı kandidemi izolatları için rutin uygulama yapılabilir. Antifungal duyarlılık testleri esas olarak (hem maya hem de küf mantarları için) her merkezin periyodik olarak (yıllık) yapması gereken testlerdir. Böylece merkezlerin ve bölgelerin epidemiyolojik verileri ve direnç paternleri hakkında bilgi edinilebilir ve klinik uygulamalar bu bilgiler ışığında yönlendirilir.

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM) Mikoloji laboratuvarında alt solunum yolu örnekleri ve doku biyopsi materyallerinden izole edilen, *Aspergillus* suşlarında CLSI referans mikrodilüsyon ve E test yöntemleriyle in vitro antifungal duyarlılığının belirlenmesi ve bu iki yöntem arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

***Aspergillus* Suşları**

Çalışmaya, Uludağ Üniversitesi SUAM Mikoloji laboratuvarında alt solunum yolu örnekleri ve doku biyopsi örneklerinden izole edilen ve etken olarak kabul edilen 222 *Aspergillus* suşu alındı. Antifungal duyarlılık testleri, 136 *A fumigatus*, 56 *A flavus*, 20 *A niger*, 10 *A terreus* suşu ile CLSI 38-A tarafından önerilen kalite kontrol suşlarında (*C parapsilosis* ATCC 22019 ve *C krusei* ATCC 6258) çalışıldı. Kalite kontrol suşlarında beklenen MİK değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir (38).

Tablo-6: CLSI M38-A referans yöntemine göre standart suşların MİK aralıkları

Antifungal	Standart suşlar	
	<i>C krusei</i> ATCC 6258	<i>C parapsilosis</i> ATCC 22019
Amfoterisin B	1,0-4,0 µg/ml	0,5-4,0 µg/ml
İtrakonazol	0,25-1,0 µg/ml	0,12-0,5 µg/ml
Vorikonazol	0,12-1,0 µg/ml	0,03-0,25 µg/ml
Ketokonazol	0,25-1,0 µg/ml	0,06-0,5 µg/ml

Suşların tamamında CLSI M38-A'nın önerdiği standart mikrodilüsyon testi ile amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve vorikonazole karşı antifungal duyarlılık araştırıldı. Aynı suşlarda eşzamanlı olarak, E test yöntemiyle amfoterisin B, itrakonazol ve vorikonazol duyarlılıkları çalışıldı. Ketakonazol stripleri yeterli olmadığından E test yöntemiyle suşların yalnızca 117'sinde duyarlılığa bakılabildi. Kaspofungin duyarlılığına ise ham maddesi bulunmadığından sadece E test ile bakıldı.

CLSI M38-A Referans Mikrodilüsyon Yöntemi

Antifungal stok solüsyonlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm antifungal ilaçların ham maddeleri, ilgili firmalardan temin edildi. Stok solüsyonları (1600 µg/ml), CLSI M38-A dökümanına göre dimetilsülfoksit (DMSO; Merck) ile hazırlandı ve steril tüplere birer mililitre koyularak mikrodilüsyon plaklarına dağıtılana kadar -80 °C'de bekletildi (38).

Antifungal ilaç dilüsyonlarının hazırlanması

İlaç dilüsyonları, CLSI M38-A referans yöntemi esas alınarak, çalışılan tüm antifungaller için 0,064-32 µg/ml aralığında Tablo-7'de gösterildiği şekilde hazırlandı (38). Tablo-7'de de görüldüğü gibi antifungaller önce DMSO ile sulandırılarak ara dilüsyonlar elde edildi. Daha sonra DMSO'nun etkisini azaltmak amacıyla RPMI 1640 ile 1/50 sulandırım yapılarak son konsantrasyonlar hazırlandı. Son konsantrasyonu hazırlanan seri dilüsyon tüplerindeki antifungaller, önceden steril edilmiş 96 kuyucuklu mikropaklara, her yatay sıraya bir suş çalışması yapılabilecek (birinci sıradaki kuyucuklara birinci tüpteki antifungal solüsyonu, ikinci sıradaki kuyucuklara ikinci tüpteki antifungal solüsyonu.....v.s gelecek şekilde) ve her kuyucukta 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Onbirinci kuyucuklar boş bırakıldı. Onikinci kuyucuklara ise, kontrol olarak kullanılmak üzere, RPMI-1640 besiyeri ile 1/50 dilüe edilen DMSO, 100 µl olarak eklendi. Bu şekilde hazırlanan mikropaklar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Tablo-7: CLSI M38-A referansına göre ilaç dilüsyonlarının hazırlanması

Tüp no	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Volüm (ml)+DMSO (ml)		Ara konsantrasyon (µg/ml)	RPMI ile son konsantrasyon (µg/ml)
1. tüp	1600	Stok			1600	32
2. tüp	1600	Stok	0,5	0,5	800	16
3. tüp	1600	Stok	0,5	1,5	400	8
4. tüp	1600	Stok	0,5	3,5	200	4
5. tüp	200	4. tüp	0,5	0,5	100	2
6. tüp	200	4. tüp	0,5	1,5	50	1
7. tüp	200	4. tüp	0,5	3,5	25	0,5
8. tüp	25	7. tüp	0,5	0,5	12,5	0,25
9. tüp	25	7. tüp	0,5	1,5	6,25	0,125
10. tüp	25	7. tüp	0,5	3,5	3,13	0,0625

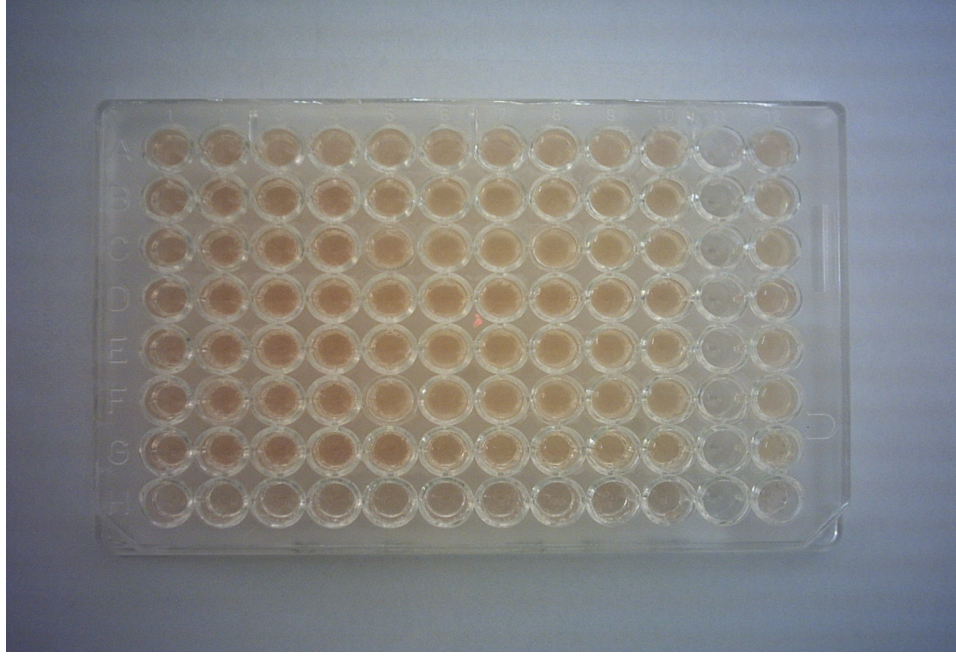
Besiyerinin Hazırlanması

CLSI M38-A referans yönteminde önerilen sentetik besiyeri L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren, sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Sigma), son konsantrasyonu 0.165 mol/l olacak şekilde 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS; Sigma) ile tamponlanarak hazırlandı. Besiyerinin pH'ı (oda sıcaklığında 6.9-7.1) 1M NaOH ile ayarlandı (38).

Küf Süspansiyonunun Hazırlanması

Stok suşlar saflığından emin olana kadar SDA'a pasajlanarak canlandırıldı. Canlandırılan suşlar eğri patates dekstroz agarda (PDA) 35°C'de 7 gün inkübe edildi. Daha sonra PDA'daki kolonilerin üzerine yaklaşık 1 ml steril %0,85 serum fizyolojik eklendi ve bir pastör pipetiyle yavaşca karıştırılarak bir süspansiyon hazırlandı. Oluşan bu süspansiyon steril bir tüpe alındı. Ağır partiküllerin çökmesi için 3-5 dk beklendikten sonra üstteki homojen kısım başka bir steril tüpe aktararak 15 sn vortekslendi. Sonra bu karışımın absorbansı 530 nm'de 0,09-0,11 (yaklaşık $0,4-5 \times 10^6$ CFU/ml) olacak şekilde spektrofotometrik olarak ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyonların sıvı RPMI 1640 besiyeri içinde 1:50 dilüsyonu (yaklaşık $0,8 \times 10^4-1 \times 10^5$) hazırlandı. Oluşan bu 1:50 dilüsyonluk karışımdan önceden hazırlanmış olduğumuz, içinde 2 kat seri dilüsyon şeklinde antifungal

dağıtılmış mikroplaklara, her kuyucuğa 100 µl gelecek şekilde eklendi (son inokulum miktarı $0,4 \times 10^4$ - 5×10^4). Antifungal ilaç dilüsyonları da 0,03-16 µg/ml olarak düzenlendi. Mikroplaklar sarsmadan etüve kaldırılarak 35 °C'de inkübe edildi (38). (Şekil 4)



Şekil-4: CLSI M38-A referans mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal duyarlılığın belirlenmesi (48. saat görünümü)

Her izolatin inokulum kantitasyonu için; absorbans ayarı yapıldıktan sonra sıvı RPMI 1640 besiyeri ile 1:100'lük dilüsyonu hazırlandı ve buradan 0,01 ml (10 µl) alınarak SDA besiyerine koloni sayımı ekimi yapıldı. Bütün çalışma boyunca koloni sayısı beklenen aralıklarda oldu ve spektrofotometrik ayarın kontrolün sağlandı.

Değerlendirme

Mikroplaklar, 24 ve 48 saatlik inkübasyonu takiben görsel olarak değerlendirildi. Kontrol kuyucuğuna göre üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuktaki konsantrasyon, amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol için MİK değeri (MİK-0) olarak belirlendi. Ketakonazol için ise kontrol kuyucuğuna

göre %50 azalmanın olduğu kuyucuk (MİK-2) MİK değeri olarak alındı. Her çalışmaya ATCC kalite kontrol suşları da dahil edildi (38).

E Test Yöntemi

Antifungal stripler:

E test stripleri üretici firmadan (AB BIODISK Solna/İsveç) temin edildi. Kullanılınca kadar -20 °C'de saklandı.

Besiyeri

E test için %2 agar ve %2 glukoz ilaveli RPMI 1640 (Sigma) besiyeri kullanıldı (pH=6,9-7,1). MOPS tamponlu olarak üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanan besiyerleri, çapı 9 mm olan steril petrilere 25'er ml dağıtıldı (43,44).

Yöntem

Spektrofotometrik olarak absorbansı 530 nm'de 0,09-0,11 olacak şekilde ayarlanan küf süspansiyonları, steril bir eküvyonla RPMI 1640 agar besiyeri yüzeyine homojen bir şekilde yayıldı. Yaklaşık 15 dk kuruması beklendikten sonra üzerine E test stripleri, bir petri kutusuna iki strip olacak şekilde yerleştirildi. 35 °C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MİK değerleri okundu (43,44).

Değerlendirme

İnkübasyon sonrası elips şeklindeki üreme inhibisyon zonunun stripe keşiştiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. E test sonuçlarını okurken üretici firmanın temin ettiği dökümanlardan yararlanıldı (Şekil-5).



Şekil-5: E test yöntemiyle antifungal duyarlılığının belirlenmesi (48 sa görünümü)

Çalışmanın Analizi

Hem 24 hem de 48. saatte okunan MİK verileri, her iki yöntem için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ olarak değerlendirildi. MİK aralığı dışında kalan veriler (off-scale) de değerlendirmeye alındı. Küçük taraftaki MİK aralığı dışı değerler aynen bırakıldı; büyük taraftaki MİK aralığı dışı değerler ise bir üst dilüsyon değerine çevrildi (44,45). Ayrıca amfoterisin B'de olduğu gibi, MİK aralıkları dar olduğu durumlarda duyarlılığı yorumlamada geometrik ortalamanın daha iyi sonuç vermesi nedeniyle geometrik ortalamalar da hesaplandı (44,45). Her iki yöntem arasındaki uyuma ± 1 ve ± 2 dilusyonda bakılarak uyumlu olan suşların sayısı yüzde olarak belirlendi. İn vitro antifungal duyarlılık testlerinde küf mantarları için break-point değerleri belli olmadığından, suşların duyarlılığı hakkında yorum yapılmadı. Sadece belirlenen değerler ve literatürdeki veriler kullanılarak karşılaştırma yapıldı.

BULGULAR

Çalışmada 194 hastaya ait toplam 222 *Aspergillus* suşunun (136 *A fumigatus*, 56 *A flavus*, 20 *A niger*, 10 *A terreus*), CLSI referans mikrodilüsyon yöntemi (M38-A) ve E test yöntemi ile amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve ketokonazol in vitro duyarlılığına bakıldı. Ayrıca suşların kaspofungin duyarlılığına sadece E test ile bakıldı. Değerlendirmeler 24. ve 48. saatlerde yapıldı. Mikrodilüsyon yöntemi ile 24. saatte tüm okumalar yapılabilirken, E test yöntemi ile 11 suş iyi üreyemedi (% 4,9) ve 24.saat okuması yapılamadı. Bu suşların beş tanesi (%3.7) *A fumigatus*, üç tanesi (%5,4) *A flavus*, iki tanesi (%20) *A terreus*, bir tanesi (%10) *A niger* idi.

Tablo-8'de; suşların 24. saatte, hem mikrodilüsyon hem de E test yöntemi ile elde edilen MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalamaları görülmektedir. Tüm suşlar dikkate alındığında; MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalamalara göre en iyi sonuçlar mikrodilüsyonda vorikonazol ile alınmıştır ve >0,5 µg/ml MİK₉₀ değeri saptanmamıştır. E test ile ise kaspofungin, vorikonazolden daha düşük değerler vermiş ve tüm suşlarda en yüksek MİK değeri 0,25 µg/ml olarak tespit edilmiştir. İtrakonazol sonuçları ise, vorikonazole yakın bulunmuştur. Her iki yöntemde en yüksek MİK değerleri ketokonazol ile alınmıştır.

İki yöntem arasında karşılaştırma yapıldığında beklendiği gibi, E test ile daha geniş MİK aralıkları elde edilmiştir (özellikle amfoterisin B ile). Yöntemler arasında ±1 dilüsyonda uyum %62-83 arasında bulunmuş olup, en iyi sonuç vorikonazol ile alınmıştır. ±2 dilüsyonda ise amfoterisin B, ketokonazol ve vorikonazol için >%90 çok iyi uyumlar elde edilmiştir. Yalnız

itrakonazol ile uyum daha düşük (%75) kalmıştır. Bunun nedeni itrakonazol ile bazı suşlarda (7 *A fumigatus*, 3 *A flavus*, 2 *A niger*) mikrodilüsyon ile alınan yüksek MİK (≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) değerleridir. Bu suşların E test sonuçları ise düşük ($\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) bulunmuştur.

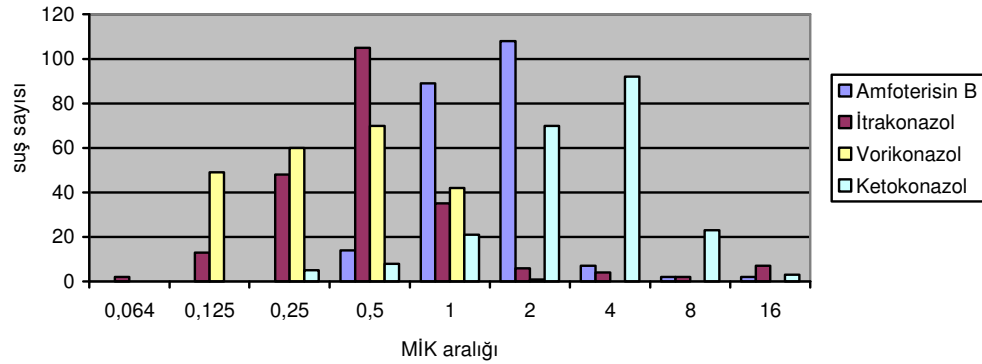
Tablo-8: *Aspergillus* suşlarında mikrodilüsyon ve E test yöntemleriyle saptanan duyarlılık sonuçları (24. sa)

Tür	Antifungal	Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)									
		Mikrodilüsyon Testi				E Test				%Uyum ±1 ²	±2 ³
		Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	G.O ¹	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	G.O		
<i>A fumigatus</i> (n=136)	Amfoterisin B	0,5-2	1	1	0,92	≤0,032-8	0,5	1	0,51	73	93
	Vorikonazol	0,125-0,5	0,125	0,25	0,18	0,064-0,5	0,25	0,25	0,20	93	100
	İtrakonazol	0,064-16	0,5	1	0,44	0,032-2	0,5	1	0,39	75	86
	Ketokonazol	0,5-8	2	4	2,20	0,5-8	4	8	3,57	81	100
	Kaspofungin ⁴					≤0,032-0,125	0,032	0,064	0,04		
<i>A flavus</i> (n=56)	Amfoterisin B	1-16	2	2	1,67	0,125-32	2	4	1,78	81	89
	Vorikonazol	0,125-1	0,5	0,5	0,34	0,064-0,5	0,125	0,25	0,17	69	97
	İtrakonazol	0,064-16	0,25	1	0,43	≤0,032-0,5	0,064	0,25	0,06	26	40
	Ketokonazol	0,064-2	0,5	1	0,61	0,25-1	0,5	0,5	0,50	89	100
	Kaspofungin					≤0,032-0,032	≤0,032	≤0,032	0,03		
<i>A niger</i> (n=20)	Amfoterisin B	0,5-2	1	1	0,83	0,064-0,5	0,5	0,5	0,35	74	84
	Vorikonazol	0,125-1	0,5	0,5	0,35	0,032-0,5	0,25	0,5	0,19	63	84
	İtrakonazol	0,125-16	1	4	1,00	0,032-4	1	2	0,63	67	83
	Ketokonazol	0,5-4	2	4	2,07	1-4	2	4	1,74	80	100
	Kaspofungin					≤0,032-0,064	≤0,032	0,032	0,03		
<i>A terreus</i> (n=10)	Amfoterisin B	1-2	1	2	1,41	0,032-32	0,5	4	1,00	33	50
	Vorikonazol	0,125-0,5	0,125	0,25	0,18	≤0,032-0,5	0,25	0,5	0,25	67	83
	İtrakonazol	≤0,032-0,5	0,125	0,25	0,15	≤0,032-0,25	0,064	0,125	0,11	57	75
	Ketokonazol	0,25-0,5	0,25	0,5	0,35	≤0,032-2	1	2	1,40	33	67
	Kaspofungin					0,032-0,25	0,032	0,25	0,06		
Toplam (n=222)	Amfoterisin B	0,5-16	1	2	1,06	≤0,032-32	0,5	2	0,66	74	90
	Vorikonazol	0,125-1	0,25	0,5	0,24	≤0,032-0,5	0,25	0,5	0,19	83	97
	İtrakonazol	≤0,032-16	0,5	1	0,46	≤0,032-4	0,25	1	0,26	62	75
	Ketokonazol	0,064-8	2	4	1,50	≤0,032-8	4	8	2,25	80	98
	Kaspofungin					≤0,032-0,25	0,032	0,064	0,04		

¹G.O. Geometrik ortalama²±1 dilüsyonda iki test arasında % uyum³±2 dilüsyonda iki test arasında % uyum⁴Kaspofungin mikrodilüsyon testi ile çalışılmadı

Tablo-9'da 48. saat MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalamalar her iki yöntem için görülmektedir. Değerler toplam olarak incelendiğinde, mikrodilüsyonla, ketokonazol hariç diğer ilaçlarda 48. saatte okunan değerler, 24. saatte okunan değerlerden biraz yükselmiş olmakla beraber belirgin fark saptanmamıştır. E test yönteminde ise, amfoterisin B ve ketokonazol MİK değerleri 48. saatte fazlaca yükseldiği göze çarpmaktadır.

Mikrodilüsyon yöntemi verilerine toplamda baktığımızda (MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalama) yine en iyi sonuç vorikonazol ile alınmıştır (Tablo-9 ve Şekil-6). Şekil-6'da da görüldüğü gibi sola en yakın olan MİK aralığı vorikonazoldedir. İtrakonazolde de düşük MİK değerleri çoğunlukta olmakla beraber (MİK₅₀ ve MİK₉₀ vorikonazol ile aynı) yüksek değerler (geometrik ortalamayı yükseltmekte) ile birlikte geniş bir aralığa dağılmıştır. Amfoterisin B MİK aralığı beklendiği üzere dardır, ancak vorikonazolden daha yüksektir. Şekil-6'da da görüldüğü gibi en yüksek MİK değerleri 24. saate olduğu gibi ketakonazol ile alınmıştır.



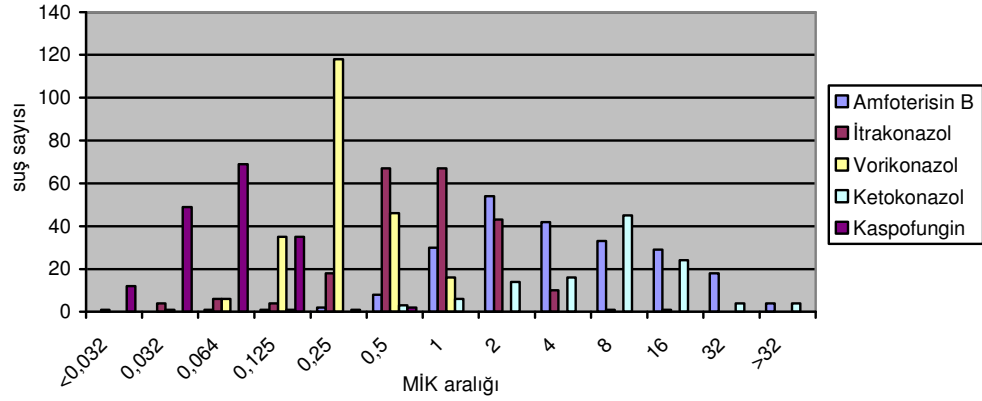
Şekil-6: CLSI referans mikrodilüsyon yöntemine göre *Aspergillus* suşlarında MİK dağılımları (48. sa)

Tablo-9:Aspergillus suşlarında mikrodilüsyon ve E test yöntemleriyle saptanan duyarlılık sonuçları(48. sa)

Tür	Antifungal	Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)									
		Mikrodilüsyon Testi					E Test			%Uyum	
		Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	G.O ¹	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	G.O	±1 ²	±2 ³
<i>A fumigatus</i> (n=136)	Amfoterisin B	0,5-4	1	2	1,30	0,125-32	2	8	2,79	63	71
	Vorikonazol	0,125-1	0,25	0,5	0,24	0,032-1	0,25	0,5	0,25	91	99
	İtrakonazol	0,125-16	0,5	1	0,49	0,25-4	1	2	0,88	63	88
	Ketokonazol	1-16	4	8	3,90	4->32	8	16	10,97	48	89
	Kaspofungin ⁴					<0,032-0,125	0,064	0,125	0,07		
<i>A flavus</i> (n=56)	Amfoterisin B	1-16	2	2	2,02	0,064->32	16	32	11,75	11	48
	Vorikonazol	0,125-2	1	1	0,71	0,064-1	0,25	1	0,30	68	91
	İtrakonazol	0,125-16	0,5	1	0,55	<0,032-4	0,5	2	0,48	59	84
	Ketokonazol	0,25-4	2	2	1,35	0,5-8	2	4	1,80	96	100
	Kaspofungin					<0,032-0,125	0,032	0,064	0,04		
<i>A niger</i> (n=20)	Amfoterisin B	0,5-2	1	1	0,87	0,5-4	1	2	1,41	95	95
	Vorikonazol	0,5-1	0,5	1	0,71	0,125-1	0,25	1	0,33	60	90
	İtrakonazol	0,5-16	1	4	1,41	0,064-16	2	4	2,07	50	80
	Ketokonazol	2-8	2	8	3,25	4-16	8	8	7,13	50	100
	Kaspofungin					<0,032-0,125	0,064	0,064	0,05		
<i>A terreus</i> (n=10)	Amfoterisin B	2-16	2	8	3,48	2->32	16	32	13,93	40	50
	Vorikonazol	0,125-0,5	0,25	0,5	0,27	0,125-0,5	0,25	0,5	0,31	90	100
	İtrakonazol	0,064-0,5	0,25	0,5	0,20	0,032-0,5	0,125	0,5	0,14	70	90
	Ketokonazol	0,25-2	0,5	1	0,57	0,125-4	2	4	1,32	60	100
	Kaspofungin					0,032-0,5	0,125	0,5	0,14		
Toplam (n=222)	Amfoterisin B	0,5-16	2	2	1,46	0,064->32	4	16	4,05	52	75
	Vorikonazol	0,125-2	0,5	1	0,35	0,032-1	0,25	0,5	0,27	82	96
	İtrakonazol	0,064-16	0,5	1	0,54	<0,032-16	1	2	0,75	61	86
	Ketokonazol	0,25-16	4	8	2,69	0,125->32	8	16	6,46	59	92
	Kaspofungin					<0,032-0,5	0,064	0,125	0,06		

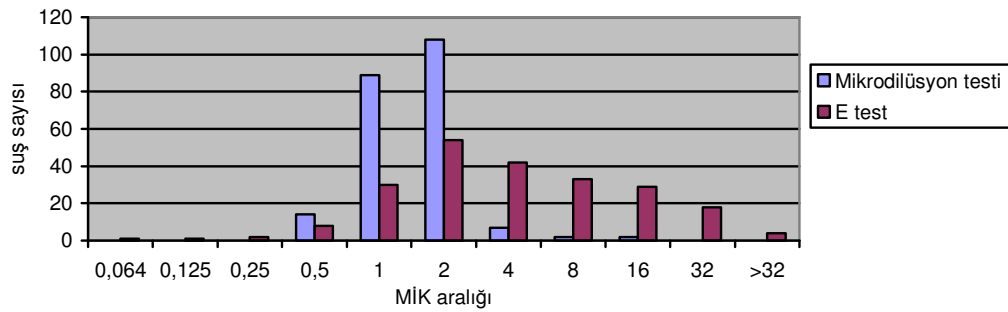
¹G.O. Geometrik ortalama²±1 dilüsyonda iki test arasında % uyum³±2 dilüsyonda iki test arasında % uyum⁴Kaspofungin mikrodilüsyon testi ile çalışılmadı

Şekil-7'de E test yönteminde elde edilen MİK değerlerinin dağılımı görülmektedir. En iyi sonuçlar kaspofungin ile alınmıştır. Şekil-6 ile karşılaştırılacak olursa vorikonazol hariç tüm ilaçlarda mikrodilüsyon yöntemine göre daha geniş MİK aralıkları görülmüştür. En yüksek MİK değerleri yine ketokonazol ile alınmıştır.



Şekil-7: E test yöntemine göre *Aspergillus* suşlarında MİK dağılımları (48 sa)

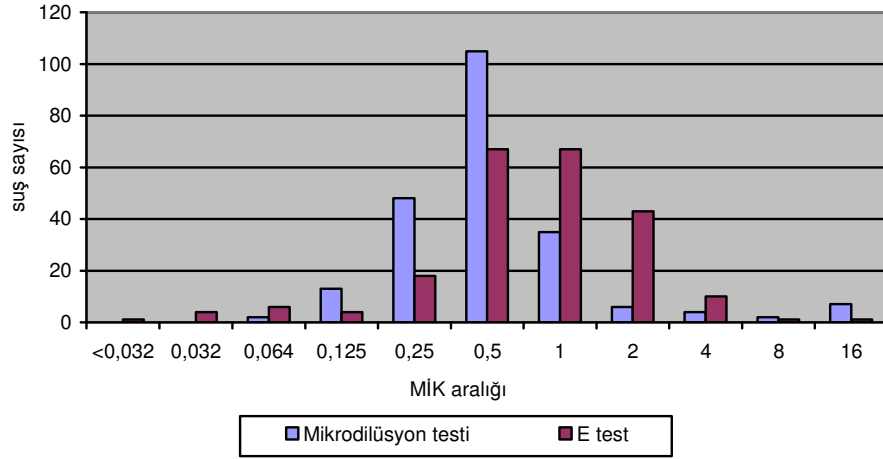
Şekil-8'de Amfoterisin B'nin her iki yöntemle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı görülmektedir. Burada, mikrodilüsyon yönteminde beklendiği gibi, değerlerin dar bir MİK aralığında toplandığı, E test yönteminde ise daha geniş ve yüksek MİK aralığı elde edildiği görülmektedir.



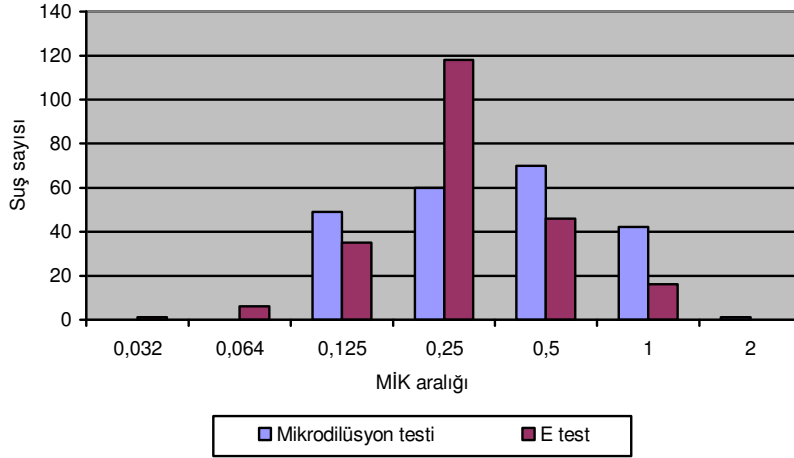
Şekil-8: *Aspergillus* türlerinde CLSI referans mikrodilüsyon ve E test yöntemiyle **Amfoterisin B MİK dağılımı (48. sa)**

Şekil 9 ve 10'da ise itrakonazol ve vorikonazolün her iki yöntemle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı görülmektedir. Şekillerde de görüldüğü

gibi, her iki yöntemle de MİK dağılımları birbirine paraleldir. Vorikonazolde aralık daha darken, itrakonazolde daha geniştir.

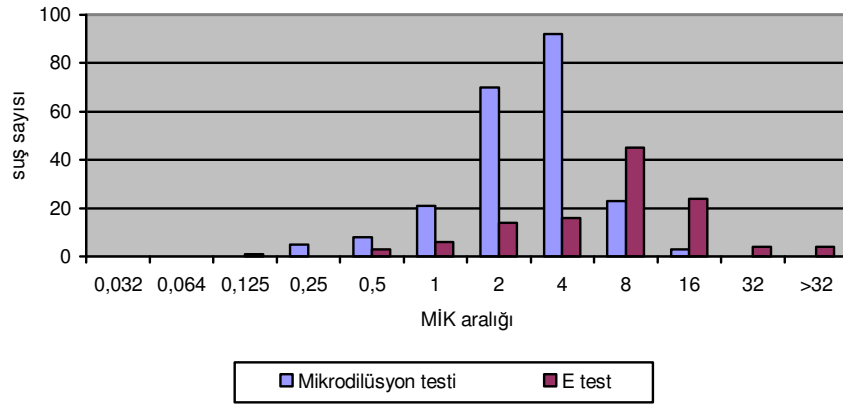


Şekil-9: *Aspergillus* türlerinde CLSI referans mikrodilüsyon ve E test yöntemiyle **İtrakonazol** duyarlılığı MİK dağılımı (48. sa)



Şekil-10: *Aspergillus* türlerinde CLSI referans mikrodilüsyon ve E test yöntemiyle **Vorikonazol** duyarlılığı MİK dağılımı (48. sa)

Şekil-11'de ketokonazolün her iki yöntemle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı görülmektedir. Burada da mikrodilüsyon yöntemiyle ketokonazolün MİK aralığının sol tarafa daha yakın olduğu, E test yönteminde ise daha yüksek veriler nedeniyle biraz daha sağa kaydığı görülmektedir.



Şekil-11: *Aspergillus* türlerinde CLSI referans mikrodilüsyon ve E test yöntemiyle **Ketokonazol** duyarlılığı MİK dağılımı (48. sa)

Amfoterisin B ve ketokonazolde 48. saatte E test ile alınan yüksek MİK değerleri nedeniyle iki yöntem arasında ± 1 dilüsyondaki uyum 24. saatten daha düşük bulunmuştur (Tablo-8 ve 9). Vorikonazol ve itrakonazolde böyle bir sorun olmadığından 24. ve 48. saatlerde elde edilen uyumlar birbirine yakındır.

Her iki inkübasyon süresi ve hem mikrodilüsyon, hem de E test verileri dikkate alındığında amfoterisin B, sırasıyla *A niger* ve *A fumigatus*'a en etkili bulunmuştur. 24. saatte bu ilaç için en kötü sonuçlar *A flavus* ile alınırken, 48. saatte *A terreus*'da daha yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Benzer şekilde her iki inkübasyon süresi ve yöntemle de itrakonazol *A niger*'e; ketokonazol ise *A fumigatus*'a en az etkili bulunmuştur. Bu iki ilacın, amfoterisin B'nin yüksek MİK değerleri verdiği *A flavus* ve *A terreus*'da iyi olduğu dikkati çeken bir bulgu olmuştur. Vorikonazolün ise, her iki inkübasyon ve yöntemde tüm türlerde benzer sonuçlar oluşturduğu görülmüştür (Tablo-8 ve 9). Yalnızca E test ile çalışılan kaspofunginin MİK değerleri ise, vorikonazolden de daha düşüktür.

Her ne kadar küf mantarları için break-point değerleri belli değilse de, çalışmaların çoğunda, hem amfoterisin B, hem de itrakonazol ve yeni triazoller için ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ MİK değerleri, duyarlılık sınırı olarak belirtilmektedir

(54,58). Bu nedenle tüm suşlarda dört ilacın MİK değerleri ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ olanların yüzdesi hesaplanarak Tablo-10'da sunulmuştur. Görüldüğü gibi yine en iyi ilaç %99,5 ile vorikonazol ve ikinci etkin ilaç da itraconazoldür

Tablo-10: *Aspergillus* türlerinde mikrodilüsyon ve E test yöntemiyle saptanan MİK ≤ 1 olanların yüzdesi (48 saat verileri değerlendirilmiştir)

Antifungal		Mikrodilüsyon Testi	E test
Amfoterisin B	MİK ≤ 1	%46,4	%18,92
İtraconazol	MİK ≤ 1	%91,44	%75,22
Ketokonazol	MİK ≤ 1	%15,32	%8,55
Vorikonazol	MİK ≤ 1	%99,55	%100

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm dünyada, bağışıklığı baskılanmış hasta popülasyonundaki artışa paralel olarak invaziv mantar enfeksiyonlarının önemi de giderek artmıştır. Mantar enfeksiyonlarının büyük bir kısmından *Candida* türleri sorumlu olmakla beraber, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Zygomycetes* türleri gibi hiyalen yapıda filamentöz mantarların sebep olduğu invaziv enfeksiyonlar da son yıllarda sıklaşmıştır (4-9). Küf mantarlarıyla gelişen bu invaziv enfeksiyonların, hem etken hem de konağa bağılı (bağışıklığı baskılanmış, özellikle nötropenik) birçok faktör nedeniyle tedavisi zordur ve bu enfeksiyonların morbidite ve mortalitesi yüksek seyretmektedir.

Ciddi aspergillozların büyük çoğunluğundan (%80-90) *A fumigatus* sorumludur. Bunun yanında, *A flavus*, *A niger* ve *A terreus* izole edilebilen diğer türlerdir. Amfoterisin B; uzun süre invaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisinde tek ajan olarak kalmış olmakla birlikte, son zamanlarda geliştirilen vorikonazol, posakonazol, ravukonazol gibi triazoller; kaspofungin, mikafungin, anidulafungin gibi ekinokandinler antifungal tedaviye yenilikler getirmiş ve tedavi seçeneklerini arttırmıştır. Ayrıca tedavi sırasında gelişebilen dirençli *A fumigatus* suşlarının bildirilmesi (54,56,57) ve *A terreus* gibi intrensek dirençli nadir suşların da etken olarak daha sık ortaya çıkabilmesi, işin boyutunu genişletmiş ve in vitro antifungal duyarlılık testlerine duyulan gereksinim artmıştır (31-33).

CLSI tarafından 1998'de geliştirilen ve 2002 yılında revize edilen M38-A referans mikrodilüsyon yöntemi bu ihtiyacı büyük oranda karşılamakla birlikte, bu yöntemin zaman alıcı ve zahmetli bir yöntem olması, alternatif

antifungal duyarlılık testleri arayışını doğurmuştur. Bu konuda öne çıkan yöntemlerden bir tanesi, kolay ve pratik bir test olan E test yöntemidir. E test yönteminde MİK aralıkları, referans yöntemine göre daha geniş olarak elde edilmekte ve referans yöntemle çok dar MİK aralığı veren amfoterisin B için bir avantaj oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan geniş katımlı çalışmalar sonunda, maya ve küf mantarlarının amfoterisin B duyarlılığında artık E testin kullanılması fikri gündeme gelmiştir (44).

Çalışmamızda 222 *Aspergillus* suşunun, amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve vorikonazole karşı in vitro antifungal duyarlılığı mikrodilüsyon ve E test yöntemleri ile araştırıldı. Kaspofungin duyarlılığına ise ham maddesi bulunmadığından sadece E test ile bakıldı. Referans yöntem ve birçok çalışmaya göre E test yönteminde sonuçların 48. saatte değerlendirilmesi önerilmekle beraber, bu çalışmada 24. saat değerlendirmesi de yapıldı. Daha kısa zamanda doğru sonuçlara ulaşabilmek her zaman istenen bir hedef olduğundan bu çalışmada karşılaştırma amacıyla 24. saat sonuçları okundu.

Mikrodilüsyon sonuçları 24. saatte gayet rahat okunabildi ve 48. saat değerlendirmesinin ketakonazol hariç diğer ilaçlarda çok farklı olmadığı, en fazla bir dilüsyon yükseldiği saptandı. İtrakonazol ve vorikonazol sonuçlarına bakıldığında; tüm türlerde (*A niger*-itrakonazol hariç) bu bir dilüsyonluk yükselme MİK₉₀ değerlerinin $\leq 1\mu\text{g/ml}$ olmasını değiştirmedir. İtrakonazol ve yeni triazolün (vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) MİK değerlerinin $\leq 1\mu\text{g/ml}$ olması, her ne kadar break-point değerleri belirli olmasa da duyarlılığı gösterdiği bildirilmektedir (10,45,58). Dolayısıyla triazolün için bizim çalışmamıza göre 24. saatte okumanın yapılabileceği yanlış olmayacaktır. Bir imidazol olan ketokonazolde ise, 48. saat geometrik ortalamaları iki kata yakın artış göstermiştir. Ancak triazolün gündeme gelmesi ile bu ilaç değerini kaybetmiş ve günümüzde aspergillozlarda kullanımı çok az olan bir ilaç haline gelmiştir (22,25). Bu nedenle bu bulgunun göz ardı edilebileceği sonucuna varılmıştır. Her ne kadar amfoterisin B verileri de 48. saatte çok fazla değişmese de, MİK aralıkları ve

MİK₉₀ değerlerinde 2, 4, 16 µg/ml gibi yüksek rakamlarla karşılaşmıştır. Bu değerler, amfoterisin B MİK verilerinin de triazoller gibi ≤1µg/ml olmasının daha fazla tercih edilmesi nedeniyle düşündürücü değerlerdir (59). Bununla beraber tablo-8 ve 9 incelendiğinde esas problemin *A terreus*'da olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi *A terreus* zaten amfoterisin B'ye dirençli bir türdür (60). Ancak *A flavus*'da da MİK aralıklarında literatürle çok uyuşmayan, 16 µg/ml'lik MİK değerleri saptanmıştır. Belki de bizim *A flavus* suşlarımızda bir direnç problemi vardır. Ancak bunu doğrulamak, ya iyi bir klinik korelasyon ya da in vivo hayvan deneyleri ile mümkündür.

Yirmidördüncü saat değerlendirmesinde, mikrodilüsyon sonuçları gayet rahat okunabilirken, E test yöntemi ile 11 suşun (% 4,9) iyi üreyemediği saptandı. Bu suşların beş tanesi (%3.7) *A fumigatus*, üç tanesi (%5,4) *A flavus*, iki tanesi (%20) *A terreus*, bir tanesi (%10) *A niger* idi. Görüldüğü gibi % 20 oranla en zor üreme *A terreus*'da yaşandı ve bu türün; literatürle de uyumlu olarak 24. saatte, agar bazlı besiyerlerinde (%2 glikoz eklenmesine rağmen) zor ürediği sonucuna varıldı (43). Bunun ötesinde amfoterisin B ve ketokonazol E test verilerinin 48. saatte 24. saate göre çok fazla yükseldiği dikkati çekti ve bu yükselme nedeniyle mikrodilüsyonla olan uyum oranları da bu ilaçlar için 24. saate göre düştü. Bu bulgu da 24. saatte de okumanın yararlı olacağı sonucunu destekledi. İtrakonazol ve vorikonazolde böyle bir sorun yaşanmadı (Tablo-8 ve 9).

Tablo-8 ve 9 da görüldüğü gibi, tüm ilaçlar ve tüm suşlar dikkate alındığında önceki çalışmalara benzer şekilde mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol ile en iyi sonuçlar alınırken, E test yöntemiyle vorikonazol duyarlılıkları, kaspofunginden sonra ikinci sırada yer almıştır (43,45).

Amfoterisin B'nin en etkili olduğu tür *A niger*'dir. Her iki yöntem ve her iki inkübasyon sürelerinde de, MİK₅₀ değerleri ≤1µg/ml kalmış ve geometrik ortalamalar da diğer türlerden düşük olarak tespit edilmiştir. En yüksek değerler ise *A flavus* ve *A terreus* ile alınmıştır. *A terreus*'da yüksek değerler

alınması doğal karşılanırken, yukarıda da bahsedildiği gibi *A flavus*'daki yükseklik literatürden biraz farklıdır ve bu yükseklik 48. saatte E test ile daha belirgin olarak göze çarpmıştır (43). Ancak amfoterisin B break point değerleri bilinemediğinden ve in vivo-in vitro korelasyon hakkında yeterli bilgi olmadığından bu değerleri yorumlamak zordur. Sadece karşılaştırmalı olarak yüksek olduğu söylenebilir.

Ketokonazol ve itraconazol ise, kısmen amfoterisin B'nin tersi etkide görülmekte olup, en iyi sonuçlar *A flavus* ve *A terreus*'da alınmıştır. İtraconazol *A niger*'e, ketokonazol ise *A fumigatus*'a en az etkili olmuştur. Bu bulgular her iki inkübasyon süresi ve her iki yöntemde de değişmeden sabit kalmış ve literatürle uyumlu bulunmuştur (44,58). Vorikonazolün ise etkinliği tüm türlerde birbirine yakın ve iyidir. Vorikonazolün itraconazol gibi türe göre belirli bir yatkınlık göstermemesi, belki de flukonazolün bir türevi olmasından kaynaklanabilir. Eğer çalışılıyorsa itraconazolün türevi olan posakonazolün, itraconazol benzeri tür etkinliği oluşturabileceği akla yatkın bir açıklamadır.

Kaspofungin duyarlılığına bu çalışmada maalesef yalnız E test ile bakılabilmiş ve bu nedenle yöntemlerin kıyaslaması yapılamamıştır. Bununla beraber E test ile 48. saatte bile tüm değerler $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ altında kalmıştır. Sadece iki *A terreus* suşu 48. saatte $0,5 \mu\text{g/ml}$ MİK değeri vermiştir. Ancak mikrodilüsyon çalışılmadığı için ve E test yöntemi standart yöntem olmadığı için “en etkili ilaç kaspofungin”dir yorumunu yapmak kanımızca doğru olmayacaktır.

İki test arasındaki uyumlar değerlendirildiğinde inkübasyon süresiyle değişmeksizin, ± 1 ve ± 2 dilüsyonlarda en iyi uyumlar tüm suşlarda vorikonazol ile alınmıştır. Yirmidördüncü ve 48. saatlerde ve $\pm 1/\pm 2$ dilüsyonlarda sırasıyla %83-97 ve %82-96'lık uyumlar elde edilmiş ve bu oranların literatürle benzer olduğu saptanmıştır (43). Diğer antifungallerde ise her iki dilüsyonda da uyumlar 48. saatte amfoterisin B ve ketokonazolde düşerken itraconazolde ± 1 dilüsyonda aynı kalmış (%61), ± 2 dilüsyonda ise

%86'ya çıkmıştır (Tablo-8 ve 9). Yukarıda da açıklandığı gibi amfoterisin B ve ketokonazol E test verilerinin 48. saatte fazla yükselmesi, uyumun azalmasının nedenidir. Bununla beraber ± 2 dilüsyonda uyumların kabul edilebilir düzeye çıktığı saptanmış ve özellikle ketokonazolde %100'lük sonuçlar elde edilmiştir. Zaten literatürlerin çoğunda da ± 2 dilüsyondaki uyumlar kullanılmaktadır (43-46).

Tür düzeyinde iki yöntem arasındaki uyumlar incelendiğinde ise, en iyi verilerin *A fumigatus*'da alındığı görülmektedir.

İki yöntem arasındaki uyum ne olursa olsun, burada en önemli nokta E testin, duyarlılık paterninin ilaçlar ve türler arasında referans mikrodilüsyon yönteminden farklı olmamasıdır. MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ ve geometrik ortalamalarda fark olsa da, mikrodilüsyon sonuçları ile de aynı yorumları yapmak mümkündür. Yeni bir yöntemin yetersizliğinden ancak break-point değerleri belli olduğu zaman bahsedilebilir. Şu an için break-point değerleri belli olmadığından ve E test ve mikrodilüsyon yöntemi ile aynı yorumlar yapılabildiğinden, bu çalışmaya göre de (literatürde olduğu gibi) E testin iyi bir alternatif olduğu sonucu çıkarılabilir (43-47).

SONUÇ

1- Her ne kadar in vitro antifungal duyarlılık sonuçlarının 48. saatte okunması önerilse de, bizim verilerimize göre 24. saatte de okumanın yapılması yararlı olacaktır. Sadece E test yönteminde bazı suşların üreme zorluğu göstereceği unutulmamalıdır.

2- Bu çalışmaya göre, referans mikrodilüsyon yönteminde en iyi sonuçlar vorikonazol ile alınmıştır ve vorikonazolün *Aspergillus* türleri arasında bir ayrımı yoktur. Türlerin %90'ından fazlası ≤ 1 µg/ml MİK değeri ile inhibe olmuştur.

3- Kaspofungin E test yöntemi ile vorikonazolden daha düşük MİK değerleri vermiş olmakla beraber, referans mikrodilüsyon yöntemi çalışılmadığından tam yorum yapmak doğru değildir. Kaspofunginin de vorikonazol gibi tür ayrımı yoktur.

4- Vorikonazol ve kaspofungin gibi yeni antifungallerle karşılaştırıldığında, klasik ilacımız amfoterisin B'nin MİK değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik *A flavus* ve *A terreus*'da belirgindir. *A terreus* nadir etken olduğu ve zaten amfoterisin B'ye dirençli kabul edildiğinden, *A flavus*'daki yükseklik bizce daha önemlidir. Bununla beraber bu direncin in vivo yansımaları tahmin etmek şu aşamada mümkün değildir.

5- Vorikonazolden daha eski bir triazol olan itrakonazolün sonuçları vorikonazole yakındır ve vorikonazole bir alternatif olabilir. Ancak bu ilacın kötü farmakokinetiği kullanımını kısıtlamakta ve klinik kullanımda ilaç yetersiz kalmaktadır. Henüz ülkemizde bulunmayan intra-venöz formu getirilirse, kanımızca invaziv aspergilloz tedavisinde bu ilaç da bir seçenek olacaktır.

6- E test verileri her ne kadar mikrodilüsyondan biraz farklı olsa da, yukarıdaki yorumları aynen E test ile de yapmak mümkün olacağından mikrodilüsyona daha kolay ancak daha pahalı bir alternatiftir.

KAYNAKLAR

1. Sigler L, Verweij PE. *Aspergillus, Fusarium, and other opportunistic moniliaceous fungi*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington DC: ASM Press; 2003. 1726-60.
2. Kuştimur S. *Aspergillus, Fusarium ve diğer kũf mantarları*. Topçu AW, Sũyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1833-40.
3. Patterson TF. *Aspergillus species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. 2958-73.
4. Kullberg BJ, Oude Lashof AML. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* 2002; 7:183-91.
5. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1692-6.
6. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol* 2007; 48:1-12.
7. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:499-511.
8. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:909-17.
9. Kuştimur S. Hastane enfeksiyonlarına neden olan mantarların dünyada ve Tũrkiye’de dağılımı. Yeğenoğlu Y, Erturan Z (eds). *Tũrk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını No:46*. İstanbul: Çatı Grafik; 2003. 47-58.
10. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, and the Sentry participants group. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp and other filamentous fungi: report from SENTRY antimicrobial surveillance program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1032-7.
11. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1524-8.

12. Mutlu G. *Aspergillus* ve Aspergilloz. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş (eds). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını No:36. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1999. 17-35.
13. Özyaral O. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. Ener B (ed). *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2006. 30-41.
14. Mycology Online, The University of Adelaide. [www.mycology.adelaide.edu.au/fungaldescriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus](http://www.mycology.adelaide.edu.au/fungaldescriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus).
15. Control Calidad SEIMC. Aspergillus and aspergilosis. www.seimc.org/control/revi_Mico/asperguillus.htm.
16. İnci R. Solunum sisteminin mantar hastalıkları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 599-611.
17. Akova M. İnvaziv Aspergillozis. Akova M, Akan H (eds). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda invaziv fungal enfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006. 51-66.
18. Maertens J, Theunissen K, Deren D, Meersseman W, van Eldere J. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol* 2006; 44: 173-8.
19. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34:7-14.
20. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: time for a new 'gold standard'. *Clin Infect Dis* 2003; 37:415-25.
21. Arıkan S, Rex JH. Antifungal agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition. Washington DC: ASM Press; 2003. 1859-68.
22. Kayaalp SO. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Kayaalp SO (eds). *Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık; 2002. 301-9.
23. Töre O. Antifungal ilaçlar. Kılıçtırgay K (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Bursa: Güneş Kitabevi; 1994. 380-91.
24. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000; 30:653-7.

25. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (suppl 1): 1-10.
26. Öztürk R. Vorikonazol: Mikrobiyolojik ve farmakolojik özellikler. Flora 2005; 10 (ek 2): 1-11.
27. Johnson LB. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. Clin Infect Dis 2003; 36: 630-7.
28. Uzun Ö. Antifungal tedavide yenilikler. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2003; 7:5-10.
29. Herbrecht R. Posaconazole: a potent, extended spectrum triazole antifungal for the treatment of serious fungal infections. Int J Clin Pract 2004; 58:612-24.
30. Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. Clin Infect Dis 2003; 36:1445-57.
31. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 643-58.
32. Özkütük A. Antifungal duyarlılık testleri ve antifungal tedaviye katkıları. Ener B (eds). *Aspergillus*. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2006. 256-64.
33. Arıkan S. Antifungal duyarlılık testleri ve klinik önemi. Akova M, Akan H (eds). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda invaziv fungal enfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006. 39-50.
34. Galgiani JN. Antifungal susceptibility tests. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:1867-70.
35. Yücesoy M. Mayalar için antifungal duyarlılık testleri. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş (eds). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını No:36. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1999. 191-9.
36. National Committee for Laboratory Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts. Approved Standard M27-A₂ National Committee for Laboratory Standards. Villanova, 2002.
37. Espinel-Ingroff AE, Bartlett M, Bowden R et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 1997; 35: 139-43.
38. National Committee for Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming

Filamentous Fungi; Approved Standard M38-A. National Committee for Laboratory Standards. Wayne Pa, 2002.

39. Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods: yeast and filamentous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington DC: ASM Press; 2003. 1880-93.
40. Clancy CJ, Nguyen MH. Comparison of a photometric method with standardized methods of antifungal susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol* 1997;35:2878-82.
41. Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1450-52.
42. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE. Comparison of the E test and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2876-85.
43. 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; 40:2101-07.
44. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1360-67.
45. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp: comparison of E test and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1126-29.
46. 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; 37:1480-83.
47. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of E test and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3359-61.

48. Manavathu EK, Nune U, Kanuri K, Chandrasekar PH, Abraham OC. Effect of test medium on *in vitro* susceptibility testing results for *Aspergillus fumigatus*. Rev Iberoam Micol 2000; 17:107-10.
49. National Committee for Laboratory Standards. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast: Approved Guidance M44-A. National Committee for Laboratory Standards. Wayne Pa, 2004.
50. Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2004; 42:2249-51.
51. Ramani R, Gangwar M, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus* and comparison of mode of action of voriconazol vis-a-vis amphotericin B and itraconazol. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3627-9.
52. Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:129-34.
53. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol 2006; 44: 819-26.
54. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in vitro susceptibility testing to itraconazole and in vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infections. J Antimicrob Chemother 1997; 40:401-14.
55. Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, Moore CB, Warn P, Warnock DW, Denning DW. Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. J Antimicrob Chemother 2000; 45:85-93.
56. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1364-8.
57. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 497-502.
58. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp and *Aspergillus* spp: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). J Clin Microbiol 2006;44:1782-87.

59. Dikema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microb* 2003;41:3623-6.
60. Graybill, JR, Hernandez S, Bocanegra R, Najvar LK. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3715-19.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi'ndeki uzmanlık eğitimim boyunca; bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın Prof Dr Safiye Helvacı'ya, büyük desteğini gördüğüm ve ihtiyaç duyduğum her konuda tüm içtenliğiyle yardım eden tez danışmanım sayın Prof Dr Beyza Ener'e, yetişmemde emekleri olan sayın hocalarım Prof Dr Okan Töre'ye, Prof Dr Güher Görál'a, Prof Dr Suna Gedikođlu'na, Prof Dr Reşit Mıstık'a, Prof Dr Halis Akalın'a, Doç Dr Barbaros Oral'a, Doç Dr Cüneyt Özakın'a, Yard Doç Dr Yasemin Heper'e, Yard Doç Dr Melda Sınırtaş'a, Yard Doç Dr Emel Yılmaz'a, Uzm Dr Sevim Akçađlar'a, Uzm Dr Oktay Alver'e, Uzm Dr Canan Evc'i'ye, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, laboratuvar, klinik, poliklinik ve kan merkezindeki biyolog, hemşire, teknisyen arkadaşlarıma ve anabilim dalının diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca buraya kadar gelmemde büyük emeği olan aileme, her zaman desteğinin, ilgisinin benimle olduğunu bildiğim eşime, yanımda olmasından sonsuz mutluluk duyduğum kızıma teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

06.01.1970 tarihinde Adana'da doğdum. İlköğrenimimi Adana Mehmet Akif Ersoy İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Atatürk Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Adana Kız Lisesi'nde tamamladım. Eğitimime 1987 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde devam ettim. 1993 yılındaki mezuniyetimden sonra 1994 yılı Ocak ayında Niğde ili Çamardı İlçesi Sağlık Merkezi'nde hekimlik hayatıma başladım. 1994-1996 yılları arasındaki dönemde burada çalıştıktan sonra Kocaeli Merkez Yenidoğan Sağlık Ocağı Tabipliği'ne atandım. Burada da 1999 yılı Kasım ayına kadar çalıştıktan sonra Bursa Orhaneli Sağlık Ocağı'na atanarak burada hekimlik yapmaya devam ettim. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir kız çocuk annesiyim.