

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**ASPERGİLLOZ ETKENLERİNDE AZOL DİRENCİNİN
GRADİENT TEST VE AGAR PLAK YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Zeynep YAZGAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı**

ARALIK, 2023

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



ASPERGİLLOZ ETKENLERİNDE AZOL DİRENCİNİN
GRADİENT TEST VE AGAR PLAK YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Zeynep YAZGAN
(Y1995.560002)

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Reyhan ÇALIŞKAN
Eş Danışman: Prof. Dr. Gökhan AYGÜN

ARALIK, 2023

ONAY FORMU

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Aspergilloz Etkenlerinde Azol Direncinin Gradient Test ve Agar Plak Yöntemleriyle Araştırılması” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Kaynakça’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim.
(28/12/2023)

Zeynep YAZGAN

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmam boyunca bilgi ve görüşleri ile yoluma ışık tutan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Reyhan ÇALIŞKAN'a,

Bilimsel düşünceleri, yönlendirmeleri ile katkılarını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e,

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim, beni hayata hazırlayan, en kıymetlilerim canım anneme, yokluğunu her an hissettiğim, özlemi hiç dinmeyen rahmetli canım babama,

Doktora yaptığım süreçte desteğini ve anlayışını esirgemeyen eşim Mustafa YAZGAN'a,

Hayatımın en heyecanlı, en mutlu, en sıkıntılı anlarını birlikte göğüslediğim ve kalbimdeki sevginin en büyük payına sahip canım kızlarım Sümeyye YAZGAN ve Mihrimah YAZGAN'a destekleri, sabırları ve anlayışları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, babama ithaf edilmiştir.

Aralık, 2023

Zeynep YAZGAN

ASPERGİLLOZ ETKENLERİNDE AZOL DİRENCİNİN GRADİENT TEST VE AGAR PLAK YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: İnvaziv fungal enfeksiyonlar özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda morbidite ve mortalite açısından ciddi bir tehdittir. En sık izole edilen etkenler *Aspergillus* cinsi mantarlar olup, tedavide ilk tercih azollere duyarlılık azalmaktadır. Çalışmamızda, *Aspergillus spp.* türlerinde azol direncinin belirlenmesinde agar plak tarama yönteminin hızlı, kolay ve pratik bir yöntem olarak kullanımının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamız; çeşitli klinik örneklerden üretilen 125 *Aspergillus spp.* izolatıyla yürütülmüştür. *Aspergillus spp.* izolatları konvansiyonel yöntemlerle tür tanımı yapılarak, gradient test ve agar plak tarama yöntemiyle azol direnci belirlenmiştir. Dirençli izolatlarda broth mikrodilüsyon yöntemi uygulanmış, *cyp51A* geninde CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda 55 *A.fumigatus*(%44), 42 *A.flavus*(%33,6), 6 *A.terreus*(%5), 4 *A.niger*(%3), 18 *Aspergillus spp.*(%14) tanımlanmıştır. Gradient test yöntemiyle; *A.fumigatus* izolatlarından 1'inde(%1,8) VOR, POS'e, 3'ünde(%5,45) ITR'e direnç saptanmıştır. *A.terreus* izolatlarından 1'inde(%16,7) VOR-MİK 1µg/ml, *A.niger* izolatlarından 1'inde(%25) ITR-MİK 2µg/ml, *Aspergillus spp.* izolatlarından 1'inde(%5,6) ITR-MİK 4µg/ml, 2'sinde(%11) VOR-MİK ve POS-MİK sırasıyla 1,5µg/ml, >32µg/ml ve 0,5µg/ml, 8µg/ml saptanmıştır.

Agar plak yöntemiyle; *A.fumigatus* izolatlarından 1'inde(%1,8) VOR, ITR, POS'e, *A.terreus* izolatlarından 1'inde(%16,7) VOR'e, *A.niger* izolatlarından 1'inde(%25) ITR'e, *Aspergillus spp.* izolatlarından 2'sinde(%11) VOR, POS'e, 1'inde(%5,6) ITR'e direnç saptanmıştır. Duyarlılık ve özgüllük *A. fumigatus* türlerinde VOR ve POS için %100, ITR için sırasıyla %33,3 ve %100, *A. flavus*

türlerinde ITR için %100, *A. terreus* türlerinde ITR ve POS için %100 saptanmıştır.

Gradient test ve/veya agar plak tarama yöntemiyle direnç saptanan 7 izolatta broth mikrodilüsyon yöntemiyle; 1 *A.fumigatus* ITR, VOR, POS'e dirençli, 2 *A.fumigatus* ITR'e dirençli, 1 *A.terreus* izolatında ITR ve VOR MİK 1µg/ml ve 0,5µg/ml, 1 *A.niger* ITR MİK 4µg/ml, 2 *Aspergillus spp.* ITR, VOR, POS MİK sırasıyla 2µg/ml ve 8µg/ml, 8µg/ml ve >32µg/ml, 0,5µg/ml ve 4µg/ml saptanmıştır. Bu izolatlardan 5'inde CypA-L98H, 6'sında CypA-M220 mutasyonları belirlenmiş, 1'inde mutasyon saptanmamıştır. Direnç saptanmayan 1 izolatta CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları belirlenmiştir.

Sonuçlar: Aspergilloz tedavisinde hızlı antifungal duyarlılık tarama testlerine ihtiyaç artmaktadır. Çalışmamızda agar plak yönteminin duyarlılığı *A.fumigatus* ITR için %33,3 saptanmış olsa da, diğer türlerde ITR, VOR, POS için duyarlılığı ve özgülüğü %100 belirlenmiştir. *A.fumigatus* için saptanan düşük duyarlılık değeri, agar plak ilaç konsantrasyonlarının EUCAST rehberlerinin son düzenlemeleriyle uyumlu olarak güncellenmesi gerektiğini göstermiştir. Çalışmamızda saptanan CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları, ülkemizde azol direnciyle ilişkili mutasyonların farklı bölgelerdeki dağılımlarının araştırılması gerektiğini düşündürmüştür. Sonuç olarak; azol direncinin saptanması için kolayca uygulanabilen agar plak yönteminin rutin kullanımda hızlı ve pratik bir yöntem olması ile hem etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine, hem de epidemiyolojik verilerin oluşmasına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus*, agar plak, azol direnci, cyp51A, cypA-L98H, cypA-M220.

INVESTIGATION OF AZOL RESISTANCE IN ASPERGILLOSIS CAUSED BY GRADIENT TEST AND AGAR PLAQUE METHODS

ABSTRACT

Objective: Invasive fungal infections are a serious threat in terms of morbidity and mortality, especially in immunocompromised patients. The most frequently isolated agents are *Aspergillus* genus fungi, and sensitivity to azoles, which are the first choice in treatment, decreases. In our study, we aimed to investigate the use of the agar plate screening method as a fast, easy and practical method in determining azole resistance in *Aspergillus spp.* species.

Methods: Our study; was conducted with 125 *Aspergillus spp.* isolates produced from various clinical samples. *Aspergillus spp.* isolates were identified by conventional methods and azole resistance was determined by gradient test and agar plate screening method. Broth microdilution method was applied to resistant isolates, and CypA-L98H and CypA-M220 mutations in the *cyp51A* gene were investigated.

Results: In our study, 55 *A. fumigatus* complex (44%), 42 *A. flavus* (33.6%), 6 *A. terreus* (5%), 4 *A. niger* (3%) and 18 *Aspergillus spp.* (14%) were identified. With the gradient test method; resistance to VOR and POS was detected in 1 (1.8%) of *A.fumigatus* isolates, and resistance to ITR was detected in 3 (5.45%). In 1 of the *A.terreus* isolates (16.7%), the VOR-MIC was 1µg/ml, in 1 of the *A.niger* isolates (25%), the ITR-MIC was 2µg/ml, in 1 of the *Aspergillus spp.* isolates (5.6%). ITR-MIC was 4µg/ml, in 2 cases (11%) VOR-MIC and POS-MIC were found to be 1.5µg/ml, >32µg/ml and 0.5µg/ml, 8µg/ml respectively.

With the agar plate method; 1 of the *A.fumigatus* isolates (1.8%) had VOR, ITR, POS, 1 of the *A.terreus* isolates (16.7%) had VOR, 1 of the *A.niger* isolates (25%) had ITR. Resistance to VOR and POS was detected in 2 *Aspergillus spp.* isolates (11%), and resistance to ITR was detected in 1 (5.6%). Sensitivity and

specificity were determined as 100% for VOR and POS in *A. fumigatus* species, 33.3% and 100% for ITR, respectively, 100% for ITR in *A. flavus* species, and 100% for ITR and POS in *A. terreus* species.

By broth microdilution method in 7 isolates in which resistance was detected by gradient test and/or agar plate screening method; 1 *A.fumigatus* resistant to ITR, VOR, POS, 2 *A.fumigatus* resistant to ITR, 1 *A.terreus* isolate with ITR and VOR MICs of 1µg/ml and 0.5µg/ml, 1 *A.niger* ITR MIC of 4µg/ml, 2 *Aspergillus spp.* ITR, VOR, POS MICs were determined as 2µg/ml and 8µg/ml, 8µg/ml and >32µg/ml, 0.5µg/ml and 4µg/ml, respectively. CypA-L98H mutations were detected in 5 of these isolates, CypA-M220 mutations were detected in 6, and no mutation was detected in 1. CypA-L98H and CypA-M220 mutations were detected in 1 isolate for which resistance was not detected.

Conclusion: The need for rapid antifungal susceptibility screening tests is increasing in the treatment of aspergillosis. Although the sensitivity of the agar plate method was determined to be 33.3% for *A.fumigatus* ITR in our study, its sensitivity and specificity were determined to be 100% for ITR, VOR, and POS in other species. The low sensitivity value detected for *A.fumigatus* showed that agar plate drug concentrations should be updated in accordance with the latest regulations of EUCAST guidelines. The CypA-L98H and CypA-M220 mutations detected in our study suggested that the distribution of azole resistance-related mutations in different regions in our country should be investigated. In conclusion; It is thought that the agar plate method, which can be easily applied to detect azole resistance, is a fast and practical method in routine use and can contribute to both the determination of effective treatment strategies and the generation of epidemiological data.

Keywords: Aspergillus, agar plate, azole resistance, cyp51A, cypA-L98H, cypA-M220.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONUR SÖZÜ	i
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvii
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER.....	5
A. <i>Aspergillus</i> Cinsi	5
1. <i>Aspergillus</i> Türlerinde Tarihsel Süreç	5
2. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Genomu ve Taksonomisi	5
3. Klinik önemi olan <i>Aspergillus</i> Türlerinin Yapıları ve Üreme Özellikleri	7
a. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Genel Üreme Özellikleri	7
b. <i>Aspergillus</i> Türlerinde Mikroskopik Morfoloji.....	8
c. <i>Aspergillus</i> Türlerinde Koloni Morfolojisi.....	10
4. <i>Aspergillus</i> cinsi küflerin tanımlanması.....	13
a. <i>Aspergillus</i> türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler	13
b. <i>Aspergillus</i> türlerinin tanımlanmasında serolojik yöntemler.....	15
c. <i>Aspergillus</i> türlerinin tanımlanmasında moleküler yöntemler	16

5. <i>Aspergillus</i> cinsi küflerin virülans faktörleri ve patogenezi	18
a. Mantarla ilgili faktörler.....	18
b. Konakla ilgili faktörler	21
6. <i>Aspergillus</i> türlerinin oluşturduğu hastalıklar ve klinik önemi.....	23
7. İnvazif Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar.....	26
8. İnvaziv Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Azol Grubu Antifungal İlaçlara Direnç	28
9. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarında Azol Direnci ve Epidemiyolojik Veriler	34
10. İnvaziv Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Antifungal Duyarlılık Testleri.....	40
a. Antifungal Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Sıvı Bazlı Yöntemler.....	42
b. Antifungal Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Agar Bazlı Yöntemler	45
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
A. Çalışma Alanı	49
B. Çalışmanın Genel Planı	49
C. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarının Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	50
D. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarının Konvansiyonel Yöntemler İle Tanımlanması....	50
E. Azol Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Antifungal Duyarlılık Testleri ..	52
1. RPMI besiyerinin hazırlanması.....	53
2. Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması	54
3. Antifungal duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi	55
F. Azol Direnci Belirlenen <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarının DNA Dizi Analizi İle Tür Düzeyinde Tanımlanması	56
1. DNA İzolasyon Yöntemi	57
2. . PCR Protokolü	58
3. Jel Elektroforezi	59
4. Sanger Dizileme Protokolü	59

G. Cyp51A Genindeki Mutasyonların Belirlenmesi	61
1. PCR Protokolü	62
H. İstatistik Analiz.....	63
IV. BULGULAR.....	65
A. Çalışmaya Dahil Edilen <i>Aspergillus spp.</i> İzolatların Özellikleri.....	65
B. Konvansiyonel Yöntemler İle Tanımlanan <i>Aspergillus spp.</i> Türleri.....	66
C. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarında Antifungal Duyarlılık Testleri ile Saptanan Azol Duyarlılık Sonuçları	69
D. Azol Grubu Antifungallere Direnç Saptanan <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarının DNA Dizi Analizi İle Tür Düzeyinde Tanımlanması	87
E. Cyp51A Genindeki Mutasyonların Belirlenmesi	89
V. TARTIŞMA	99
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	121
VII.KAYNAKÇA	123
EKLER.....	149
ÖZGEÇMİŞ.....	155

KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	: ATP binding cassette
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABPA	: Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz
AIDS	: Erişkin İmmün Yetmezlik Sendromu
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
ARAF	: Azol Rezistan <i>Aspergillus fumigatus</i>
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
CNPA	: Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ECOFF	: Epidemiyolojik Cut-Off
ETA	: Endotrakeal Aspirasyon
EUCAST	: European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing
GVHD	: Graft Versus Host Hastalığı
HSCT	: Hematopoyetik Kök Hücre Transplantasyonu
İA	: İnvazif Aspergilloz
İFE	: İnvazif Fungal Enfeksiyon
İPA	: İnvazif Pulmoner Aspergilloz
ITR	: İtrakonazol
KF	: Kistik Fibrozis
KPA	: Kronik Pulmoner Aspergilloz
MAR	: Multi azol rezistan

MEA	: Malt extract agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
PAR	: Pan azol rezistan
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	: Patates Dekstroz Agar
POS	: Posakonazol
RAPD-PCR:	Random Amplification of Polymorphic DNA- PCR
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SDA	: Sabouraud's Dekstroz Agar
SOT	: Solid Organ Transplantasyonu
TBZ	: Tebukonazol
TR	: Tandem Repeat
TRANSNET	: Transplant Associated Infection Surveillance Network
VOR	: Vorikonazol
WT	: Wild-tip

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

- Çizelge 1. En sık görülen *Aspergillus* türlerinin ayırt edici karakteristik özellikleri (Larone, 2011). 12
- Çizelge 2. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar (mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr,Aspergilloz, 2018). 25
- Çizelge 3. *A.fumigatus*'un cyp51A genindeki nokta mutasyonlarda gelişen aminoasit değişiklikleri ve ilişkili azol MİK değerleri (Wei vd., 2015).33
- Çizelge 4. cyp51A genindeki nokta mutasyonlara bağlı gelişen azol dirençleri (*:Hot spot mutasyonları) 33
- Çizelge 5. Dünyanın farklı ülkelerinde klinik *A. fumigatus* izolatlarında bildirilen cyp51A mutasyonları ile ilişkili azol direnci oranları (^a: Dirençli izolatlar arasında direnç mekanizmalarının yüzdesi: TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A) 39
- Çizelge 6. *Aspergillus* cinsi için uygulanan antifungal duyarlılık testlerinde CLSI ve EUCAST'ın rehberlerdeki önerileri arasındaki farklılıklar (Dereli ve Koç; Lass-Flörl, 2010). 44
- Çizelge 7. EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 ve E.Def 11.0 prosedürlerini kullanan *Aspergillus spp.* için antifungal ECOFF'lar ve duyarlılıklar (Version 3.0, 2022-01-18) 46
- Çizelge 8. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR koşulları 59
- Çizelge 9. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR ile amplifikasyonu için kullanılan bileşen miktarları 60
- Çizelge 10. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR ile amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri..... 60

Çizelge 11. <i>Aspergillus spp.</i> için uygulanan Mic qPCR Cyclers cihazındaki PCR koşulları.....	63
Çizelge 12. <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarında azol direncinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	63
Çizelge 13. İstatiksel parametrelerin hesaplanma yöntemi.....	64
Çizelge 14. Gradient test yöntemi ile MİK değerleri dirençli/yüksek saptanan izolatlar.....	71
Çizelge 15. Çalışmada yer alan <i>Aspergillus spp.</i> izolatların antifungaller için in-vitro saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri.....	74
Çizelge 16. Agar plak tarama yöntemi ile direnç saptanan izolatlar.....	76
Çizelge 17. Gradient test ve Agar plak yöntemi ile direnç saptanan izolatlar	79
Çizelge 18. <i>Aspergillus spp.</i> izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları	81
Çizelge 19. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatların gradient test, agar plak ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenen antifungal duyarlılık sonuçları	85
Çizelge 20. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda konvensiyonel ve moleküler yöntemler ile belirlenen <i>Aspergillus</i> türleri	88
Çizelge 21. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda DNA dizi analizi ile belirlenen <i>Aspergillus</i> türleri.....	88
Çizelge 22. <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarında tespit edilen Cyp51A mutasyonları	94
Çizelge 23. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarının klinik tanı ve antifungal kullanımı	95

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1. *Aspergillus* türlerinin vezikül, fiyalid yapıları ve konidiyaların dizilişi..... 9
- Şekil 2. *Aspergillus* türlerinin makroskopik görünümü (A: *A. fumigatus* complex, B: *Aspergillus spp.*, C ve D: *A. niger*, E ve F: *A. flavus*, G ve H: *A. terreus*)11
- Şekil 3. *Aspergillus fumigatus*'un azol direnci kazanma yolları A: Hasta yolu ile: Azol duyarlı *A. fumigatus* ile infekte hasta ve azol tedavisinden sonra *A. fumigatus* suşlarının Cyp51A nokta mutasyonları seçimi ile. B: Çevresel yol: Daha önce tedaviyle azol dirençli *A. fumigatus* ile infekte hastalarda azol direnç mekanizmaları birleşti. DMI: Demetilasyon inhibitörleri. 30
- Şekil 4. Azollere Direnç Mekanizmaları (Cowen LE. Eukaryotic Cell 2008 7:747-764)..... 31
- Şekil 5. Çalışmaya dahil edilen *Aspergillus spp.* izolatlarının üretildiği klinik örneklerin dağılımı 65
- Şekil 6. SDA besiyerinde farklı tipte *Aspergillus spp.* türlerinin koloni görünümü (A: *A. flavus*, B: *A. fumigatus*, C: *A. terreus*, D: *A. niger*) 67
- Şekil 7. *Aspergillus spp.* türlerinin Laktofenol pamuk mavisini (Lactophenol Cotton Blue) ile mikroskopik görünümü (A: *Aspergillus spp.*, B: *A. niger*, C: *A. fumigatus*, D: *A. flavus*, Çalışmadan, 40x) 68
- Şekil 8. Çalışmada konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *Aspergillus spp.* türlerinin dağılımı 69
- Şekil 9. *Aspergillus spp.* izolatlarına uygulanan gradient test yöntemi plakları (A: *A. niger*'de duyarlı bulunan POS ve VOR, B: *A. fumigatus*'ta dirençli bulunan ITR ve VOR) 70
- Şekil 10. *Aspergillus spp.* İzolatlarına azol grubu antifungaller için Uygulanan Agar Plak Tarama Yöntemi 75

Şekil 11. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarında Agar Plak Tarama Yöntemi ile Direnç Belirlenen Pozitif İzolat (H3)	76
Şekil 12. <i>Aspergillus spp.</i> İzolatlarına Uygulanan Agar Plak Tarama Yönteminde Pozitif Kontrol Plakları (<i>A. fumigatus</i> : gri renkte, <i>A. flavus</i> : yeşil renkte ve <i>A. terreus</i> : tarçın renginde).....	76
Şekil 13. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda DNA dizi analizi ile belirlenen <i>Aspergillus</i> türleri	89
Şekil 14. <i>Aspergillus spp.</i> olarak tanımlanan izolatların PCR görüntüsü	89
Şekil 15. L98-H 24 nolu hasta-syber green görüntüsü (Cycling Analizi)	90
Şekil 16. L98-H 23 Nolu Hasta-Melt Analizi.....	90
Şekil 17. L98-Tüm Görüntü Demeti-Syber Green (Cycling Analizi)	91
Şekil 18. L98-Tüm Hasta Melt Analizi Görüntüsü.....	91
Şekil 19. M220-H 24 nolu hasta-syber green (Cycling Analizi)	92
Şekil 20. M220-H 24. Hasta Melt Analizi Görüntüsü	92
Şekil 21. M220-Tüm Hasta Görüntü Demeti-syber green (Cycling Analizi).....	93
Şekil 22. M220-Tüm Hasta Melt Analizi Görüntüleri.....	93

I. GİRİŞ

Mantarlar; organik materyalin bulunduğu yeryüzünün her alanında geniş yayılım gösteren ökaryotik organizmalardır. Mantar hücreleri kitin, glukan ve mannandan oluşan sert bir hücre duvarına sahip olmaları ve hücre zarında ergosterol olması sebebiyle diğer ökaryotik canlılardan ayrılırlar. Mantarlar aleminde yer alan önemli bir tür olarak tanımlanan *Aspergillus* türleri toprak, yeşil bitkiler, tahıllar, çevrede özellikle havada, hastane ortamındaki inşaat ve onarım faaliyetlerinde, ayrıca inşaat alanlarının kendisinde ortaya çıkan partikül maddelerde, döşemelerde, havalandırma sistemlerinde ve filtre edilmemiş havada bulunabilirler. *Aspergillus*'un bilinen 260'dan fazla türünün, yaklaşık 40'ının insanda fırsatçı infeksiyonların etkeni olarak bildirilmiştir (Pasqualotto, 2010).

Aspergillus cinsinin üyeleri, aspergilloz olarak bilinen bir grup hastalığa neden olur; hastalıklar invaziv infeksiyon, kolonizasyon, toksikoz veya alerji şeklinde karşımıza çıksa da genellikle fırsatçı infeksiyon etkeni olarak görülürler. Bir kısmı normal konakta hastalık yapabilmektedir. Deri ve deri-altı dokusu infeksiyonlarının sıklığı genellikle mantarın çevresel ortamda bulunması ile ilişkilirken, fırsatçı infeksiyonların sıklığı (özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar için), çevresel ortamda bulunmasının yanında konağın bağışıklık durumuyla da yakından ilgilidir. Hematoloji hastaları, kronik granülomatöz hastalığı olanlar, kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar, kistik fibröz, oto-immun ve kemik iliği ve organ nakli olan hastalar invazif aspergilloz açısından risk altında olan hastalardır. Havadaki konidyumların solunum yollarından alınması ile invazif aspergillozun en fazla oluşma sebebidir. Hastalık kontrol edilemediğinde, merkezi sinir sistemi tutulumu olmak üzere tüm vücuda yayılır. Aspergilloz; erken tanısı ve tedavisi zor, yüksek mortaliteye sahip tüm dünyada en yaygın olan invazif küf infeksiyonudur. Fungal etkenler arasında *Aspergillus* türlerine bağlı infeksiyonların insidansında zamanla artış gözlenmiştir ve önemi giderek artmaktadır. Erken ve etkin antifungal tedaviye başlanmasının

aspergillozun mortalite ve morbiditesi üzerinde olumlu yönde etkisi vardır (Patterson vd., 2010; Denning, 1998).

Son yıllarda antifungal tedavi büyük değişim göstermektedir. Bir zamanlar mantar hastalıklarının tedavisinde kullanımı zor ve toksik etkisi yüksek (Amfoterisin B ve 5-flusitozin gibi) ilaçlar kullanılırken, günümüzde ise daha az toksik etkinlik sergileyen sistemik etkili ilaçların kullanımı söz konusudur. *Aspergillus* infeksiyonlarının tedavisinde ilk akla gelen ve en sık kullanılan antifungal ilaç grubu ise azollerdir. Azoller, *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal aktivite gösterirler. *Aspergillus* türleri azol grubu antifungallerden flukonazole primer dirençli olup, diğerlerine karşı kazanılmış direnç geliştirebilir.

Aspergillus infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antifungal ilaçların seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerinin yararı bilinmektedir. Bu amaçla, standart referans yöntemler ile mikroorganizmanın üremesini gerekli düzeyde inhibe eden konsantrasyon belirlenmekte ve elde edilen MİK değeri türe özgü duyarlılık sınır değerleri ile karşılaştırılmaktadır (Perlin, 2015). *Aspergillus* türleri ile gelişen tüm invaziv infeksiyonlarda, etkene antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Bu infeksiyonlarda MİK değeri belirlemek için önerilen (EUCAST) altın standart referans yöntem; broth mikrodilüsyon testleridir (EUCAST, 2020; Espinel-Ingroff, 2003). Ayrıca *Aspergillus spp.* türlerinde antifungal duyarlılık testi olarak; Gradient test (E-test) de kullanılabilirken, yapılan çalışmalarda *A. fumigatus* izolatlarında azol grubu antifungallere direnci saptamak için agar plak yöntemi denenmiştir (Guinea vd., 2019). *Aspergillus spp.* türlerinde azol direncinin taranmasına yönelik agar dilüsyon tarama yöntemi de geliştirilmiş, bir referans EUCAST yöntemi olarak kullanıma girmiştir (EUCAST E.DEF 10.1).

Fırsatçı küf mikozların en sık etkeni olan *Aspergillus* türlerinde, antifungal ilaçlara direnç mekanizmalarının ve gelişim yollarının araştırılması klinik uygulamada büyük öneme sahiptir. *Aspergillus* türlerindeki azol direnci; yeterince aydınlatılamamışken, *Aspergillus fumigatus* kökenlerinde itrakonazol direnci bildirilmiştir. Bu konuya ilişkin, itrakonazole direnç mekanizmaları olarak; hem ilacın dışarı atılımının artması, hem de hedef enzim olan 14 α -demetilaz enzimidaki değişimler gösterilmiştir (Murray vd., 2010). Gen dizilimleri dikkate alındığında ise klinik izolatlarda Cyp51A bölgesinde çeşitli

nokta mutasyonların azol direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Diaz-Guerra vd., 2003; Mellado vd., 2004). Genler üzerinde meydana gelen mutasyonlar genel olarak ITR direncine yol açarken, VOR ve POS için MİK (mininal inhibitör konsantrasyon) değerlerinin yükselmesine neden olmuştur (Diaz-Guerra vd., 2003; Kuipers vd., 2011). Nokta mutasyonların daha önceden azol kullanmış olan kişilerden izole edilen suşlarda saptanmıştır ve bunun uzun süre antifungal kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Snelders, 2012; Bueid, 2012; Camps, 2013). *A.fumigatus*'ta azol direnci %0,6-28 oranları arasında bulunmuştur (Rivero-Menendez vd., 2016).

Aspergilloz infeksiyonlarının tedavisinde, azol grubu antifungallerin ilk olarak tercih edildiği *Aspergillus* türlerinin tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal direncin saptanması; riskli hastaların iyi değerlendirilmesinde, doğru ve etkin tedavide faydalı olacaktır. Günümüzde çeşitli türler tarafından oluşturulan ve giderek sayıca artan *Aspergillus* infeksiyonlarının tanımlanması ve antifungal direncin saptanması; Aspergilloz gelişme riski yüksek hastaların önceden belirlenerek profilaktik tedavi yaklaşımları uygulanması açısından önemlidir. Mevcut literatür verileri incelendiğinde, klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılığı ve direnci konusunda oldukça sınırlı sayıda araştırma olmakla birlikte, çoğunun *Aspergillus fumigatus*'un antifungal duyarlılığı ve direnci üzerine yoğunlaştığı görülmüştür. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, *Aspergillus fumigatus* izolatlarında azol grubu antifungallere direnci saptamak için agar plak yöntemi denenmesine rağmen, *Aspergillus* türlerindeki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda; çeşitli klinik örneklerden tanımlanan *Aspergillus* türlerinin, antifungal direnç profillerinin belirlenmesi ve azol grubu antifungallere direncin saptanmasında, agar plak yönteminin pratik, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak kullanılabilmesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

A. *Aspergillus* Cinsi

1. *Aspergillus* Türlerinde Tarihsel Süreç

Aspergillus türleri ilk defa 1729 yılında İtalyan botanikçi ve rahip olan Pier Antonio Micheli, mikroskopta konidiyoforlarını gördüğü küf mantarının görüntüsünü, kilisede kutsal suyu serpmek için kullanılan ucu topuzlu çubuk olan 'aspergillum'a benzettiği için *Aspergillus* olarak adlandırmıştır (Hedayati vd., 2007). 1768'de von Haller *Aspergillus* cinsini doğrulamış ve 1832'de *Aspergillus* adı onaylanmıştır. Tarihsel süreçlerde bakıldığında, 1842 yılında John Hughes Bennett, Edinburgh'da ilk defa bir insanda bu mantar türüne bağlı gelişen pulmoner aspergillozu tanımlamıştır (Denning, 1998). 1953 yılında aplastik anemisi olan bir hastada Rankin, sistemik hastalıkların etkeni olarak yaygın aspergillozu bildirmiştir. 1856 yılında Virchow, *Aspergillus* türlerinin pulmoner ve bronşiyal hastalıklarda etken olabileceğini belirtmiştir (Sugui, 2015). *Aspergillus* türlerinden invazif infeksiyonlarda en sık görülen etken olan *A. fumigatus* ise; ilk kez 1863 yılında Fresenius tarafından tanımlanmıştır. *Aspergillus*'u cins olarak 1926 yılında Thom ve Church tarafından sınıflandırılırken, 1965'te 150'den fazla türün taksonomide tanımlandığı bilinmektedir. 1990 yılında Samson ve Pitt DNA hibridizasyonu ile yaptığı çalışmalar ile; ince tabakalı kromatografi gibi yeni teknolojileri ile türlerin daha net ayrılmasını sağlamışlardır (Denning 1998; Bueid 2012). *Aspergillus* türlerinin genetik varyasyonlarının izolasyonu ve karakterizasyonu ile moleküler biyolojideki gelişmeler ile yeni türler tanımlandıkça taksonomiye yön verecektir.

2. *Aspergillus* Türlerinin Genomu ve Taksonomisi

Thom ve Church 1926 yılında, bir monografda *Aspergillus* türlerine ait tüm bilgileri toplamışlardır. 1985 yılında Gams ve arkadaşları, grupları düzenleyip resmi olarak 18 taksonomik bölüme ayırmışlardır (Sugui, 2015; Gams vd., 1985). Günümüzde, Aspergillaceae ailesinde 17 bölüme ayrılmış yaklaşık 260'dan fazla

Aspergillus türü bulunmaktadır. Ascomycota'nın *Trichocomaceae* ailesinde sınıflandırılan *Aspergillus* cinsi, dokuz farklı eşeyli üreyen şekli olarak adlandırılan teleomorf cins ile ilişkisi olduğu bilinen eşeysiz üreyen şekli olarak adlandırılan anamorfik türler bulunmaktadır. *Penicillium* ve *Paecilomyces* cinslerinin bazı teleomorf türleri de, *Trichocomaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır.

Aspergillus taksonomisi cins, alt-cins ve bölümlere ayrılmıştır. *Aspergillus* cinsi; *Aspergillus*, *Fumigati*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Candidi*, *Circumdati*, *Warcupi* ve *Ornati* olmak üzere sekiz alt-cinsten oluşmaktadır. Eucosmyetes sınıfının bir üyesi olan *Aspergillus*'lar ascomycetes'ler ile uzaktan ilişkilidirler. Tıbbi önemi olan ve insanda hastalıklara neden olduğu bilinen *Aspergillus* türleri başlıca beş bölümde (*Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* ve *Nidulante*) bulunmaktadır (Sugui vd., 2014). *Aspergillus* türlerinden bazıları hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. *Aspergillus* türleri arasında insanlarda en sık hastalık oluşturan, ısıya dayanıklılık özelliği ile *A.fumigatus*'tur, 2.sırada *A.flavus* ve onları *A.terreus* ve *A.niger* tür kompleksleri izler (Chen vd., 2015). Lösemi, hematopoietik kök hücre ve organ transplantasyonu uygulanan hastalarında invazif hastalığa neden olan en yaygın tür *A. fumigatus*'tur. *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* sekonder etyolojik ajanlardır (Sugui, 2015).

Son zamanlarda, *Aspergillus* cinsinin taksonomisi, genomik diziyeye dayalı yeni bilgiler birleştirilerek düzenlenmiştir. *Aspergillus* cinsi küflerde olağanüstü bir genom sekans çeşitliliği vardır. *Aspergillus* genomları sekanslandığında, boyutlarının 28-40 Mb arasında değiştiği ve benzer özelliklere ve sekiz kromozoma sahip oldukları görülmüştür (Gibbons ve Rokas, 2013). DNA sekansı ve Beta-tubulin ve kalmodulin dizileri, internal transcribed spacer (ITS) ve large subunit (LSU) gen bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik araştırmalar ile; *Aspergillus*'lar tür düzeyinde tanımlanmaktadır. Daha önce makroskopik veya mikroskopik morfoloji ile *Aspergillus* olarak tanımlanan türlerin filogenetik araştırmaların sonucunda daha ileri taksonomik revizyona ihtiyaç olduğunu kabul etmişlerdir. Taksonomistler, eşeyli ve eşeysiz şekillerin tek bir ad altında toplanması olan 'One Fungus – One Name' prensibini kabul etmişlerdir.

3. Klinik önemi olan *Aspergillus* Türlerinin Yapıları ve Üreme Özellikleri

a. *Aspergillus* Türlerinin Genel Üreme Özellikleri

Aspergillus cinsi içinde eşeyli ve eşeysiz üreyebilen türler olsa da, *Aspergillus* türlerinin % 64'ünde eşeyli üreme saptanmamıştır. *Aspergillus* türlerinin eşeyli üreme şekilleri 'teleomorf', eşeysiz üreme şekilleri 'anamorf' olarak adlandırılır. *Aspergillus* türlerinde n (haploid) sayıda kromozoma sahip eşeysiz çoğalan hücreler, uygun koşullarda bir başka haploid kromozomlu hücre ile karşılaşır ve birleşebilir. Eşeyli üremedeki ilk aşamada haploid kromozoma sahip iki hücrenin füzyonu olarak adlandırılan plazmogamidir. Daha sonra çekirdekler mitotik olarak bölünür ve 'askojenöz hifler' (iki çekirdekli hücreler) oluşur. Askojenöz hiflerde bulunan iki haploid çekirdeğin birleşmesiyle 'karyogami' meydana gelir, mayoz bölünme başlar. Mayoz sonrası gerçekleşen mitoz ile askus oluşur, her askusun içerisinde 8 adet askospor vardır. Askusların çevresinde, kompleks yapıda klaystotesyum olarak adlandırılan birçok farklı hücreden oluşmuştur. Klaystotesyumlardaki sporların yayılması, askokarp duvarının yıkımıyla askosporların etrafa dağılmasıyla gerçekleşmektedir. Askusların parçalanmasıyla askosporlar etrafa yayılarak eşeysiz döngüyü tekrar başlatır (Erturan, 2006; Özyaral, 2006).

Aspergillus cinsinde kısa sürede eşeysiz üreme meydana gelir, çok sayıda aseksüel spor oluşarak etrafa yayılır. Sporların canlı olarak kalma süreleri nem kaybı, yüksek metabolizma oranı ve UV ışığı ile azalmaktadır. Eşeyli üreme, kompleks bir süreçtir ve uzun sürede meydana gelir. Eşeyli üremede oluşan seksüel sporlar ise uzun yıllar boyunca uygunsuz şartlarda hayatta kalabilirler. *Aspergillus* cinsinde spor oluşumu ışık, sıcaklık, hava ile temas, besin durumu gibi koşullardan etkilenmektedir (Erturan, 2006).

Konidiyalar, vejetatif üreme ardından başlar. Aseksüel gelişim, kalın duvarlı bir ayak hücresinin gelişmesi ile başlar, daha sonra konidiyofor çıkar. *Aspergillus* türlerinde konidiyofor ayak hücrelerinden dik olarak çıkar ve yaklaşık 4-5 µm çapındadır. Konidiyoforun gelişimi tamamlandığında, ucu şişer ve vezikül oluşur. *Aspergillus* türlerinin bazılarında fiyalidler vezikül üzerindedir, bazılarında ise ikincil bir sıra oluşturan metulalar tomurcuklanır ve fiyalidler oluşur. Vezikülün yapısal gelişimi ve konidiyoforun yüksekliği türlere göre

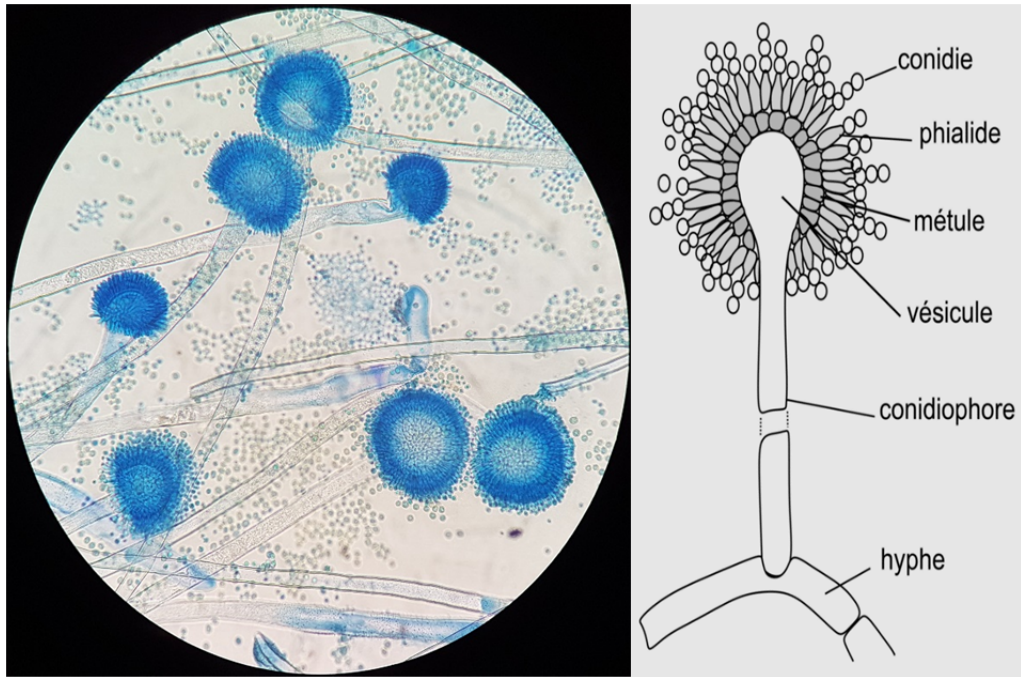
farklılık gösterir. Konidiyofor özellikleri, sterigmata düzeni, rengi, şekli, büyüklükleri, vezikül ve sporların mikroskopik görünümüleri *Aspergillus* türleri arasında farklılık gösterir ve tanımlamada çok önemlidir. Tanımlamada önemli olan askus ve askosporlar, dış şartlara daha dirençli yapılar olarak gelişmesine rağmen laboratuvar koşullarında oluşturulmaları zordur, sık görülmezler (Erturan, 2006).

b. *Aspergillus* Türlerinde Mikroskopik Morfoloji

Aspergillus türleri, pratikte daha çok anamorfün fenotipik özelliklerine göre tanımlanmaktadır. *Aspergillus* türlerini makroskopik görünüm tanımlamaya yardımcı olabilir fakat tür düzeyinde tanımlama yapılabilmesi için mikroskopik olarak konidya ve hif yapılarının hatta sporların da önemli yeri vardır. Tüm *Aspergillus* türlerinin ortak tanımlayıcı özelliği, sporları taşıyan yapıdır ve tanımlamada önemli özellikleri arasında; veziküllerin şekil ve boyutu ile fiyalit ve metulaların düzenindeki değişiklikler vardır. *Aspergillus* hifleri; düzgün, hyalen ve septalı yani bölmeli olup, 45°'lik açı ile dallanma öncesi ve sonrası hif çaplarının aynı olması (dikotom dallanma) gibi bir özellik gösterir. Hiflerin gelişimi sırasında hifin bir bölümü genişler, hücre duvarı kalınlaşır ve 'T' veya 'L' şeklinde 'foot cell' (taban hücreleri) oluşur. Taban hücresi ise genel olarak septa yoktur ve türler arasında farklı renk, uzunluk ve duvar dokusuna sahiptir. Taban hücre, *Aspergillus* türlerinin *Penicillium* türlerinden ayrılmasında en önemli özelliktir. Eşaysız üremede hiflerden bir tanesi konidya (eşaysız spor) oluşturmak üzere özelleşerek konidiyofor adını alır. Konidiyofor olarak tanımlanan sap kısmı, ya ayak hücresi denilen özelleşmiş hifal hücreden ya da doğrudan vejetatif hiften kaynaklanmaktadır. Ana hife dik açı oluşturacak şekilde uzayan ve konidiyofor olarak adlandırılan hiflerin ucu şişkinleşerek *Aspergillus* türleri için karakteristik olan vezikülü oluşturur (Chen vd., 2015). Konidiyofor, konidya veya sporları taşıyan vezikülün şekli farklı türlerde küreselden uzamış sopa şekline (*A.clavatus*'ta) kadar değişkenlik göstermektedir (Pasqualotto, 2010). Vezikül; yarı-küresel, küresel, konik, oval, çomak ve armut gibi şekillerde olabilmektedir (Chen vd., 2015). Konidiyoforlar ve veziküllerin yapısı; pigmentli veya hyalen, pürüzlü veya pürüzsüz olabilir ve bu özellikler tanımlamada yardımcı olmaktadır. Veziküllerden fiyalidler (konidya oluşturan hücreler) oluşur ve fiyalidlerden tomurcuklanma ile konidyalar çıkar. Vezikülün fiyalitlerin

üretimi için geniş bir yüzey alanına sahiptir (Pasqualotto, 2010). Fiyalitler, veziküllerden direkt, tek sıralı olarak 'uniseriat', metula denilen ara hücre tabakasından çift sıralı olarak 'biseriat' veya *A.flavus*'daki gibi her iki şekilde de ortaya çıkabilmektedir (Chen vd., 2015). *Aspergillus* türlerinde fiyalitler çift sıra şeklinde oluşmuş ise, iç sıradakilere metula denir ve metulanın varlığı veya yokluğu identifikasyon için önemli bir özelliktir (Pasqualotto, 2010). Türe göre değişmek üzere, vezikül ya tamamen (ışınsal, radyal) ya da kısmen (sütunumsu) konidyalar ile kaplanabilmektedir.

Vezikülün üzerinde direkt oluşan veya konidiyofordan metula olarak bilinen bir hücre tabakası ile ayrılan ve şişe şeklinde yapılar olan fiyalidler, birbirini takip eden en genç olanı tabanda olacak şekilde spor zincirleri üretirler. *Aspergillus* türlerinde konidiyalar (aseksüel sporlar) havada dağılmaya uygun, kuru ve uzun zincirler şeklinde bulunmaktadır. Elips şeklinde veya küresel olan konidiyaların, baş kısmının rengi değişik renklerde ve pürüzsüzden belirgin dikenliye kadar değişen yüzey yapılarında bulunmaktadır. *Aspergillus* türlerinde sporların rengi ve büyüklükleri farklı olabilmektedir. Sporların rengi, biçimi ile birlikte vezikül, fiyalitler ve spor zincirleriyle oluşan konidyal başların şekli gibi tüm bu özellikler fenotipik tanımlamada kullanılan önemli özelliklerdendir (Chen vd., 2015; Pasqualotto, 2010).



Şekil 1. *Aspergillus* türlerinin vezikül, fiyalid yapıları ve konidiyaların dizilişi

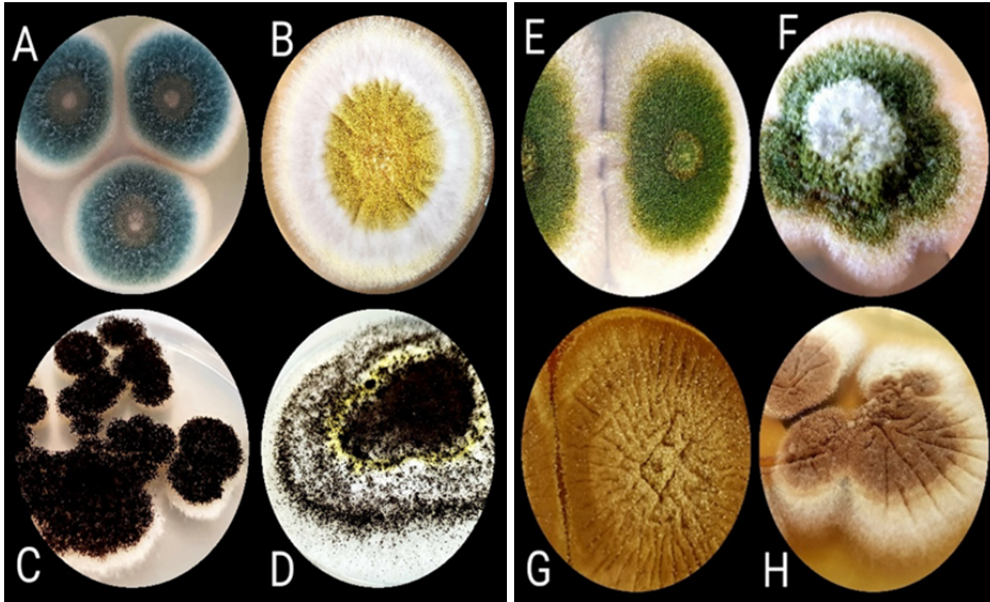
- **Telemorfik yapılar**

Sadece belirli *Aspergillus* türlerine özgü ve tanımlamada önemli olan diğer mikroskopik yapılar arasında; klaystotesyumlar, alörokonidyumlar, hülle hücreleri ve sklerotyumlar vardır. Klaystotesya veya askokarp; *Aspergillus* türlerinin teleomorflarının oluşturduğu eşeyli üreme evresinde oluşan yapılar, genellikle kapalıdır ve yuvarlak şekildedir. Mayoz ile eşeyli askosporları üreten askusları barındırır. Olgunluk döneminde askus ve askosporları serbest bırakmak için klaystotesyumların duvarları, ince yassı hücre tabakasından oluşmaktadır ve patladığında askuslar çevreye yayılır. *A.glaucus*'da klaystotesyumlar sarı renkte, küçük ve tek hif üzerinde sade bir şekilde bulunurken, *A.nidulans*'ın telemorfu olan *Emericella nidulans*'da koyu mor renkte, yaklaşık 150 µm çapında ve genellikle hülle hücreleri ile çevrilidir. Askosporlar, klaystotesyum içerisindeki askuslarda (askuslar genelde sekiz askospor içerir) mayoz ile meydana gelen eşeyli sporlardır. (Pasqualotto, 2010). Telemorf *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında, askomata ve askosporların duvar yapıları, şekli, rengi, boyutu önemlidir (Chen vd., 2015). Alörokonidyum; kendisini destekleyen hücrenin lizizi ile üretilen bir tür konidyumdur. Tabanı genellikle kesik gibi görülür ve lizize uğramış hücre desteğinin kalıntılarını taşır. Bu kalıntılar, tabanında halka şeklindeki firfırları oluşturur. Hülle hücrelerinin içerisinde küçük boşluk bulunan bir çeşit klamidiospordur ve askosporu olan *Aspergillus* türleri tarafından klaystotesyumlar etrafında çok sayıda bulunur. Bu hücrelerin kurumaya karşı koruyucu bir tabaka olduğu bilinmesine rağmen, gerçek işlevleri belirsizdir. Bazı *Aspergillus* türlerinde klaystotesyumdan oluşan sklerotia diye adlandırılan yapılar vardır. Sklerotia; çevresinde esmer renkli kabuğu olan yuvarlak, sert, şişmiş hifal hücrelerden oluşan miçel kümeleridir. Makroskopik olarak klaystotesyuma benzer, fakat içi sporsuz yapılardır. Olumsuz üreme koşullarında türlerin canlı kalabilmelerini sağlayan dayanıklı yapılardır (Chen vd., 2015; Pasqualotto, 2010).

c. *Aspergillus* Türlerinde Koloni Morfolojisi

Kültürlerde 48-72 saat gibi kısa sürede üreyen ve besiyerlerinde, türlere göre değişen renklerde ve değişik yüzey örgüsünde (pamuğumsu, yünüksü, kadifemsi, tozlu, granüler) koloniler oluşturan *Aspergillus* türleri arasında morfolojik farklılıklar vardır. Kültür için kullanılan çok çeşitli plaklarında üreme

başladığında makroskopik olarak koloninin rengi beyazdır ve konidyumlar geliştikçe pudramsı granüler hale dönüşür ve bölgenmeler görülebilir. Koloni olgunlaştığında yani konidyumlar oluştuğunda, kullanılan besiyerinin türüne ve üreme şartlarına bağlı olarak küfler oluşturduğu pigmente göre farklı tonlarda gri, turuncu, sarı, yeşil, kahverengi ile siyah gibi çeşitli renklerde koloniler oluştururlar. Koloninin yüzey rengi ile koloni tabanının rengi birbirinden farklı olabilir ve koloninin tersi kökenlerin çoğunda renksiz veya soluk sarı renktedir. Kolonilerin dış kenarları genellikle keskin sınırlı olmakla birlikte ince ve dağınık, tüm yüzeyi düzgün veya düzensiz, kabarık ve besiyerine batmış şekilde olabilir. Bu görünüm türün adlandırılmasına yardımcı olur (Murray vd., 2016; Sugui vd.; 2015; Snelders, 2012).



Şekil 2. *Aspergillus* türlerinin makroskopik görünümü (A: *A. fumigatus* complex, B: *Aspergillus spp.*, C ve D: *A. niger*, E ve F: *A. flavus*, G ve H: *A. terreus*)

Çizelge 1. En sık görülen *Aspergillus* türlerinin ayırt edici karakteristik özellikleri (Larone, 2011).

Türler	Patojenite	Makroskopik morfoloji	Konidyoforların mikroskopik morfolojisi	Fiyalidlerin mikroskopik morfolojisi	Konidyumların mikroskopik morfolojisi	Vezikülün mikroskopik morfolojisi	<i>Aspergillus</i> türlerinin karakteristik özellikleri
<i>A. fumigatus</i> complex	İnvazif pulmoner aspergilloz, dissemine aspergilloz, alerjik bronkopulmoner aspergilloz, fungal sinüzit ve mikotik keratite neden olan aspergillozisin en yaygın türüdür.	Kadifemsi, pudramsı veya toz şeklinde, önce beyaz renkli, sonrasında koyu yeşil, gri renge dönebilir ve taban rengi beyazdan bronza değişkenlik göstermektedir. Koloni zaman geçtikçe koyu griye döner. 50 °C ürerse koloniler soluk sarı-lavanta renkte olur.	Konidyoforları nispeten kısadır. 300 µm'ye varan uzunlukta ve 5-8 µm çapındadır. Düzgün, pürüzsüz, renksiz veya yeşilimsidir.	Fiyalidler uniseriat ve birbirine yakındır. Sadece vezikülün üst üçte ikisini kaplamaktadır ve konidyofor ekسنine paraleldir.	Konidyumların dizilimi tek sıralı sütun şeklindedir. Konidyumlar yuvarlağımsı bazen elipsoidaldir. Pürüzsüz veya hafif pürüzlü (dikensi çıkıntılı) olarak değişiken olan konidyumlar, 2-3,5 µm çapında sıkı ayrılmayan zincirler şeklindedir.	Vezikülü 20-30 µm çapında, kubbe şeklindedir.	Termotoleran olması 15-45°C ve üzerinde üreyebilme özelliğı ile diğer yaygın <i>Aspergillus</i> türlerinden farklıdır.
<i>A. flavus</i> complex	Genellikle kontaminant, fakat hastalıkların nedeni de olabilir. İnvazif aspergilloza neden olan en yaygın ikinci <i>Aspergillus</i> türüdür. (pulmoner, sistemik, sinüs, kulak infeksiyonları vb.)	Kadifemsi, pamuksu, rengi sarıdan yeşile veya kahverengiyeye dönebilir. Koloninin kenarları beyaz olabilir. Koloni arka yüzeyi sarı ile koyu sarı renk arasında değişmektedir. Koloni zaman geçtikçe zeytin-küf yeşili renkte olur.	Konidyoforlar uzundur. 400-800 µm uzunlukta ve 20 µm genişliktedir. Düzensiz, çukurlu dikenli, pürütlü, renksizdir.	Uniseriat ve biseriat, vezikülün tümünü kaplar, her yöne yönelebilir. Mikroskopik incelemede yarım daire görüntüslü tüm yüzey, gevşek bir şekilde yayılırlar. Konidyoforlar olgunlaştığında, özellikle apekte yani vezikülün hemen altındaki alan boyunca karakteristik olarak pürüzlü veya dikenlidir.	Konidyumlar yuvarlak veya elipsoidal, 3-6 µm çapında, pürütlüdür. Konidyumların dizilimi; gevşek şekilde ışınsal tarzda olup zamanla sütun şekline (konidyofora paralel) çift ya da tek sıra dizimli olabilmektedir.	Vezikülü 25-45 µm çapında, yuvarlak veya yuvarlağımsıdır.	Üreme genellikle 37°C'de artmaktadır. Kahverengi-siyah sklerotya gelişebilir. Yaygın olarak güçlü kanserojenler ve hepatotoksinler grubundan olan aflatoksinleri üretebilir. Aflatoksinler, aflotoksikoz tablosu oluşturur. Aflatoksin B ile karaciğerde adenoma ve kansere sebep olabilir.
<i>A. niger</i>	Doğada her yerde bulunur. Genellikle kontaminant olarak bilinmesine rağmen, ciddi hastalıklarda etken olabilir. Ayrıca önceden var olan akciğer boşluklarında sık görülen aspergilloma (mantar topu) etkeni olabilir. Bazen akut ve kronik invazif pulmoner ve dissemine hastalığa neden olur.	Yünlü, başlangıçta beyaz olan kolonilerin yüzeyi hızla siyaha döner. Kolonilerin kenarları beyaz veya sarı olabilir. Koloninin arka yüzeyi renksiz veya soluk sarı renktedir.	Konidyoforlar uzundur. 400-3000 µm uzunlukta ve 15-20 µm genişliktedir. Düzgün yüzeylidir ve tepeye yakın kahverengi koyu renkli konidyalar olabilir.	Biseriat, tüm vezikülün etrafını kaplar (radial baş) ve iki sıralıdır. Metulalar fiyalidlerin iki katı uzunluğundadır.	Konidyumlar 4-5 µm çapında yuvarlak ve kalın duvarlı, kahverengimsi siyah renktedir. Konidyumlar ışınsal dizimler göstermekte olup zamanla sütun şekline (konidyofora paralel) dönebilir.	Vezikülü 30-75 µm çapında, yuvarlaktr.	Dış kulak infeksiyonlarında diğer türlere göre daha sık izole edilmektedir. Otomikozun sık karşılaşılan nedenidir.
<i>A. terreus</i> complex	Genellikle kontaminant, fakat çok çeşitli vücut bölgelerinde infeksiyonlara da neden olduğu bilinmektedir. Alerjik bronkopulmoner aspergilloza sebep olmaktadır.	Genellikle kadifemsi veya pudramsı, tarçın rengine, kahverengimsi koloniler oluştururlar. Koloninin arka yüzeyi sarı veya kahverengidir.	Konidyoforlar, nispeten kısa 100-150 µm (<300 µm) uzunluğunda ve 4,5-6 µm çapındadır. Pürüzsüz, düzgün yüzeyli ve renksizdir.	Üst yarısı biseriat (kolumnar yapıda) fiyalidle kaplı vezikül bulunur. Hif boyunca küresel aksesuar konidyalar saptanır.	Konidyumlar 2-2,5 µm çapında yuvarlak ya da yuvarlağımsı, pürüzsüz, düzgün yüzeylidir. Konidyumlar konidyofora paralel dizilimde yoğun sütunumsu şekilde olup, çift sıra dizilim göstermektedir.	Vezikül 10-16 µm çapında, kubbe şeklinde olup fiyalidler ise üst yarım tarafta bulunur.	Doku örneklerinde, hifin yan duvarları boyunca tipik aleurioconidia görülebilir. Amphotericin B'ye doğal dirençli olabilirler.

4. *Aspergillus* cinsi küflerin tanımlanması

a. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler

*Aspergilloz*un laboratuvar tanısında, uygun klinik örnekler alınmasından sonra direkt mikroskopik inceleme ile birlikte kültürü yapılır. Örnekler % 10-20'lik KOH (potasyum hidroksit) ile işlem gördükten sonra direkt olarak ortalama yarım saat bekletildikten sonra incelenebilir. Direkt mikroskopi ile kültür sonucunun uyumu kaydedilir ve mikroskopik (40X) incelemede hif elemanlarının görülmesi önemlidir. Kalkoflor beyazı gibi mantar hücre duvarına tutuban floresan boyalar ile de mikroskopik inceleme yapılabilir. Mikroskopide *Aspergillus* hifleri; hiyalen, bölmeli 45°'lik dar açı ile dallanan ve 3-6 µm eninde görülürler. Bu mikroskopik görünüm genel olarak tüm hiyalen küfler için ortakdır, sadece *Aspergillus* türlerine özgü değildir. Standart mikoloji besiyerinde yapılan kültür ile, organizma izole edilir ve tür düzeyinde tanımlama yapılır (Tümbay, 2021: 335-362).

İzolatlarda tanımlanmasında, makroskopik (petrideki koloninin yüzeyinin ve tersinin pigmentlerin varlığı, rengi, çapı, dokusu) ve mikroskopik morfolojik özellikleri ve farklı sıcaklıklarda (termotolerans testi, 45°C'de) üremesi gibi özellikler önemlidir. Kültür örnekleri kuru sporların çevreye dağılımını önlemek için biyogüvenlik kabinlerinde çalışılmalıdır. *Aspergillus* türleri mikolojik besiyerlerinden olan Sabouraud dekstroz agara (SDA) ve potato dekstroz agara (PDA)'da üreyebilirler. Czapek-Dox agar ve glukozlu (%20-30) ya da glukozsuz malt ekstrakt agar (%2) gibi besiyerleride koloni yapısı ve mikroskopik özellikleri karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Pigment ve üreme oranı gibi bazı koloni özellikleri besiyerinin içeriğinden etkilenmektedir (Larone, 2011; Chen vd., 2015).

Değerlenme için mikolojik besiyerinde 25 ve 37°C'de yedi günlük üreme yeterli olsa da; teleomorfların gelişmesi için inkübasyon süresini uzatmak gerekmektedir. Örneğin askomata, hüll cell gibi yapıların gelişmesi tanımlamaya yardımcı olmaktadır (Larone, 2011; Chen vd., 2015). Üreme hızındaki farklılıklar, tanımlanacak *Aspergillus* suşu hakkında bilgi vermektedir.

Üreyen koloniler ilk olarak makroskopik özelliklerine göre değerlendirilir. Makroskopik olarak mavi-yeşil renkte süet benzeri yüzeye sahip koloniler *A.*

fumigatus, perifer beyaz siyah renkte koloniler *A. niger*, önce beyaz–sarı sonrasında yeşile dönen koloniler *A. flavus*, kum–kahverengi, tarçın renginde süet benzeri yüzeye sahip koloniler *A. terreus* gibi değerlendirilebilir ve mikroskopik olarak inceleme aşamasına geçilebilir (Larone, 2011). **(Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.)**

Aspergillus spp. kolonilerinden preparat hazırlanırken selofan bant, lam kültürü ve koparma gibi yöntemler kullanılabilir. *Aspergillus spp.*'nin mikroskopik olarak incelenmesi için genelde selofan bant yöntemi kullanılır. Bu yöntemde; selofan bant koloninin yüzeyine nazikçe bastırılır, temiz bir lam üzerindeki bir damla laktofenol pamuk mavisinin üzerine kapatılır. Lam kültürü yönteminde; SDA'dan kare şeklinde bir parça kesilerek lam üzerine konur. İğne ile saf kültürden alınarak besiyeri parçasının köşelerine batırma yöntemiyle ekim yapılır, üzerine lamel kapatılır ve petri kutusunun içerisine ıslak bir pamuk bırakılır. Lam kültürü 2-3 hafta boyunca 25°C'de inkübe edilir. Küf üremesi olduğunda, hif ve sporlar lamele yapışır, lamel alınır, üzerine laktofenol pamuk mavisi damlatılmış lamın üzerine kapatılır ve mantar hif ve spor yapıları bozulmadan incelenir. Koparma yönteminde ise; spatül veya bistüri yardımıyla küf kolonisinden dikkatlice alınır, üzerinde laktofenol pamuk mavisi olan lam üzerine konur ve lamel kapatılır. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında 10X'lik objektif ile incelenir ve küfün genel yapısı değerlendirilir. Sonra immersiyon ile 100X'lik objektif altında konidiyofor yüzeyinin pürüzlü veya pürüzsüz oluşu, sporların yüzeyindeki farklılıklar incelenir (Larone, 2011; Pasqualotto, 2010). Laktofenol pamuk mavisi ile küf kolonisi mikroskopik olarak incelenmesinde sporlanmanın daha fazla olduğu zengin PDA besiyeri tercih edilir.

Üreyen koloniler ilk olarak mikroskopik özelliklerine göre değerlendirilirken; vezikülün şekli ve büyüklüğü, konidyal yapıların ışımsal veya sütunumsu oluşu, konidiyoforun uzunluğu ve yüzeyi, fiyalidlerin tek veya çift sıralı oluşu, konidyal yüzey, şekil ve büyüklük, klaystotesyum, hücre hücreleri, askospor gibi yapılara sahip olması veya olmaması gibi kriterlere dikkat edilmelidir (Tümbay, 2021: 335-362; Larone, 2011).

Mikroskopik olarak bölmeli hiflere sahip olan, dallanmayan konidiyofor yapıları bulunan, konidiyoforların ucunda vezikül adlı yapıyı bulunduran,

vezikülden fiyalid yapıları çıkan ve fiyalidlerin ucunda da yuvarlak yapılı konidya zincirlerine sahip koloniler *Aspergillus spp.* olarak değerlendirilir. Konidyoforları kısa, düz olup konidyoforlardan çıkan fiyalidler tek sıralı ve vezikülün üst 2/3'ünü kaplıyorsa izolat *A. fumigatus* olarak değerlendirilir. Konidyoforları düzensiz, çukurlu veya dikenli yapıda olup konidyofordan çıkan fiyalidleri tek veya iki sıralı şekilde vezikülün tamamını kaplıyorsa izolat *A. flavus* olarak değerlendirilir. Konidyoforları kısa, düz olup fiyalidleri iki sıralı, vezikülü kolumnar şekilde kaplıyorsa izolat *A. terreus* olarak değerlendirilir (Larone, 2011).

Termotolerans testinde; *Aspergillus spp.* türlerinden özellikle *A. fumigatus* 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ürer. Farklı sıcaklık derecelerindeki üreme özelliği türlerin tanımlanmasına yardımcı olur. Örneğin; 45°C'de üreme gözlenen izolatlar *A. fumigatus* kompleksi olarak değerlendirilir (Murray, 2007).

Aspergillus türleri üreme ortamlarındaki değişikliklere; üreme hızlarını ve morfolojik özelliklerini değiştirerek tepki verirler. Ürettikleri besiyerinin içeriği ve miktarı, ortamdaki nem ve ışık değişimi morfolojilerini etkileyeceğinden üreme koşullarının standart, identifikasyonu yapılacak kökenin saf kültür halinde olması gerekir. Farklı inkübasyon ısıları ve farklı besiyerleri bu yüzden kullanılır.

b. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında serolojik yöntemler

Aspergillus türlerinin tanımlanmasında galaktomannan antijen testi; (BDG) 1,3-β-D-glukan testi, lateral flow, antikor aranması ve diğer biyolojik belirteçler gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan tanımlamada en yaygın olarak kullanılan test, galaktomannan antijen testidir. *Aspergillus* türlerinin hücre duvarının yapısında galaktomannan bulunmaktadır. Özellikle nötropenik hastalarda *Aspergillus* damar invazyonu yaptığı için galaktomannan kolayca kana salınır ve nütrofiller kan dolaşımına geçen galaktomannanı temizleyemez. Galaktomannan antijen testi; kan ve BAL gibi vücut sıvılarında çalışılır. Nötropenik olmayan hastalarda, damar invazyonu olmadığından galaktomannan kandolaşımına geçemediği ya da nütrofiller tarafından temizlendiği için kan örneklerinde saptanma olasılığı düşüktür. BAL örneklerinde ise galaktomannan antijen testinin duyarlılığı kültürden daha yüksektir (Tümbay, 2021: 335-362).

Ayrıca 1,3-β-D-glukan, mantar hücre duvarı için özel bir polisakkarit bileşenidir ve invazif fungal infeksiyon tanısı alan hastaların kan serumunda tespit edilir. *Aspergillus* fungemilerinde, serumda 1,3-β-D-glukan yükselir. İnvazif fungal infeksiyon erken tanısı ve antifungal kemoterapi takibinde 1,3-β-D-glukan kullanılabilir. Lateral flow ise, *Aspergillus* glikoproteinini saptamak üzere geliştirilmiş basit bir testtir. Antikor testleri ile, akciğer aspergillozunun kronik ve alerjik şekillerinin tanısında önemlidir. IgG antikorlarının düzeyi kronik akciğer aspergillozunda, IgE antikorlarının düzeyi ise alerjik aspergillozda yükselir. Antikor yanıtı zayıf olan immün sistemi baskılanmış hastalarda antikor testlerinin tanıda ve tedavide etkisi sınırlıdır (Tümbay, 2021: 335-362).

c. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında moleküler yöntemler

Aspergillus cinsi küflerin identifikasyonu için konvansiyonel yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. İnvaziv mantar hastalıklarının teşhisinde kültür ve mikroskopi altın standart olmaya devam ederken, bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlıdır. Konvansiyonel yöntemler yoğun emek ve deneyim/uzmanlık gerektirmektedir. Kültürlerde yavaş üreme gözlenebilmektedir veya sporlanmasında sorunlar olabilmektedir. Ayrıca benzer morfolojilere sahip *Aspergillus* türlerinin, genetik olarak farklı identifikasyonu da mümkündür. *Aspergillus* türlerinin tür düzeyinde tam ve doğru identifikasyonu, antifungal direncin doğru tespiti ve tanımlanması ile erken teşhis ile hasta sonuçları için kritik öneme sahiptir. Hedefe yönelik antifungal tedavinin başlanması ile mortalite oranı azalmaktadır. İlaç direncinin daha hızlı tespiti için daha hassas sistemlere ihtiyaç vardır. Moleküler yöntemler tanımlama süresini kısaltmaktadır ve ilaç direncine neden olan genomik değişiklikler belirlenebilmektedir.

Fenotipik yöntemlerin yetersiz olduğu durumlarda kullanılmak üzere, mantar DNA'sının izole edilmesi ve tanımlanmasını içeren PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) temelli yöntemler geliştirilmiştir. *Aspergillus* türlerinin moleküler yöntemler ile tanımlanmasında, gen bölgelerinin dizi analizleri (ribozomal RNA, ITS1 ve ITS2) yapılabilir. rRNA'nın D1-D2 (büyük alt birimleri) domainleri veya β-tub (β-tubulin), rodA (rodlet A), aktin ve kalmodulin gibi protein kodlayan gen bölgelerinin (iki protein 25 kodlama lokus) dizi analizleri yapılarak (multilokus sekans dizileme) *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında, çeşitli DNA hedefleri olarak önerilir. Gerekli olan tanımlamaya göre, lokus seçimi de farklı olabilir.

Aspergillus cinsi içindeki türlerin tanımlanması için, hedef genler rDNA üzerindeki 18S ve 26S/28S bölgeleri, 28S ribozomal subunitinin değişken D1/D2 gen parçaları ile birlikte IGS ve ITS1/ITS2 bölgeleri PCR (amplifikasyonu) ve sekanslama ile tercih edilmektedir. Mitokondriyal DNA, mitokondriyal sitokrom B, 5S rDNA ve RNA polimeraz B genleri de, tanımlamada hedef olarak seçilmektedir.

Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI), mantarların DNA hedef dizileme yöntemleri ile tanımlanması için değerlendirme rehberleri (MM18-A) vardır (www.CLSI.org). Rehberlerde *Aspergillus* türlerinin ayırımı için; karşılaştırmalı sekans analizi ile β -tub ve alt cins ya da bölüm seviyesinde tanımlamalar için ITS1 ve ITS2 bölgeleri hedef olarak tavsiye edilmektedir (Mikoloji Referans Laboratuvarı, 2014; Pasqualotto, 2010). Çok hedefli gerçek zamanlı bir PCR testi olan Asper-Genius (PathoNostics) sistemi, *Aspergillus* genomunda 28S rRNA'yı hedef alan moleküler testlerdendir.

Günümüzde *Aspergillus* türlerinin çoğu için tam genom veya belli bir bölge genom dizilerinin olması, tanımlamaya uygun DNA dizi tabanlı yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır (<http://www.broad.mit.edu>). *Aspergillus* türlerinin moleküler tanımlanmasında karşılaştırmalı DNA dizilemenin tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, duyarlılık ve özgüllüğü ile bu yöntemin altın standart olarak kabul edilmiştir.

Veritabanı içinde önceden identifiye edilmiş dizilerle, elde edilen diziler karşılaştırılır. *Aspergillus* tanımlanmasında en sık tercih edilen dizi veri tabanı, ABD Milli Tıp Kütüphanesi tarafından EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) ile birlikte muhafaza edilen GenBank'dır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). GenBank; bilinmeyen dizileri bulmak için Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) algoritmasına göre, iki dizi arasında homoloji gösteren bölgeleri araştırmaktadır. BLAST, veritabanındaki diziler ile elde ettiği dizilerin uyumlarına göre sıralanmış skorlar ve ikili gruplar halinde belirtmektedir. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında, veri bankasında bulunan bir veya daha fazla *Aspergillus* türüne %99-100 gibi oldukça fazla bir oranda gen benzerliği belirlenmesi ile sağlanmaktadır. Dizi benzerliği %99'un altında olduğu durumlarda dizileme sonuçlarının değerlendirilmesinde sorunlar olabilir. Daha fazla sayıda yakın ilişkili *Aspergillus* türlerinin dizilerinin ve

birden fazla bağımsız lokusun belirlenip daha kapsamlı filogenetik analizlerin yapılması ile genotipler daha iyi değerlendirilir ve tür düzeyinde tanımlama yapılabilir (Pasqualotto, 2010).

PCR, *Aspergillus spp.* türlerini tespit etme yeteneğine sahip olmasının yanında PCR ayrıca doğrudan klinik örneklerden triazol direnci ile ilişkili bazı mutasyonları tanımlayabilmektedir (Donnelly vd., 2020). Bir PCR ayrıca kültür negatif örneklerde azol direncinin saptanmasını sağlayabilir. Çalışmamızın yürütülmesi sırasında EORTC/MSGERC tanımları güncellendi ve 2020 versiyonu artık mikolojik kriter olarak pozitif bir *Aspergillus spp.* PCR içermektedir (Huygens, alber dunbar Jochem B Yapı vd. 2023). Yeni teşhis teknikleri ile tanımları güncellenmiştir.

5. *Aspergillus* cinsi küflerin virülans faktörleri ve patogenezi

Aspergillus cinsi patojen küf mantarlarının hastalık etkeni olabilmesi için, dokuya tutunmasını, dokuya girişini kolaylaştıran ve savunma elemanlarının (fagositik hücreler gibi) etkisiz hale getirebilmesi için çeşitli virülans faktörleri olması gerekir. Mikozun patogenezi belirleyen virülans faktörler infeksiyon sürecini uyarır. *Aspergillus spp.* türlerinde belirlenen virülans faktörleri pigment oluşturma özelliği, toksik moleküller, sıcaklık toleransı, kapsül, dimorfizm, hücre duvarı bileşikler ve enzim üretimidir. Virülans faktörler ile mantarlar, konakta canlılığını sürdürür ve adezyon, kolonizasyon ile konağın bağışıklık sistemini etkisizleştirmeye çalışır (Ghannoum vd., 1995).

a. Mantarla ilgili faktörler

Aspergillus türlerine ait konidyumlar solunum yolu ile vücudumuza girdiğinde; floraya yerleşen konidyumlara karşı ya alerjik yanıt oluşur, ya vücut içindeki hava boşluklarında kolonizasyon, ya da derin dokulara invazyon olabilir. Konidyumlar konak dokusuna girdiğinde, solunum yollarındaki epitellere yapışır ve hücreleri özellikle de bağışıklık sisteminde rol alan fagositoz yapan hücreleri öldürür. Dokudaki koşullara uyum sağlayarak gelişmektedir. Solunum yolu epiteline adezyon özelliği, fagositoz yapmayan hücrelere invazyon yapabilmesi, katalaz enzimi üretebilmesi ve damar endotel hücrelerine invazyon yeteneği en çok bilinen ve en çok incelenen virülans faktörleridir (Lalgé, 1999; Denning, 1998). *Aspergillus* türlerinin virülansının çok faktörlü olduğu bildirilmektedir.

Sıcaklık toleransı ve gelişme hızı; 37°C'de gelişim göstermeyen bazı *Aspergillus* türleri, patojen olan türleri olmayanlardan ayırt etmekte önemlidir. Uygun sıcaklık ve nemde bırakılan konidyumların hacmi ~4-8 katı şişer. Hücre duvarında bulunan hidrofobik protein örtü yerini başka bir tabakaya bırakır. Logaritmik gelişme fazı başladığında hif oluşmaya (~24 saat) başlar, daha sonra gelişme hızı aynı kalır. Gelişme hızının *A.fumigatus* ve *A.glaucus*'da %30-40 daha fazladır, bunun sebebi hidrokortizon yoğunluğu olarak gösterilmiştir (Denning, 1998). Hızlı üreme süresi ve oksidatif strese dayanıklılık *Aspergillus* türleri için virülans faktörlerindedir.

Konidyum boyutu: Solunum yolu ile alındığında *Aspergillus* konidyumları (2-5 µm) akciğerdeki alveollere ulaşabilecek kadar küçüktür. Konidyumlar, kolay bir şekilde dokuya geçer. Hidrofobik protein tabakası hem konağın savunma mekanizmalarına karşı koymada hem de olağandışı atmosfer şartlarına dayanabilmesinde etkilidir. *Aspergillus* türleri fibrinojeni ve laminini bağlaması ile invazyon öncesinde mantar elemanlarının, konağın hava yollarına daha fazla adezyonuna katkı sağlar (Latgé, 1999; Denning, 1998). Örneğin; *A.fumigatus*'un diğer türlere göre nispeten daha küçük olan konidiya boyutu (2-3,5 µm çapında) alveollerin derinlerine erişimini sağlamaktadır. Bunun aksine, *A.niger*'in konidyumunun çapı 4-5 µm olduğu ve bunun sonucu olarak daha düşük virulansa sahip olduğu düşünülmektedir. İnsanda fırsatçı infeksiyon etkeni olarak en fazla izole edilen tür *A.fumigatus* ise konidyum çapının küçük olup alveollerin derinlerine kolay ulaşabilmesinin yanında daha iyi bir termotolerans (37°C ve 50°C arasında üreyebilme) özelliği vardır ve diğer *Aspergillus* türlerinden daha dirençlidir.

Aspergillus türlerinin konidyumlarının yüzeyindeki karbonhidrat ve protein moleküllerinden olan fibrinojen, temel membran glikoproteinlerinden laminin ve ekstrasellüler matriks bileşeninden fibronektin ve komplement bağları konidyumun dış ve iç duvar tabakalarıyla ilişkilidir ve konak proteinlerine spesifik olarak bağlanırlar ve bağlanmada etkili olan **adhezinler**; kollagen, albümin ve surfaktan gibi yüzey proteinleri vardır. *Aspergillus* konidyumlarının yüzeyinde glukanlar, galaktomannanlar, kitinler ve diğer polisakkaritler bulunur. Glukan ve galaktomannanlar yüksek derecede immünojenik olan moleküllerdir. *Aspergillus* türlerinin hifleri ve konidyumları; immunoglobulinlere, akciğer

surfaktan A ve D, mannoz-bağlayan lektine bağlanır ve bu bağlanmada fizikokimyasal etkileşimleri ya da reseptör ligand tanıma olur. *Aspergillus* türlerindeki konidyumların dış tabakasında hidrofobik Rod A proteini ve dihidroksinaftalin (DHN) melaninden oluşan rodlet tabakası bulunur. Bu tabakanın varlığı ile, konidyumlar yüksek sıcaklığa direnebilmekte ve konağın bağışıklık sistemi tarafından fark edilmesini önlemektedir. Konidyumlar, invazyondan önce solunum veya akciğer epitelinin laminine ve fibrinojene bağlanırlar ve şişerler. Alveoler makrofajlar içinde hifler oluşur ve metabolik olarak aktifleşirler. Konidyumların şişmesi, koruyucu hidrofobik tabakanın ve melaninin kaybına yol açarak immünolojik yanıtı ve fagositoza neden olur. Konidial hücre duvar molekülleri fagositoza direnç gösterir. Bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda, makrofajların yanıtı zayıf veya geç olduğu için sporların çimlenmesi engellenemez. Hifler, makrofajların hücre zarını tahrip eder ve akciğer parenkimine geçerler. Konidiaları içerisine alan epitel ve endotel hücrelerin, infeksiyon odağı olarak görev yaptıkları düşünülmektedir (Reiss vd., 2012; Tümbay, 2021: 335-362).

Enzimler: Konağın dokusunda ilerleyebilmesi için küfün bazı enzimlerinin olması gerekir. *Aspergillus* türlerinde, mannitol, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimler üretir ve bu enzimler mantarı oksijen molekülünün, hidrojenperoksit, hidroksil radikallerlerinin ve fagositler tarafından üretilen serbest radikallerinin tahribinden koruyabilirler. *Aspergillus* türlerinde bulunan katalaz genleri organizmanın oksidatif strese duyarlılığını modifiye eder. *Aspergillus* türlerinde bulunan akciğer epitel hücrelerine yapışmayı artıran çeşitli proteazlar, ribotoksin, fosfolipazlar, bir hemolizin ve diğer toksinler de çeşitli virülans faktörlerinden sayılmaktadır. Kronik granülomatöz gibi hastalıklarda nötrofiller *Aspergillus* hiflerini yok edemezler. Akciğerin matriksinde kollajen ve elastin olduğundan kollagenolitik ve elastogenolitik enzimler başlıca rolü oynarlar (Reiss vd., 2012).

Pigmentler: *Aspergillus* türlerinin konidiasının hidrofobik proteinlerden oluşan dış tabakasında yeşil bir pigment tabakası vardır. *Aspergillus* türlerinin konidiası içerisinde bulunan genlerde (melanin üretimi için kodlanan) görülen mutasyonlarda, konidyada azalmış kompleman aktivasyonu görülür ve fagositler beyaz konidyalara zarar verirler. Yeşil konidyalardan daha çok zarar verir.

Pigmenti olmayan *Aspergillus* türleri, yeşil konidyumlu olan kökenlerden daha az patojen olduğu bildirilmiştir (Reiss vd., 2012).

Toksik moleküller: Aflatoksin, okratoksin A, fumagilin ve gliotoksin gibi toksik ikincil metabolitler *Aspergillus* türleri tarafından üretilir ve bunlardan biri immün sistem hücreleri üzerinde immünsüpresif aktivite sağlayan gliotoksindir (Reiss vd., 2012). Gliotoksin molekülü; akut olarak toksiktir, nötrofil ve makrofaj fagositozunu önler, B ile T lenfositlerinin hücre aktivasyonunu engeller ve geniş ölçüde bağışıklığı baskılama özelliği gösterilmiş olsa da patogeneizde rolü belirlenememiştir (Latgé, 1999; Sutton, 1994). Ayrıca melanin ve gliotoksin, proteazlar gibi virulans ve toksin özellikleri olan serbest kalması ile, epiteliyal hücrelerin sillerinin hareketi bozulur ve epitel yapı zarar görür, ve bunun bir sonucu olarak bunların biyofilm oluşumuna yardımcı olduğu görülür (Reiss vd., 2012; Felton and Simmonds, 2014). Kemik iliği transplantasyonu yapılmış hastaların tedavisinde, bu özelliklerinden dolayısıyla gliotoksinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Fumagillin de, bağışık yanıtı, nötrofil fonksiyonunu ve anjiogenezi baskılar. Helvolik asit ise antifungal etkili olan elektrolittir. İnsan solunum epiteline ve makrofaj metabolizmasına etki ettiği bildirilmiştir. Bir başka önemli toksik metabolit ise *A. flavus*, *A. nomius* ve *A. parasiticus* gibi türler tarafından üretilen gıda kaynaklı infeksiyonlara sebep olan ve en önemli mikotoksinlerden olan aflatoksindir. Aflatoksin B1, bilinen en güçlü kanserojendir ve hedef organ genellikle karaciğerdir. Fungal toksik moleküller akut ölümlerden kronik hastalıklara kadar geniş hastalık yelpazesine sebep olabilirler (Yentür ve Er, 2012; Móricz vd., 2007).

b. Konakla ilgili faktörler

Mantarların virülans sıklık oranı, daha sık infeksiyon etkeni olan bakteri ve virüslere göre genel olarak daha düşüktür. Mantar infeksiyonlarının mortalitesinin yüksek olması virülanstan ziyade, konağın bağışık durumu ile açıklanabilir. Mantarların çoğu fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda aspergilloza yatkınlığı arttıran genetik değişiklikler tanımlanmıştır.

Konak savunması: *Aspergillus*'lara karşı ilk immunolojik savunmada konidyumları içeri alıp yok eden alveoler makrofajlardır. Nötrofiller, monositler

ve makrofajlar tarafından hifler yok edilir. Hifler ve sporlar komplemanı bağlar, hifler büyük olduklarında öldürme işlemi hücre dışında gerçekleşebilir. Bağışık sistemi baskılanmış kişilerde bazı konidyumlar makrofaj ve nötrofillerden kaçıp, sistemik enfeksiyona neden olabilir. Makrofaj membranının konidyumları adezyon ve fagositoz ile yakalayabilmesi için mantar hücre duvarında bulunan beta 1,3 glukan gereklidir. Fagositoz öncesinde veya sonrasında çimlenme ve hife dönüşüm gerçekleşir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda, sporların çimlenmesini engelleyemeyen makrofajların yanıtı zayıf veya geçtir. Hifler, makrofajların hücre zarını tahrip ederler ve kolaylıkla akciğer parenkimine geçerler (Tümbay, 2021: 335-362). Doğal bağışıklık mekanizmasının görevi olarak nötrofiller, *Aspergillus* hücrelerini öldürmeye çalışır. Bundan sonra kazanılmış bağışıklık mekanizmalarından T hücre yanıtı özellikle invazif aspergilloz kronik olduğunda önemlidir. Aspergillozda, nötropeni ve T hücreleri arasında etkileşim bulunmuştur. Aspergilloz enfeksiyonlarında, direncin IL-2, IL12 ve gamma interferon düzeyinin artmasıyla ilgili olduğu ortaya konmuştur. İnvazif aspergillozda mortalitenin düşük olması ile yüksek IFN- γ /IL-10 oranı arasında ilişki bulunmuştur. Dendritik hücreler konidyumları fagosite eder ve T hücrelere sunar. Antikorlar, mantar enfeksiyonlarından korunmada ve dirençte etkili değildir, sadece mantar için oluşan antikorlar serumda saptanabilir. Aspergillozda oluşabilecek histolojik olarak, granümatöz yanıtta, hiflerle karmaşık halde olan ciddi nekroza kadar farklı olabilmektedir. Kronik granümatöz ve AIDS hastalarında nötrofil fonksiyon bozuklukları veya nötropeni, invazif aspergilloz oluşması için önemli risk faktörleri arasındadır (Tümbay, 2021: 87-98).

Kortikosteroidler veya sitokinler gibi bağışıklık baskılayıcı ilaçların varlığında; makrofajların *Aspergillus* türlerinin konidyumlarını, nötrofillerin ve mononükleer hücrelerin de hifleri öldürme etkinliğini azalttığını ve aspergilloza yakalanma riskini arttırdığı bildirilmektedir (Göttingen, 2000). Bu olumsuz etki ya granülosit koloni stimüle edici faktörle tedavi edilebilir, ya da makrofaj ile (in vitro) azaltılabilir.

Etkene göre farklı patolojik hasar oluştuğu kesindir. Tutulan organ da patolojik yanıt çeşitlendirebilir. *Aspergillus* türlerinin gastro-intestinal sistem tutulumunda iskemik nekroz, akut inflamasyon ve nadiren granülom oluştururken, çoğunlukla anjiyo-invazyon da yaparlar. *Aspergillus* türlerinin

oluşturduğu pulmoner invazif infeksiyonlarda yaygın damar invazyonu, trombotik vasküler oklüzyon, hemorajik ve koagülatif nekroz tipiktir. Nötrofiller sıklıkla infeksiyon bölgesinde görülür. İnvazif aspergilloz infeksiyonu dokuda yayılır ve infarkt ve doku nekrozu gelişen damar invazyonunun gelişmesi en önemli belirticidir. Mantarın hücre yüzeyi komponentlerinin; damar duvarındaki bazal membrana, hücre dışı ve hücreli yapılara bağlandığı ve invazyon gerçekleşen arterin distalinde iskemi ve infarkta neden olduğu kabul edilmektedir (Tümbay, 2021: 87-98). Fırsatçı patojen uygun konak koşullarında mantara ait virülans faktörlerin eşliğinde bağışık yanıt oluşturacak ve patogenezi değiştirerek şekillenecektir.

- **İnokulum, inkübasyon süresi:** İnvazif aspergilloz; bir konağın yeterli sayıda mantar elemanı alındığında sağlam konaklarda hastalığa sebep olabilen inokulum ile karşılaşmasına bağlıdır fakat hastalığın gelişme süresi net değildir. Akciğerlerde; mantarla karşılaşmada, akciğerlerin durumu ve bağışıklık sistemi hastalığın şiddetini ve seyrini belirlemektedir. Patojene özgü virülans faktörleri ile konağın savunma mekanizması etkilidir.

6. *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar ve klinik önemi

Aspergillus türlerinin neden olduğu hastalıklar; sporların solunum yolundan alınması sonucunda aşırı duyarlılık veya invazyonla, travma sonucu deri, gözler veya diğer vücut bölgelerine direkt olarak, mikotoksinler ve diğer metabolitlerin sindirim yolundan alınmasıyla oluşur. Hangi klinik şeklin gelişeceği; konağın bağışıklık sistemine, solunum sistemindeki yapısal anormalliklere ve genetik faktörlere bağlıdır.

Aspergillus türleri, bağışıklık sistemi baskılanmış konakta hayatı tehdit edebilen invaziv aspergilloz olabildiği gibi kronik pulmoner aspergilloz da olabilirler ve tüm bu hastalıklar 'aspergilloz' olarak adlandırılmaktadır. İnvazif Aspergilloz infeksiyonlarının büyük çoğunluğuna *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.flavus* ya da *A.terreus* olmak üzere başlıca 4 tür sebep olmaktadır ve invaziv pulmoner aspergilloz çoğunlukla *A. fumigatus* tarafından oluşturulmaktadır (Pasqualotto, 2010).

Aspergillus türleri, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar için fırsatçı patojen mantarlar arasındadır. Hematoloji hastaları, kemik iliği ve organ

nakli olan hastalar, kemoterapi veya radyoterapi alan hastalar, oto-immun, kistik fibröz ve kronik granümatöz hastaları gibi özellikle nütropenik hastalar invazif aspergilloz açısından risk altında olan hastalardır. Kortikosteroidlerin yüksek dozda kullanılması veya immünomodülatör kullanımı ile KOAH (kronik obstruktif akciğer hastalığı) ve DM (diabetes mellitus) hastalarında önemli risk faktörlerindedir. İA (invazif aspergilloz), hava bulunabilen konidyumların solunum yollarından girmesiyle oluşur ve kontrol altına alınamayan hastalık ilk merkezi sinir sistemine daha sonra tüm vücuda yayılabilir. İA sadece immün sistemi baskılanmış hastalarda görülse de, diğer formları immün sistemi normal kişilerde görülebilir. İA, en tehlikeli seyreden olup; erken ve etkin antifungal tedaviye başlanmasının aspergillozun mortalite ve morbiditesi üzerinde olumlu yönde etkisi vardır (Patterson vd., 2010; Denning 1998).

Aspergillus türleri, nütropenisi olan veya transplantasyon sonrası immün sistemi baskılanmış hastalarda akut fungal pnömoni ve sinüs infeksiyonunun en yaygın nedenleridir. Akut pulmoner aspergilloz; beyin, karaciğer ve kemik dahil olmak üzere birçok bölgeye yayılımla her organı tutabilir. Kronik pulmoner aspergilloz, daha az bağışıklığı baskılanmış hastalarda süreç ilerlediğinde veya önceden var olan bir akciğer boşluğunda fungus topları (aspergilloma) gelişebilir. Aspergilloma, aspergillozun invazif olmayan şeklidir. Sinüs aspergillomu; akciğer aspergillomu ile aynıdır ve sinüs içinde yapısal veya fonksiyonel anormalliklerin olduğu alanlarda gelişir. Mantar topu; önceden var olan kalınlaşmış fibrotik duvarlı akciğer kavitesi içinde, ortak merkezli daireler şeklinde küme oluşturmuş hif yumağından oluşmaktadır. Diyabet, alkol tüketimi kronik pulmoner aspergilloz hastalığına sebep olabilir (Kosmidis ve Denning, 2015). *Aspergillus spp.* türleri astım ya da kistik fibrozis gibi kronik olan akciğer hastalıklarında alerjik bronkopulmoner aspergilloz görülebilir.

Alerjik bronkopulmoner aspergilloz ve alerjik *Aspergillus* sinüziti gibi alerjik aspergilloz formları genellikle yaşamı tehdit etmez. Buna karşılık, nadir görülen invaziv aspergilloz, ciddi bir infeksiyondur ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda önemli mortalite nedenidir. Yapılan prospektif bir çalışmada; invaziv aspergillozlu kişilerde bir yıllık hayatta kalma oranını, katı organ nakli alıcıları arasında %59 ve kök hücre nakli alıcıları arasında %10-%25 olduğunu bulmuşlardır (Kontoyiannis vd., 2010). Mikotik kornea infeksiyonunun, dünya

çapında önemli bir nedeni *Aspergillus* keratitidir ve prognozu kötüdür. Tarımda, güçlü bir çevresel kanserojen ve hepatotoksik ajan olan aflatoksin *Aspergillus flavus* üretir. Kültürlerde yaygın olarak kontaminasyon olarak bulunan *Aspergillus spp.*, çevrede yaygındır (Davise, 2002). Son yıllarda, yoğun bakım hastalarında akciğer aspergillozu görülme sıklığı artmıştır. Yoğun bakım ünitesi otopsi çalışmalarının sistematik bir incelemesinde, aspergilloz, muhtemelen ölüme yol açan en yaygın dört tanıdan biri olarak bulunmuştur (Winters vd., 2012). 2001-2006 yılları arasında gerçekleştirilen transplant alıcıları arasında ileriye dönük sürveyans, invaziv aspergillozun kök hücre transplant alıcılarında en fazla görülen fungal infeksiyon türü olduğu ve katı organ transplant alıcılarında ise en fazla ikinci fungal infeksiyon türü olduğunu belirlemiştir (Pappas vd., 2010).

Çizelge 2. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu hastalıklar (mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr,Aspergilloz, 2018).

Sağlıklı konakta hastalık
Toksikoz veya mikotoksikoz
Alerjik (atopik hastalar veya kistik fibroz gibi) hastalıklar
Astım
Rinit
Sinüzit
Ekstremsk (alerjik) alveolit
Aşırı duyarlılık pnömonisi
ABPA (alerjik bronkopulmoner aspergilloz)
Yüzeysel ya da non-invazif infeksiyonlar:
Deri infeksiyonu
Otomikoz
Sinüzit
Saprofitik bronkopulmoner aspergilloz
İnvazif infeksiyon
Doku tahribi ya da yabancı cisim ile bağlantılı infeksiyon
Keratit ve endoftalmit
Yanık yarası infeksiyonu
Osteomyelit
Prostetik kapak endokarditi
Damar greft infeksiyonu
Aspergilloma (mantar topu)
Ampiyem ya da plevral aspergilloz
Peritonit
Bağışıklık sistemi tahrip olmuş konakta infeksiyon
Primer deri aspergillozu
Sino-orbital infeksiyon
Pulmoner aspergilloz:
İnvazif trakeobronşit
Kronik nekrotizan pulmoner aspergilloz
Akut invazif pulmoner aspergilloz
Santral sinir sistemi aspergillozu
İnvazif aspergilloz
Gastrointestinal infarkt

7. İnvazif Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar

Bir zamanlar mantar hastalıklarının tedavisinde kullanımı zor ve nefrotoksik etkisi yüksek olan Amfoterisin B ve 5-flusitozin gibi ilaçlar kullanılırken, son yıllarda daha az toksik etkinlik sergileyen sistemik etkili ilaçların kullanılması ile antifungal tedavi büyük değişim göstermiştir. Mantar infeksiyonlarının tedavisinde seçeneklerimiz sınırlıdır. Dört ana antifungal ilaç grubu vardır: poliyenler, pirimidin analogları, azoller ve ekinokandinler.

Aspergillus infeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen ve en sık kullanılan antifungal ilaç grubu ise 1990'ların başlarında onay almış azollerdir. Azol sınıfı antifungallerden olan triazollerin tümü sistemik etkinliğe sahiptir ve bu grupta posakonazol, vorikonazol ve itrakonazol yer alır. Azol grubu antifungallerin, Aspergilloz tedavisinde etkisi lanosterolün ergosterole değişimi ile Lanosterol 14- α demetilaz enzimi üzerinden engeller ve mantar hücresindeki membran sentezini inhibe eder. Etken organizmaya ve kullanılan azole bağlı olarak ergosterol sentezinin inhibisyonu, fungistatik (mantar hücre üremesinin inhibisyonu) veya fungisidal (hücre ölümüyle) sonuçlanır. Azol grubu antifungaller, *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal aktivite gösterirler (Murray vd., 2010; Ghannoum and Rice, 1999).

Vorikonazol, suda çözünen geniş spektrumlu ikinci jenerasyon bir triazoldür (sentetik flukonazol türevidir). Plazma proteinlerine ise; yaklaşık olarak %58 oranında bağlanır, düşük molekül ağırlıklıdır. Vorikonazol; *Aspergillus* türü patojenlere karşı aktiviteye sahip geniş spektrumlu yeni bir triazoldür. İnvazif aspergilloz tedavisi için primer endikasyonu vardır. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu beyin apseleri dahil olmak üzere, önemi son yıllarda giderek artan ve inatçı davranan patojenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde vorikonazol başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Merkezi sinir sistemine ve diğer dokulara çok yüksek bir şekilde nüfuz eden vorikonazolün oral ve intravenöz formülasyonları vardır. Küf benzeri mantarlara karşı fungisidal etki gösteren Vorikonazol'un aspergillozun çeşitli formlarının tedavisindeki etkinliği kanıtlanmıştır. Amfoterisin B'ye dirençli *Aspergillus terreus* gibi mantarlara karşı, vorikonazol tercih edilmektedir. Vorikonazol genellikle iyi tolere edilir, ancak hastaların yaklaşık üçte biri geçici görme bozuklukları yaşar ve karaciğer enzim bozuklukları gibi yan etkileri görülebilir (Murray vd., 2010).

Kapsül veya çözelti halinde oral yoldan uygulanabilen lipofilik bir triazol olan itrakonazol, küf benzeri mantarlara karşı fungisidal aktivite spektrumuna sahiptir. İtrakonazol, invazif aspergilloz tedavisinde ikinci seçenektir. Dimorfik mantarlar ile birlikte maya ve küfler üzerinde geniş bir antifungal etkinliğe sahiptir ve plazma proteinlerine bağlanma özelliği vardır. İtrakonazolün oral emilimi düzensiz olduğu için asit gastrik pH gerektirir (Murray vd., 2010).

Posakonazol, itrakonazolün hidroksillenmiş bir analogu olduğu için yapısal olarak itrakonazol ile benzerdir. Geniş spektrumlu ikinci jenerasyon triazoldür ve ilaç etkileşim profili genel olarak iyidir (Schiller, 2007). Posakonazol; *Aspergillus* ve *Mucormycetes* dahil olmak üzere *Candida*, *Cryptococcus*, dimorfik mantarlar ve filamentli mantarlara karşı güçlü aktivite gösterir. Posakonazol, maya benzeri mantarlara karşı fungistatik aktiviteye sahiptir, mantar infeksiyonu yönünden yüksek riskli hastalarda Aspergilloz tedavisinde profilaksi amacıyla kullanılır (Murray vd., 2010). Hemato-onkolojik hastalarda profilaktik olarak posakonazol kullanılmasının, invazif aspergillozu düşürdüğünü ancak nadir mantar infeksiyonlarının ortaya çıkma olasılığını da arttırdığı bildirilmiştir (Lestrade vd., 2018).

Düşük toksisitesi olan birinci nesil bir triazol olan Flukonazol, ciddi yan etkiler nadir olarak görülür ve yüksek oral biyoyararlanımı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Flukonazolün *Aspergillus* türleri gibi fırsatçı küflere karşı etkinliği yoktur (Murray vd., 2010). Flukonazol *Aspergillus* türlerine primer dirençlidir. İmidazol sınıfı antifungallerinden olan Ketokonazol'un *Aspergillus* türlerine karşı yararlı klinik etkinliği çok az ya da hiç yoktur.

Ekinokandinler (mikafungin, anidulafungin, kaspofungin), mantar hücre duvarı üzerinden glukan sentezi inhibisyonu yolu ile etki eden fungisidal aktivite spektrumuna sahiptir. İnvaziv aspergilloza karşı kombinasyon halinde veya tek başına etkilidir. Fakat invaziv aspergillozun ilk tedavisinde kullanımı önerilmemektedir. Ekinokandinler, dar bir etki spektrumuna sahip olduğu için, azoller ve amfoterisin B'ye göre daha az kullanılmaktadır (Patterson vd., 2016).

Antifungal duyarlılık testlerinde kullanılan Amfoterisin B ve lipit türevleri; poliyen antifungal ilaçlardandır. Antifungal ilaçlardan poliyen grubları, fungal membranında steroller ile kompleks bir şekilde etkinlik gösterirler. Major sterol

olan ergosterole bağlanıp, membranda porlar oluşturup hücre zarının geçirgenliğini artırır ve porlardan hücre içinde bulunan potasyum, şeker, magnezyum, bazı metabolitler hücre dışına çıkar ve hücre lizisine yol açar (Ellis, 2002). Lipid formda Amfoterisin B'nin kullanımı, hayatı tehdit eden sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Aspergilloz tedavisinde azollerin tolere edilemediğinde *Aspergillus* infeksiyonlarının başlangıç ve kurtarma tedavisinde kullanılabilir (Ghannoum and Rice, 1999). Uzun süreli nötropeni olan hastalarda Amfoterisin B'nin aerosol formülasyonları profilaksi için kullanılabilir. Amfoterisin B'nin özellikle nefrotoksisite olmak üzere, tedavi sınırlayıcı yan etkileri vardır (Perfect, 2016; Osherov and Kontoyiannis, 2017). Ekinokandinler ve Amfoterisin B sadece intravenöz kullanımla sınırlıdır.

8. İnvaziv Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Azol Grubu Antifungal İlaçlara Direnç

Son yıllarda, tıptaki gelişmeler ile birlikte özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı patojenik mantar infeksiyonlarında artış vardır ve antifungal ilaçlar daha yaygın kullanılmaya başlanması ile direncin gelişmesi artmıştır. Azoller, çoğu *Aspergillus* infeksiyonunun ilk basamak tedavisini oluşturur ve azol direnci aspergilloz tedavisiyle ilgili en önemli klinik endişelerden biridir. Bütün *Aspergillus* türlerinin flukonazole karşı primer antifungal dirence sahipken, diğer azol grubu antifungallere sekonder direnci söz konusudur. Antifungal direnç yönünden dikkat çeken önemli bir konu olarak, *Aspergillus* suşlarında küflere etkili azol grubu ilaçlara karşı gelişen sekonder dirençtir. Ayrıca *Aspergillus* suşlarında sekonder azol direncinin gelişmesinde; aynı zamanda tarımda mahsülü fitopatogenik küflere bağlı fungal hastalıkları ve bozulmaları engellemek için azol grubu fungusitlerin sıkça kullanılmasının da etkili olabileceği konuyu daha önemli bir noktaya getirmiştir. Hem klinik ortamda hem de çevrede artan azol grubu antifungal ilaçlara direnç, klinik ve tarımsal azol ilaçlarının *Aspergillus* türlerine karşı etkinliğini tehdit etmektedir (Van der Linden vd., 2016).

Direncin gelişmesi konağa, ilaca ve mantar ile ilgili faktörlere bağlıdır (Yücesoy, 2009). Antifungal ilaçlar ile tedavi olmayan fungal infeksiyonlar dirençlidir. Mikrobiyolojik ve klinik olmak üzere iki şekilde tarif edilen direnç,

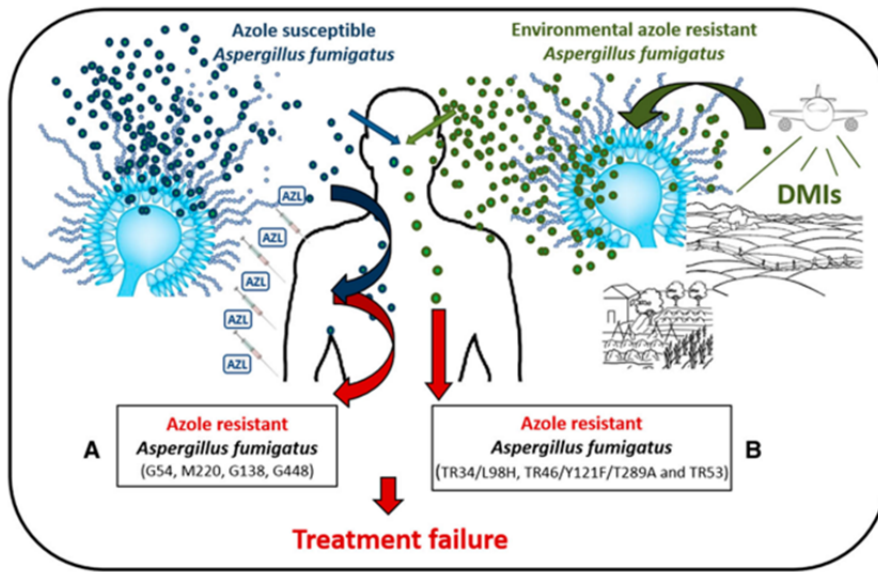
kazanılmış dirençtir. Etkenin antifungal ilaca karşı *in vitro* duyarlılığının azalması veya yok olmasına mikrobiyolojik direnç denir (Wild-type: direnç görülmeyen izolat (WT), Non-wild type: direnç gelişen izolat). Başka sebeplerden ötürü veya mikrobiyolojik dirençten dolayı tedaviye yanıtızlık durumuna klinik direnç denir. Klinik dirençte izolat, antifungal ilacın güvenilir dozda ulaştığı serum ve doku düzeyinden yüksek MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerine sahip olmasıdır (Beyza, 2015; Silley 2012).

Fırsatçı küf mikozların en sık etkeni olan *Aspergillus* türlerinde, antifungal ilaçlara direnç mekanizmalarının araştırılması önemli role sahiptir. Bakteriler; antibakteriyel maddelere karşı direnç mekanizmalarında ilaçları yok edebilir veya değiştirebilir. Ayrıca birçok bakteriyel direnç geni hücreden hücreye aktarılır ve yüksek düzeyli çoklu ilaç direnci hızla ortaya çıkabilir ve yayılabilir. Mantarların direnç kazanmalarında, antifungal ilaçları yok edebildiğine veya değiştirebildiğine dair hiçbir delil yoktur. Antifungal direnç genleri hücreden hücreye aktarılamaz. Mantarlarda antifungal direnç ise ya genellikle yavaş gelişir ya da primer dirençli türlerin ortaya çıkmasını veya önceden maruz kalınan bir ilaca dirençle sonuçlanan hücresel yapıların veya işlevlerin kademeli olarak değişmesini içerir (Murray vd., 2010). MİK değerleri tüm azollere direnç aralığında ise pan-azol direnç, MİK değerleri birden fazla azole direnç aralığında ise multi-azol direnç vardır (Mayr ve Lass-Flörl, 2011; Georgiadou ve Kntoyiannis, 2012). Azol bileşenleri arasında çapraz reaksiyon riski ise yüksektir (Howard, 2009).

Aspergillus türlerinde ilk kez 1997-98 yıllarında ABD’de uzun süre itrakonazol tedavisi alan hastalarda azol direnci bildirilmiştir. Danimarka, Avusturya, Fransa, Almanya, Hollanda, Belçika, İspanya, Norveç ve Türkiye gibi Avrupa ülkelerinde azol direncinin sıklığı son yirmibeş yılda artmış ve triazol dirençli *A. fumigatus* infeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Denning vd., 1997; Nabili vd., 2016).

Son zamanlarda farklı ülkelerde immün sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden pulmoner hastalığa neden olan *Aspergillus* türleri içerisinde en yaygın tür olan *A. fumigatus* izolatlarında kazanılmış azol direnci tespit edilmiştir. Azol dirençli *Aspergillus* kökenleri azol kullanmamış hastalarda, azol kullanan hastalarda ve çevreden alınan örneklerde izole edilmiştir (Snelders vd.,

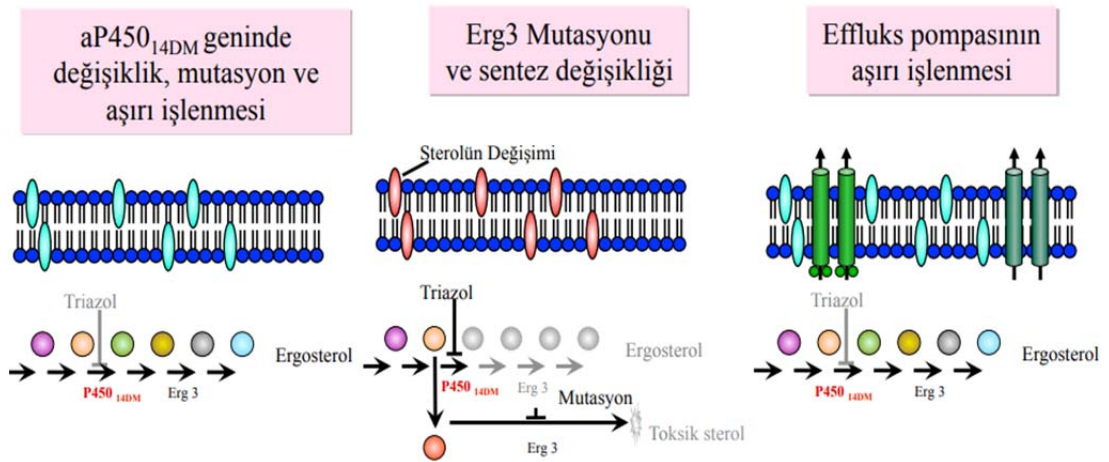
2008; Howard ve Arendrup, 2011; Arendrup vd., 2010). *A. fumigatus* infeksiyonlarında direnç mekanizmasının gelişimi ile ilgili olarak **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'te de belirtildiği gibi iki yol tanımlanmıştır: Ya uzun süreli azol tedavisi alan hastalarda gelişen tıbbi yol ya da tarımda demetilasyon inhibitörü (DMI) ajanların ve azol grubu fungusitlerin kullanımına bağlı oluşan çevresel yoldur (Garcia-Rubio vd., 2017). Azol direnci hem *A. fumigatus* tür kompleksine hem de diğer bazı non-*fumigatus Aspergillus* tür komplekslerine ait suşlarda çeşitli ülkelerden, çok değişen oranlarda azol direnci bildirilse de, gerçek prevalans henüz bilinmemektedir.



Şekil 3. *Aspergillus fumigatus*'un azol direnci kazanma yolları **A:** Hasta yolu ile: Azol duyarlı *A. fumigatus* ile infekte hasta ve azol tedavisinden sonra *A. fumigatus* suşlarının Cyp51A nokta mutasyonları seçimi ile. **B:** Çevresel yol: Daha önce tedaviyle azol dirençli *A. fumigatus* ile infekte hastalarda azol direnç mekanizmaları birleşti. DMI: Demetilasyon inhibitörleri.

Aspergillus türlerinde antifungal ajanlardan azollere karşı gelişen dirençte; çok ilaçlı dışa akım pompaları (Eflüks pompalarının aktivasyonunda artış), hedef bölgedeki değişimler, gen mutasyonları, genin ekspresyonunda artış (*cyp51A*'nın aşırı ifadesi), membran permeabilitesinde azalma ve ilaç hedeflerine erişimin azalması önemli mekanizmalardır. İlacın hücre içinde azalması ve transkripsiyon etkenlerinde modifikasyonlar azollere karşı gelişen kazanılmış olan dirençten sorumludur (Shapiro vd., 2011). *Aspergillus* türlerindeki azol direnci; ilacın hedefindeki enzimlerin miktar ve kalitesindeki bir değişikliğe ya da ilacın hedef bölgeye girişinin azalması gibi sebeplere bağlı olabilir.

Lanosterolden ergosterol oluşumunda önemli rol oynayan, azol grubu antifungallerin hedef enzimi lanosterol 14 α -demetilaz, Cyp51A geninden kodlanan sitokrom P450 ailesinden bir enzimdir. Azol grubu antifungal ilaçlar lanosterol 14 α - demetilazın aktivitesi enzimin hem grubundaki azol halkasına nitrojen grupları ile bağlanıp engellenir, ergosterol sentezi yapılamaz ve hücre zarı oluşumu bozulur. Bunun sonucu olarak lanosterol ve öncesinde olan toksik sterol bileşikleri ile fungusitik etki oluşur. Bu durumun neticesinde; hücre içinde azol grubu ilacın daha yüksek konsantrasyonları gerekir. Hücre içinde çok fazla olan ilacı dışarı atan pompaları kodlayan genler fazla çalışır ve azol grubu antifungaller hücre dışına atılır. *Aspergillus* türlerindeki azol direnci; yeterince aydınlatılamamışken, *A. fumigatus* kökenlerinde nadir olarak itrakonazol direnci bildirilmiştir. İtrakonazole direnç mekanizmaları olarak; hem ilacın dışarı atılımının artması, hem de hedef enzim olan 14 α -demetilaz enzimindeki değişimler gösterilmiştir (Murray vd., 2010). Klinik izolatlarda Cyp51A bölgesinde tanımlanmış çeşitli nokta mutasyonlar hedef değişikliğine sebep olmaktadır. Nokta mutasyonlar da, azol direncine sebep olur (Diaz-Guerra vd., 2003; Mellado vd., 2004). Mutasyonlar VOR ve POS için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin yükselmesine ve ITR direncine sebep olmaktadır (Diaz-Guerra vd., 2003; Kuipers vd., 2011). Nokta mutasyonları, azol kullanmış kişilerden izole edilen suşlarda saptanması, bunun uzun süre antifungal kullanımı ile ilgili olduğu düşünülmüştür (Snelders 2012; Bueid 2012; Camps 2013).



Şekil 4. Azollere Direnç Mekanizmaları (Cowen LE. Eukaryotic Cell 2008 7:747-764).

Azol direnci *A.fumigatus*'da en sık ilacın hedef enzimi olan 14 - α demetilazı kodlayan Cyp51A'daki çeşitli mutasyonlardır. Cyp51 proteinleri *A. fumigatus*'ta, Cyp51A veya Cyp51B olarak isimlendirilen iki gen ile kodlanmaktadır (Mellado vd., 2001). Cyp51B, dışa atım pompa genlerinin aşırı ekspresyonu ile hücrel geçirgenliğini azaltır ve azol grubunun hücre içinde birikmesini azaltır (Lockhart vd., 2011; Cannon vd., 2009). Çeşitli Cyp51B mutasyonları bildirilse de, *A. fumigatus* izolatlarının azol direncindeki rolü net değildir.

Direncin gösterilmesinde, mutasyonların ve polimorfizimlerin gösterilmesinde genomun belirli bölgeleri dizilenmektedir. Gen mutasyonları dirence neden olmaktadır. Azollere dirençte, cyp51A geninin promotor bölgesindeki 34' aminoasitlik bölümün çiftli kopya olmasının rolü vardır. TR34/L98H, direnç mekanizma olarak tanımlanmıştır (Verweij vd., 2009). 1998 yılında TR34/L98H nokta mutasyonu ilk defa, 2011 yılında TR46/Y121F/T289A mutasyonu ise ilk defa Hollanda'da bildirilmiştir. TR34/L98H ve TR46/Y121F/T289A olan *A.fumigatus* suşlarının azol kullanmamış hastalardan ve çevreden izole edilmiştir (Verweij vd., 2016). Bu mutasyonların görüldüğü vakalar çoğunlukla vorikonazol direnci ile ilişkilendirilmiştir (Wiederhold vd., 2015). *A.fumigatus* suşlarında TR34/L98H mutasyon oranı 19 ülkeden 22 merkezin katıldığı bir çalışmada azol direnci oranı %48,9, TR46/Y11F/T289A mutasyon oranı ise %6,3 olarak bildirilmiştir (Van der Linden vd., 2015). Ülkemizde yapılan bir çalışmada *A.fumigatus*'da azol direnci ile ilgili 66 suşta TR34/L98H mutasyonu (%86,8) bildirmiştir (Özmerdiven vd., 2015). Birçok tek nükleotid polimorfizmi Cyp51A geninde en çok bildirilen nokta kodon 98'de bulunur ve bunu 54, 220, 138 ve 448. kodonlarındaki mutasyonlar takip eder. Azol grubu antifungallere karşı MİK değerlerinin ise yabani tip izolatlarda daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Vahşi (yabani) tip izolatlarda, mutasyon tespit edildiğinde azol direnci oluşur ve bu kodonlar sıcak noktalar (hot spot) olarak isimlendirilir. Daha önce azol tedavisi alan hastalarda Cyp51A'nın sıcak noktalarında, nokta mutasyonları G54, G138, M220 ve G448'de ortaya çıkmıştır. Kodon 98 mutasyonları, cyp51A ekspresyonunu arttıran, promotor bölgesinde ardışık tekrar TR34/L98H birlikte görülmektedir. Değişiklikler, direncin ortaya çıkmasını sağlar (Verweij vd., 2009). Azol hedef enziminin yapısını G54 ve M220 mutasyonları etkiler (Barnel-Martinez vd., 2016).

Çizelge 3. *A.fumigatus*'un cyp51A genindeki nokta mutasyonlarda gelişen aminoasit değişiklikleri ve ilişkili azol MİK değerleri (Wei vd., 2015).

Genotype	Amino acid substitution	MIC (µg/ml)		
		Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
Hotspot				
	E	>16.0	0.25	1
G54	R	>16.0	0.12	0.5
	W	>16.0	0.25	4
G138	C	>16.0	8	>16.0
	R	2	16	0.25
	I	>16.0	1	0.5
M220	K	>16.0	2	>16.0
	R	>16.0	2	2
	V	>16.0	1	0.5
G448	S	0.5	8	0.25
Other mutations				
N22D, S52T, Q88H, V101F, N125I, Q141H, H147Y, P216L, F219C, M236K/T/V, A284T, S297T, P394L, Y431C, G434C, T440A, Y491H, F495I, TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A				

Çizelge 4. cyp51A genindeki nokta mutasyonlara bağlı gelişen azol dirençleri (*:Hot spot mutasyonları)

Genotip	Fenotip
G54*	ITR ve POS'e dirençli, VOR'e duyarlı
L98*, G448*, G138*	Tüm azollere dirençli
M220*	ITR ve POS'e dirençli, VOR'e değişken duyarlılık
M236	ITR dirençli, diğerleri duyarlı
P216, S297, G432	ITR ve POS'e dirençli, VOR'e duyarlı
Y431, G434, S52, Q141, H147	Tüm azollere dirençli
T440, N22, P394, Y491	ITR'e dirençli, diğerleri için duyarlılık belirlenmemiş

cyp51A geninde bildirilen, *A.fumigatus*'un polimorfizm ve azol direnci Çizelge 3 ve Çizelge 4'te gösterilmiştir (Wei vd., 2015; Perlin, 2015; Verweij vd., 2016; Howard ve Arendup, 2011; Lelièvre vd., 2013). Promotor bölgesinde olan 34 ve 46 bazlık tekrarlar (rastgele) ve çeşitli aminoasit değişiklikleri azol direncinde önemlidir. 98. konumdaki histidin ile lösinin yer değiştirir promotor bölgede bulunan 34 baz çift tekrarı ile TR34/L98H mutasyonu oluşur ve cyp51A normal ekspresyondan 8 kat daha fazla eksprese olur. Genetik modifikasyon ve Cyp51A'da oluşan nokta mutasyonlar ile birlikte gelişen (aminoasit) aa değişiklikleri direncin fenotipik olarak ortaya çıkmasına sebep olur (Lelièvre vd., 2013).

TR34/L98H mutasyonunu taşıyan izolatlar klinik ve çevresel azollere dirençlidir ve mutasyonların fenotipik özellikleri incelendiğinde çoklu azol direnci tespit edilmiştir. İzolatların antifungal duyarlılık sonuçlarına göre, ITR'ye

%99.6, VOR'e %92.4 ve POS'e %97.8 dirençli bulunmuştur. Örneğin; G54'de görülen mutasyon, ITR ve POS'e dirençli, VOR'e duyarlı suşlarda tespit edilirken, M220 mutasyonu ITR ve POS'e dirençli, VOR'e değişken duyarlılık değerleri tespit edilen izolatlarda bulunmuştur (Stensvold vd., 2012; Howard ve Arendup, 2011).

Promotor bölgede bulunan 46 baz çift, tekrar her zaman Y121F ve T289A değişiklikler ile beraber bulunur. Klinik ve çevresel izolatlarda TR46/Y121F/T289A değişiminin saptanması bu mutasyonun uzun süreli VOR tedavisi ile ya da çevresel azol fungusitlerinin kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (Alvarez-Moreno vd., 2017; Snelders vd., 2015; Ren vd., 2017). TR46/Y121F/T289A değişiklikleri olan izolatların (Cyp51A geninde) yüksek (>8mg/L) VOR MİK'leri tespit edilirken, POS ve ITR MİK değerleri, belirlenen yabancı tip sınırlarındadır (Snelders vd., 2015). Hollanda'da, 3 kopya (TR46 3) ve 4 kopya (TR46 4) 46 baz çiftlik tekrara sahip olan yeni mutasyon (n=2) daha tespit edilmiştir (Zhang vd., 2017; Resendiz vd., 2018). Çalışmalarda promotor bölgelerinde, bazı çoklu azol direnci olan izolatlarda 53 bazlık tekrarlar tespit edilse de, bu değişikliklerde herhangi bir aa değişikliği gözlenmemiş ve cyp51A ekspresyonunun beş kat arttığı tespit edilmiştir. Direnç mekanizmasının gelişimi ile ilgili, 53 bazlık rastgele görülen tekrarların etkinliği belirsizliğini korumaktadır (Alvarez-Moreno vd., 2017; Hodiamont vd., 2009).

9. *Aspergillus spp.* İzolatlarında Azol Direnci ve Epidemiyolojik Veriler

Aspergillus cinsi küfler toprak, su, gıdalar ve çevresel ortamlarda (hastane ortamında inşaatta ortaya çıkan tozlarda, döşemelerde, filtre edilmemiş havalandırma sistemlerinde vs.) bulunur ve oluşturdukları sporlar havada kolayca yayılmaktadır. İnvazif olarak görülen akciğer aspergillozu esas olarak havadaki sporların solunum yolu ile alınması oluşur ve genellikle fırsatçı infeksiyon etkeni olarak görülürler. İnvazif aspergillozda en yüksek mortalite oranı aplastik anemi ve kemik iliği nakli yapılan hastalar arasındadır. Tedavi edilmeyen invazif pulmoner aspergilloz olgularında, % 90'ı aşan mortalite oranları bildirilmektedir. Lösemi ve organ nakli alıcıları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda ise agresif antifungal tedaviyi takiben bile, %50'lik ölüm oranları bildirilmektedir (Brown vd., 2012; Osherov ve Kontoyiannis, 2017). Hematolojik maligniteli

hastalarda invazif aspergilloz ile ilişkili mortalite oranı %29 iken, sağ kalım oranı giderek artmaktadır. 1990'lı yıllarda mortalite oranı %95'in üzerindeyken; 2000'li yılların başında mortalite oranı %55-80 arasındadır (Lestrade vd., 2018). İnvazif aspergilloz insidansının yoğun bakım hastalarında (nötropeni olmayan), % 7 gibi bir oran bildirilmiştir (Gregg ve Kauffman, 2015; Meersseman vd., 2004). Epidemiyolojik veriler *Aspergillus* türlerinde görülen azol direnci hakkında, yüksek riskli hasta gruplarında profilaktik kullanımda, antifungal tedavi seçiminde ve klinik uygulamada büyük öneme sahiptir. Azol direncinin ve gelişim yollarının daha net anlaşılması için araştırılması gerekmektedir.

1984 yılında aspergilloz tedavisinde azol bileşenlerinin kullanılmaya başlanmış ve ilk kullanılan oral ajan ITR'dir ve daha sonra VOR ile POS kullanılmıştır. *Aspergillus* türleri hakkında yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda *Aspergillus* türlerinden en sık rastlanan tür olan *A.fumigatus*'ta azol grubu antifungallerden olan ITR'e direnç ilk defa 1997 yılında tespit edilmiştir (Arıkan-Akdaglı, 2012; Denning vd., 1997; Oakley vd., 1997). Kazanılmış azol direnci tekrarlanan itrakonazol tedavisi almış hastalarda ortaya çıkmıştır (Yücesoy, 2009). Çeşitli çalışmalarda; *A.fumigatus*'ta azol direnci oranları %0,6-28 arasında bulunmuştur. (Rivero-Menendez vd., 2016). Bu bildirimlerden sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, *A. fumigatus* kültür koleksiyonlarına ait izolatlarda dirençli izolalar tespit edilmiştir (Denning vd., 1997; Araujo vd., 2009; Mortensen vd., 2011; Balajee vd., 2005; Rivero-Menendez vd., 2016, Nagano vd., 2010;). 1945- 1998 yılları arasında, Hollanda'da yapılan çalışmada, 170 *A. fumigatus* klinik izolatu ITR ve VOR'ün antifungal duyarlılık sonuçlarına göre; ITR MİK'i 3 izolatta >64 µg/ml olarak saptanmıştır. Suşlarda VOR direnci saptanmamıştır (Balajee, 2006). 1999 yılı öncesinde İngiltere'de, *A. fumigatus* klinik izolatlarda azol direnci saptanmamıştır. *A. fumigatus*'da azol direnci oranı, İngiltere'de % 5, Hollanda'da % 6-12.8 olarak bildirilmiştir (Howard vd., 2009; Verweij vd., 2009). Hollanda'da, dirençli izolatların ~>%90'ında TR34/L98H mutasyonu vardır ve olgular çoğunlukla İnvazif aspergilloz ve İnvazif pulmoner aspergilloz iken; İngiltere'de yapılan çalışmalarda daha önce azol grubu antifungal kullanmış hastalarda, nokta mutasyonlar ile gelişen direnç oluşumu daha fazladır ve olgular çoğunlukla kronik aspergilloz, aspergilloma ve Alerjik bronkopulmoner aspergilloz olarak bildirilmiştir. Hasta profilleri ve direnç

mekanizmaları değerlendirildiğinde İngiltere ve Hollanda'da tespit edilen azol direncinde farklılıklar bulunmaktadır (Chowdhary vd., 2012; Snelders vd., 2009).

Aspergilloz'da azol direnci, Hollanda ve İngiltere'den sonra Avusturya, Danimarka, Fransa, Belçika, İtalya, İsveç, İsviçre gibi çeşitli Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir. 20 ülkeden 23 merkez ile gerçekleştirilen "SCARE NETWORK" çalışmasında (Surveillance Collaboration on Aspergillus Resistance in Europe) 3249 *A. fumigatus* izolatu analiz edilmiş ve 40 izolatta ITR direnci saptanmıştır. Direnç mekanizması TR34/L98H (n=22) olarak tespit edilmiştir. Ülkemizden 27 klinik izolat Hacettepe Üniversitesi tarafından gönderilmiş fakat direnç tespit edilmemiştir (Van Linden vd., 2011). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise; *A. fumigatus* izolatu (n=2941) taranmış, 47 dirençli izolat tespit edilmiştir. TR34/L98H %48.9'ünde (n=23) ve TR46/Y121F/T289A %6.3'ünde (n=3) mutasyonunu saptanmıştır. Hollanda'ya ait olan izolatlarda TR46/Y121F/T289A mutasyonu tespit edilmiştir (Van der Linden vd., 2015).

1998 yılında ilk defa çevre kaynaklı olduğu bilinen TR34/L98H mutasyonu, 2011 yılında ise ilk defa TR46/Y121F/T289A mutasyonu Hollanda'da rapor edilmiştir. Direnç genotipleri incelendiğinde; azol tedavisi almamış hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (CLSI, 2008; Garcia-Rubio vd., 2017). Azol grubu antifungallerden VOR'ü hedef alan bu direnç, hızlı bir yayılım göstermiştir. 1999-2006 yılları arasında direnç oranının %3-7 seviyelerinde olduğu, 2007 yılından sonra artışın devam ettiği görülmüştür. 2009 yılında direnç oranı % 5.3, 2010 yılında ise direnç oranı % 8.3 olmuştur. İlk kez çoklu azol direnci görülmesi ise 2004 yılında gerçekleşmiştir (Kuipers vd., 2011; Van Linden vd., 2011). Hollanda'da çevresel izolatlarının % 12'si ve Danimarka'da ise çevresel izolatlarının % 8'inin TR34/L98H genotipinde olduğu tespit edilmiştir (Snelders vd., 2009; Mortensen vd., 2010). Çevre kaynaklı oldukları düşünülen, TR34/L98H ve TR46/Y121F/T289A mutasyonlarının saptandığı dirençli suşlar Batı-Avrupa ülkelerine ve Asya-Pasifik bölgesine aittir. Çevresel izolatlarda görülen azol direnci, belirlenmiş odaklarda görülmektedir. Birçok Avrupa ülkesinden bildirildiği gibi mutasyonlar, Avrupa dışındaki Çin, İran ve Hindistan gibi ülkelerden de bildirilmiştir (CLSI, 2008; Garcia-Rubio vd., 2017).

2008-2009 yılları arasında ilk defa Avrupa dışından çoğu izolatu Çin'e ait olduğu 62 merkezli ARTEMİS çalışmasında, *A. fumigatus* izolatlarda

TR34/L98H mutasyonu incelenmiş ve 497 *A. fumigatus* izolatının % 5.8 (n=29) itrakonazol direnci tespit edilmiştir. Mutasyonların genetik olarak ortak bir atadan geldiği ve daha sonra ülkeler arasında göç edebileceği var sayılmıştır (Lockhart vd., 2011). Çin'de yapılan çalışmadan sonra Hindistan ve İran'da da dirence rastlanılmıştır. Hindistan, çevresel *A. fumigatus* izolatlarının % 7 ve toprak ve hava örneklerinin ise % 5 oranında TR34/L98H mutasyonu taşıdığını bildirmiştir. İtrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılan azol grubu fungusitlere (n=6) karşı direnç tespit edilmiştir. İran, çeşitli hastanelerin etrafından topladığı 150 çevresel izolattan (toprak örneği), 41 *A. fumigatus* izolatının 5 tanesinde itrakonazol ve vorikonazolde yüksek MİK değeri ve TR34/L98H mutasyonu tespit etmiştir (Chowdhary vd., 2012; Chowdhary vd., 2013; Seyedmousavi vd., 2013; Badali vd., 2013).

ABD'de, 2009 yılında yapılan bir çalışmada 181 *A. fumigatus* izolatının sadece 1 tanesinde direnç görülmüştür (Baddley vd., 2009). 2011-2013 yılları arasında ABD'de 22 merkezin katıldığı 1026 klinik izolatın incelendiği bir sürveyans çalışmasında, azol direnci ve TR34/L98H mutasyonu gözlenmemiştir (Pham vd., 2014). Bu bulgular ABD'de azol direnç oranının <%1 olması, azol fungusitlerinin kullanımının kontrollü ve az olduğu ile açıklanabilir. Hollanda'da azol direnci bulunan *A. fumigatus* izolatlarında (n=15 hasta) cyp51A geninde TR46/Y121F/T289A mutasyonu tespit edilmiştir. Hastaların bahçelerinden ve evlerinden izole edilen *A. fumigatus*'larda da TR46/Y121F/T289A mutasyonu tespit edilmiştir (Van der Linden vd., 2013). Belçika'da, TR46/Y121F/T289A mutasyonları klinik ve çevresel *A. fumigatus* izolatları tespit edilmiştir (Vermeulen vd., 2012).

Aspergillus türlerinde azol direncinin araştırıldığı çalışmalar, sadece kültürde üretilmiş olan izolatlardır. *Aspergillus* türlerinin invazif aspergilloz ve benzeri hastalık durumlarında, hastaların solunum örneklerinden izole edilme ihtimali düşük olduğu için, direnç oranı düşük bulunuyor olabilir. Moleküler yöntemler kullanılarak *Aspergillus* türlerinin saptanması ile gerçek oranlara ulaşma olasılığı artar (Lelièvre vd., 2013). İngiltere, 2011 yılında ABPA'lı hastaların % 78,9'unda ve kronik pulmoner aspergillozlu hastaların % 71,4'ünde (balgam örneklerinde) PCR yöntemi ile *Aspergillus* DNA'sı tespit etmiş ve kültürde *Aspergillus* saptanma oranları ise sırasıyla % 0 ve % 16,7 olarak tespit

edilmiştir. Bu çalışma ile, kültürde *Aspergillus* üremeyen örneklerin 55,1'inde PCR yöntemi ile cyp51A geninde direnç mutasyonlarını taşıdığı tespit edilmiştir (Denning vd., 2011).

2017 yılında Garcia- Rubio ve ark.'ı, genelde 2010 ve sonrası verilere dayanarak yaptığı derlemede, Türkiye de yer almış ve çeşitli ülkelerin klinik *A.fumigatus* izolatlarında azol direnci ve ilgili mekanizmaları **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'de özetlemişlerdir (Garcia-Rubio vd., 2017). *A.fumigatus* izolatlarında azol direnci konusunda, ülkemizde sınırlı sayıda araştırma vardır (Özkütük vd., 2008; Öz vd., 2012; Gürcan vd., 2010; Dikerel vd., 2012). *A.fumigatus* izolatları ile yapılan çalışmalarda itrakonazol için MİK aralıkları 0,008-32 µg/ml olarak bildirilmiştir ve çalışmalarda incelenen izolat sayısı (n=3-55) düşüktür (Özkütük vd., 2008; Öz vd., 2012). Bununla birlikte 2015 yılında ülkemizde 746 *A.fumigatus* suşunun antifungal duyarlılığını inceleyen ve 66 izolatta (% 86.8) ilk defa TR34/L98H mutasyonu tespit edilen bir çalışmada; ITR direnci % 10.2 oranında tespit edilmiştir. Azol direnci tespit edilen 66 izolatın MİK değerleri aralıkları itrakonazol için >16 µg/ml, vorikonazol için 2-8 µg/ml ve posakonazol için 0,064-4 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Özmerdiven vd., 2015). Azol direnci belirlenen bölgelerdeki tarımsal alanlarda, yüksek oranda tıbbi azoller ile çok benzerlik bulunan moleküler bir yapıda olan azol fungusitleri kullanılmaktadır. Bu azol fungusitlerinin çevrede bulunan *Aspergillus* suşlarında azol direncine yol açtıkları belirtilmektedir. Dünya çapında kullanılan 25 çeşitli azol fungusitinden beş tanesinin (tebukonazol, propikonazol, epoksikonazol, bromukonazol, difenokonazol) *Aspergillus* türlerinde en sık görülen patojen olan *A.fumigatus*'da tespit edilen TR34/L98H mutasyonu ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Stensvold vd., 2012). Çalışmalar, *A.fumigatus*'taki direncin tarımsal alanlarda azollerin kullanımıyla tetiklenebileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 5. Dünyanın farklı ülkelerinde klinik *A. fumigatus* izolatlarında bildirilen cyp51A mutasyonları ile ilişkili azol direnci oranları (°: Dirençli izolatlar arasında direnç mekanizmalarının yüzdesi: TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A)

Country	No. isolates	Overall resistance rate (%)	Resistance mechanisms ^a	
			TR ₃₄	TR ₄₆
Europe				
Belgium	192	5.7	54.5	9.1
Denmark	413	4.5	33.3	0
	1162	2.6	57.0	
France	118	0.85	0	0
	125	4.6	16.6	0
	85	8	55.6	0
Germany	527	3.2	35.3	0
	119	5	66.7	16.7
	27	30	71.4	28.5
Portugal	159	0	0	0
Spain	156	0.6	0	0
	362	1.8	0	0
The Netherlands	170	1.7	–	–
	1912	1.7–6	94	0
	209	1.9	100	0
	2062	4.6	90.2	0
	1315	6.8	74.6	20.6
	105	20	62.0	14.3
	2941	3.2	48.9	6.4
Turkey	746	10.2	86.8	0
UK	519	6.6	5.9	0
Asia				
China	72	5.5	75	0
India	103	1.94	100	0
	685	1.75	83.3	0
Iran	124	3.2	75	0
	172	3.5	100	0
Japan	196	11.2	0	0
	171	1.75	–	–
Kuwait	16	12.5	100	0
Taiwan	40	5	–	–
America				
USA	181	0.55	–	–
	220	9.1	10	10
Oceania				
Australia	418	2.1	22.2	0

10. İnvaziv Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Antifungal Duyarlılık Testleri

Fırsatçı *Aspergillus* infeksiyonlarının daha fazla görülmesi, tedavi için kullanılan antifungal ilaçlara gelişen primer ya da sekonder direnç ile antifungallerin toksik etkilerinden dolayı referans olan antifungal duyarlılık testlerine ve standart test parametrelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Antifungal duyarlılık testleri gerekli görüldüğü durumlarda uygulanmalıdır. Bunlar;

- *Aspergillus* türüne karşı etkili olan antifungal ilaç ile primer tedaviye cevap alınmadığı durumlarda veya tedavi altında gelişen infeksiyonlarda,
- Seçilen ilaca karşı *Aspergillus* türünün dirençli veya daha az duyarlı olduğu bilindiğinde,
- Alternatif yeni antifungal ilaçların *in vitro* etki spektrumlarının araştırılmasında,
- Epidemiyolojik sürveyans amaçlı çalışmalarda,
- *In vitro* sonuçlara bakılarak *in vivo* sonuçlar arasında uyumun tespit edilmesinde,
- Nadir ve yeni ortaya çıkan türlere ait suşlarda,
- Antifungal ilaç kullanmış olan olgulardan izole edilen suşlarda.

Antifungal duyarlılık testlerinde; kullanılan test, etken olan organizma ve antifungal ilaçlar gibi birçok faktör etkiler. Organizmaya ait özelliklerden; değişken üreme özelliği; mantarlarda üremenin inkübasyon ısısı, besiyeri ve pH sonuçları etkilemektedir. İlaça ait özelliklerden; antifungal ilaçlara ait suda eriyebilme özelliği, kimyasal stabilite ve etki şekli gibi özellikler; kullanılan tampon ve pH' ın ilaç aktivitesini etkileyebilmesi gibi özellikler de sonuçları etkilemektedir. Sonuçları etkileyebilen diğer önemli faktörler ise; inokulum yoğunluğu, testin inkübasyon sıcaklığı ve süresi, besiyerinin içeriği ve Ph'ı, MİK değerinin belirlenmesinde hangi yöntemin kullanıldığı sonuçları etkiler. Bu değişken parametrelerin ve bunlara bağlı oluşabilecek sorunların oluşmaması için antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyon vardır. Bazı mantar türlerinin yavaş üremesi, ortamın pH'ı, ısısı ve besiyeri içeriği gibi mantarın üreme

formunu belirleyen etkenlerden dolayı antifungal duyarlılık testlerin uygulanması oldukça zor ve karmaşıktır (Sancak, 2009).

Aspergillus infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antifungal ilaçların seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerinin yapılması tedavi seçiminin değerlendirilmesine katkısı nedeniyle önemlidir. *Aspergillus* türleri ile gelişen tüm invaziv infeksiyonlarda, etkene antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Özellikle *Aspergillus fumigatus* suşlarında sekonder azol direncinin saptandığı bölge veya ülkelerde azol grubu antifungal duyarlılık testlerinin yapılması çok önemlidir. Bu amaçla, standart referans yöntemler ile mikroorganizmanın üremesini gerekli düzeyde inhibe eden konsantrasyon belirlenmekte ve sonuçlar MİK (minimum inhibitör konsantrasyon, µg/ml) değerleri ile yorumlanarak, türlere özgü olan duyarlılık sınır değerleri ile karşılaştırılmaktadır (Perlin vd., 2015). MİK, belli ilaç konsantrasyonlardaki üreme yoğunluklarının antifungal ilaç bulunmayan üreme kontrol çukurundaki kıyaslanması ile belirlenen bir değerdir.

Antifungal duyarlılık testlerinde, in vitro standardizasyonu sağlayan CLSI ve EUCAST referans yöntemleri olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılığı için; EUCAST ve CLSI M38-A2 kılavuzlarına göre duyarlılık testleri uygulanmaktadır. CLSI, küf mantarları için uygulanacak standart bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirmiştir. Yöntemler ile ilgili rehberler, yıllar içerisinde gereken alanlarda revize edilerek bugünkü şeklini almıştır. CLSI, küfler için broth (sıvı) mikrodilüsyon duyarlılık testleri geliştirmiştir. CLSI mikrodilüsyon rehberlerinin ardından, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee (EUCAST-AFST) tarafından küf mantarları için, CLSI mikrodilüsyon yöntemiyle kıyaslandığında bazı modifikasyonlar içeren yöntemler geliştirmiş ve rehberler yayınlanmıştır. Bu infeksiyonlarda MİK değeri belirlemek için önerilen EUCAST altın standart referans yöntem; broth mikrodilüsyon yöntemleridir (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020; CLSI Document M38-A2, 2008; Arendrup vd., 2015; Meletiadis vd., 2017; Ullmann vd.,2018; Patterson vd., 2016; Espinel-Ingroff, 2003).

a. Antifungal Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Sıvı Bazlı Yöntemler

- **Referans CLSI mikrodilüsyon test yöntemi:**

Küflerde, referans olan yöntem (CLSI M38-A2) sıvı mikrodilüsyondur. RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız; MOPS (3-‘N-morfolino’ propansülfonik asit) ile tamponlanmış; pH=7) besiyeri olarak kullanılır. İlaç stok çözeltileri CLSI M38-A2 rehberlerinin önerileri doğrultusunda hazırlanır. 35°C’de inkübasyona bırakılır ve süspansiyonda hiflerin yerine konidyalar kullanılmalıdır. Hifler ile hazırlanan homojen süspansiyonda tekrarlanabilen ve tutarlı olan sonuçların elde edilebilmesi güçtür ve hifler ile hazırlanan süspansiyonlarda elde edilen MİK değerlerinin konidya süspansiyonların kullanılmasıyla elde edilen sonuçlara göre önemli derece yüksek olduğu bazı araştırmalarda bildirilmiştir. Konidyal süspansiyon, 3-5 dakika ağır partiküllerin çökmesi için bekletilir ve üst kısımda bulunan süspansiyonda hifler ve çimlenmemiş konidyalar daha azdır ve daha homojendir, burada alınıp vortekslenir. CLSI rehberlerinde spektrofotometre ile süspansiyonun yoğunluğu 530 nm olan inokulumun hazırlanması önerilir. Stok olan inokulum süspansiyonları besiyeri ile 2x olacak şekilde yani 1:50 oranında ayarlanır ve 0,4-5x10⁴ hücre ml⁻¹’lik final inokulum yoğunluğu olmalıdır. İlacın dilüsyonları rehberlerde; tek kullanımlık, steril, mikrodilüsyon plaklarında (96 kuyucuklu) hazırlanıp, dağıtılır. 1:50’lik konidya içeren süspansiyondan her kuyucuğa 100 µl bırakılır. Mikrodilüsyon plakları inkübasyon sonrasında *Aspergillus spp.* için öneriler doğrultusunda 48 saat sonra (üremenin az olduğu nadir durumlarda 72 saat) MİK değerleri değerlendirilir. *Aspergillus spp.* için uygulanan triazol grubu antifungaller için testin okumasın MİK sınır nokta kriteri üremenin bittiği en düşük ilaç konsantrasyonudur. Amphotericin B, triazollere benzerdir. Ekinokandin grubu antifungaller için ise; sınır noktanın belirlenmesi için minimum efektif konsantrasyon (MEK, µg/ml) değerinin 24 saatte mikroskopik olarak incelenmesi gerekmektedir (Johnson and Cavling-Arendrup, 2015). Hasta serumunda istenilen farmakolojik etkiyi elde etmek için, ilacın gereken minimum konsantrasyonu MEK olarak adlandırılır. MEK, makroskopik/mikroskopik olarak morfolojide görülen değişiklikleri saptamaya yönelik bir okuma değeridir.

CLSI, makrodilüsyon test yönteminini ilk başlarda tek referans yöntem kabul etmiştir. Makrodilüsyon yöntemi uygulamanın güçlüğü ve çok fazla

malzemeye ihtiyaç duyulması gibi olumsuz yönleri bulunmaktadır. Makrodilüsyon yönteminde, 35°C’de karıştırılmadan tüpler bekletilir, üremesi kontrol edilir ve broth mikrodilüsyon yönteminde olduğu gibi MİK değerleri belirlenir. CLSI, makrodilüsyon yöntemini küfler için önermektedir çünkü mikrodilüsyon testindeki gibi inokulum stok solüsyonları ve ilaç dilüsyonları hazırlanır. Ayrıca küfler için; sarı renkten (tetrazolyum tuzlarının) mor renge (formazan türevlerine) parçalanması ile renk değişikliği oluşmaktadır ve mikropalak fotometre yardımı ile okunup metabolik aktivitenin ölçülmesi işlemine dayalı olan kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemidir (Sancak, 2009). CLSI daha sonra referans yöntem olarak broth mikrodilüsyon test yöntemini kabul etmiştir. Bu yöntemin, makrodilüsyon yöntemine göre uygulanması daha ekonomik mikropalaklarla çalışılabilen, daha pratik, daha kısa sürede birçok mantarın antifungal duyarlılığını tespit edebilmiştir (Johnson, 2008). Küfler için makro ve mikrodilüsyon yöntemlerinde elde edilen sonuçlar benzer olsa da broth mikrodilüsyon yöntemi daha kolay uygulanabilirliği ile avantajlıdır (Sancak, 2009).

- **Referans EUCAST mikrodilüsyon test yöntemi:**

Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testleri Komitesi ile ilişkili Antifungal Duyarlılık Testleri Alt Komitesi tarafından (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee (AFST) of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)), CLSI’nin geliştirdiği standart mikrodilüsyon test yönteminden sonra, mikrodilüsyon temelli fakat birkaç farklılık içeren yeni bir yöntem geliştirilmiştir (Wayne, 2009).

CLSI M38-A2 ile EUCAST E.Def 9.1 referans mikrodilüsyon test yöntemleri karşılaştırıldığında, arasındaki farklılıklar **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**’da verilmiştir.

Çizelge 6. *Aspergillus* cinsi için uygulanan antifungal duyarlılık testlerinde CLSI ve EUCAST'ın rehberlerdeki önerileri arasındaki farklılıklar (Dereli ve Koç; Lass-Flörl, 2010).

YÖNTEM	CLSI M38-A2	EUCAST E.Def 9.1
Besiyeri	RPMI-1640 (L-glutaminli, bikarbonatsız, glukoz: % 0.2)	RPMI-1640 (L-glutaminli, bikarbonatsız + glukoz: % 2)
İnokulum yoğunluğu	0,4-5x10 ⁴ hücre ml ⁻¹	1-2,5x10 ⁵ hücre ml ⁻¹
İnokulum standardizasyonu	Spektrofotometrik	Hemositometrik
Mikrodilüsyon plağı	96 U- tabanlı	96 düz tabanlı
MİK okuma zamanı	48 saat	24-48 saat
MİK okuma yöntemi	Görsel	Görsel

In vitro direncin belirlenmesinde birincil olarak tercih edilmesi gereken değerler, klinik direnç sınır değerleridir. EUCAST rehberinde bulunan klinik direnç sınır değerleri, klinikte tavsiye amaçlı geliştirilmiştir (www.eucast.org). İlaçların farmakolojik özelliklerinin ve klinik ortamda hasta sonuçları ile ilgili veriler ile bu değerler tespit edilmiştir (Wiederhold and Patterson, 2015). Klinik direnç sınır değerlerinin bulunmadığında, mantar türü ve antifungal ilaç için belirlenmiş olan epidemiyolojik eşik değerleri (ECOFF); ilgili suşun o ilaca dirençle ilişkili olası bir mutasyon içerip içermediğine ilişkin bilgi sağlar ve tedavide klinik direnç sınır olan değeri değildir. Bir ilacın, belirli bir tür için ECOFF'u geniş olan bir panel WT (vahşi-tip) yani ilaca karşı kazanılmış veya mutasyona bağlı direnç tespit edilmeyen izolatın MİK dağılımıdır ve genellikle %95-97,5'si WT popülasyonunu oluşturmaktadır. EUCAST kılavuzunda antifungal ilaçlar için; 'klinik eşik değerler' ve vahşi-tip *Aspergillus* kökenleri için ECOFF 'epidemiyolojik MİK eşik değerleri' belirlenmiştir. *Aspergillus*'lerin azollere dirençli veya duyarlı olarak değerlendirilmesi için kullanılan EUCAST rehberlerinin klinik sınır değerleri ve ECOFF değerleri bazen tutarlı olmayabilir (www.CLSI.org; Ener, 2015; Wiederhold and Patterson, 2015). *Aspergillus* türlerinin MİK değerlerinin yorumu ile ilgili sorunlar vardır. Bu değerlerin belirlenmesine rağmen, MİK değerleri ile tedaviye klinik yanıt arasında henüz bir ilişki kurulamamıştır. *Aspergillus* türlerine, kullanılan antifungal ilaca ve

inkübasyon zamanına bağlı olarak CLSI ve EUCAST rehberlerindeki standartlar arasındaki benzerlikler değişebilmektedir.

Antifungal duyarlılık testleri için; sonuçları gözle okunan mikrodilüsyon temelli bir kolorimetrik bir yöntem olan Sensititre Yeast YO10 gibi ticari kitler de vardır. Sonuçları CLSI yönteminin sonuçları ile uyumludur. Sensititre YeastOne, filamentöz mantarlarda kullanımı önerilmemiştir, ancak yararlı olabileceğini gösteren az sayıda çalışma vardır (Berkow vd., 2020).

b. Antifungal Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Agar Bazlı Yöntemler

CLSI, mikrodilüsyon rehberlerinin geliştirilmesini izleyerek küf mantarları için CLSI disk difüzyon yöntemleri de geliştirmiştir. CLSI M51-A1 ile; triazolineri test etmek için ucuz ve kullanımı kolay olan bir yöntem olan disk difüzyon yöntemini yayınlamıştır (CLSI Document M51-A, 2010). Referans broth mikrodilüsyon test yöntemi ile disk difüzyon test sonuçları karşılaştırılmış ve genelde disk difüzyon testinde mikrodilüsyondan 24 saat önce; S (duyarlı), I (doza bağlı duyarlı) ve R (dirençli) gibi kalitatif sonuçlar elde edilmektedir. Disk difüzyon yönteminde; Müeller Hinton agar besiyeri (%2 glukoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi ilave edilmiş) kullanılmaktadır.

Standardizasyonun sağlandığı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri dışında E-test (gradient test) yöntemi ve agar dilüsyon yöntemi gibi diğer alternatif yöntemlerde antifungal duyarlılık testlerinde kullanılmaktadır.

E-test yönteminde; antifungal maddeler farklı konsantrasyonlarda in vitro olarak mantarların duyarlılığını kantitatif olarak belirleyen ince plastik stripler ile çalışılmaktadır. Antifungal ilacın stripten agara doğru difüze olması sonrasında, agarda bulunan küf izolatının büyümesi engellenir. Plastik stribin uzantısı boyunca kesintisiz bir gradyan ile antifungal konsantrasyonlar oluşturmaktadır. Antifungal test şeridinde MİK değeri, elips şeklindeki inhibisyon zonunun sınırlarının kesiştiği ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmektedir. Azol grubu antifungal içeren E-test stripleriyle yapılan antifungal testlerde *Aspergillus* türlerinde elips şeklindeki büyüme inhibisyonu zonunun içinde mikrokolonilerin varlığı okuma yaparken ihmal edilmektedir (Pasqualotto, 2010). *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılığının E-test yöntemiyle belirlenmesinde; azol grubu antifungaller için standart yöntemle korelasyonun yüksek olduğu bildirilmesine

rağmen, Amphotericin B için önemli uyuşmazlıkların bildirilmektedir. E-test yöntemi, kolay uygulabildiği için avantaj sağlaması ile antifungallere karşı direncin izlenmesinde daha fazla örneğin değerlendirilir ve çok merkezli çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Pasqualotto, 2010; Johnson and Cavling-Arendrup, 2015). E-test yöntemi, küf mantarlarında alternatif bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda itraconazol ve vorikonazol gibi antifungaller için referans yöntemler karşılaştırıldığında % 90 ve üzerinde uyum saptanmıştır (Pfaller vd., 2003; Espinel-Ingroff and Rezusta; 2002). Fakat GD testi ile ilgili yayınlanmış bir klavuz yoktur.

E-test azol grubu antifungal duyarlılık sonuçları CLSI referans yönteminin sonuçları ile vorikonazolde mükemmel, posakonazol ve itraconazolde ise %80-100 uyum göstermektedir. Antifungal duyarlılık testleri primer tedaviye yanıtızlık, tedavi altında gelişen infeksiyonlar, uzun süreli azol grubu antifungal kullanımı ve tekrarlayan kültür pozitiflikleri gibi durumlarda özellikle de sekonder azol direncinin geliştiği *A. fumigatus* suşlarında büyük öneme sahiptir.

Çizelge 7. EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 ve E.Def 11.0 prosedürlerini kullanan *Aspergillus spp.* için antifungal ECOFF'lar ve duyarlılıklar (Version 3.0, 2022-01-18)

Türler	Azol Grubu Antifungal	ECOFF (mg/L) WT ≤	CBP (mg/L)			ATU
			S ≤	I	R >	
<i>A. flavus</i>	Voriconazole	2				
	Itraconazole	1	1		1	2
	Posaconazole	0,5				
<i>A. fumigatus</i>	Voriconazole	1	1		1	2
	Itraconazole	1	1		1	2
	Posaconazole	0,25	0,125		0,25	0,25
<i>A. nidulans</i>	Voriconazole	1	1		1	2
	Itraconazole	1	1		1	2
	Posaconazole	0,5				
<i>A. niger</i>	Voriconazole	2				
	Itraconazole	4				
	Posaconazole	0,5				
<i>A. terreus</i>	Voriconazole	2				
	Itraconazole	0,5	1		1	2
	Posaconazole	0,25	0,125		0,25	0,25

ECOFF: Epidemiyolojik Eşik Değer, CBP: Klinik Sınır Değer, ATU: Teknik olarak belirsiz alan

Referans mikrodilüsyon yöntemleri, yoğun iş gücü ve deneyim gerektirmektedir. *In vitro* antifungal duyarlılığın saptanabilmesi için başka yöntem arayışları ve çalışmaları olmuştur. Agar bazlı yöntemler; agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon yöntemi ve gradient test (E-test)'dir. *Aspergillus* suşlarında azol direncinin taranmasına yönelik agar dilüsyon tarama yöntemi de geliştirilmiş, bir referans EUCAST yöntemi olarak kullanıma girmiştir (EUCAST E.DEF 10.2, 2022). Agar dilüsyon yönteminde; azol grubu antifungaller arasında direnci araştırmaya yönelik azol içeren agar yöntemidir. Örneğin: 4 mg/L itrakonazol (erimiş agara 10x çift dilüsyonları halinde) katılır. Antifungal ilaç içeren plaklar, *Aspergillus* türlerinin süspansiyonu ile inokulasyonu sağlanır. Çalışmalarda; *Aspergillus* türlerinden özellikle *Aspergillus fumigatus* izolatlarında, azol grubu antifungallere direncin araştırılmasında agar plak yöntemi kullanılmıştır (Buil vd., 2017; Arendrup vd., 2018; Guinea vd., 2018).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

A. Çalışma Alanı

Bu tez çalışması; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Mikoloji Laboratuvarı'nda 2015-2021 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden (apse, kornea apsesi, biopsi, doku ve solunum örnekleri) izole edilerek *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış, -80°C'de saklanmış olan toplam 125 adet *Aspergillus* izolatu ile yürütülmüştür. Araştırmanın protokolü İstanbul Aydın Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2022/66 sayılı kararla onaylanmıştır (EK 1).

B. Çalışmanın Genel Planı

Klinik örneklerden izole edilmiş olan *Aspergillus spp.* örnekleri ile, tez çalışmasına yönelik işlemler aşağıdaki plan doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan izolatların tür tanımlaması yapılmıştır.
2. Çalışmaya alınan tüm *Aspergillus spp.* izolatları azol direnci için azol agar tarama testi ve gradient test ile incelenmiştir.
3. Azol grubu antifungallere karşı direnç belirlenen izolatlara direnci doğrulamak için broth mikrodilüsyon duyarlılık testi yapılmıştır.
4. Azol direnci belirlenen *Aspergillus spp.* izolatlar moleküler olarak tür düzeyinde tanımlamak için DNA dizi analizi yapılmıştır.
5. Azol direnci ile ilgili en fazla bağlantılı olan *cyp51A* genindeki mutasyonlar gerçek zamanlı PCR ile tespit edilmiştir.

C. *Aspergillus spp.* İzolatlarının Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Klinik materyalde mantarları saptamak ve özelliklerini ortaya koymak için; %10'luk KOH (Potasyum hidroksit) ile direkt bakılarak mikroskopide 40x'de inceleme, Giemsa ile boyanan preparatlar mikroskopide 100x'de inceleme ve primer kültür gibi aşamalardan sonra *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış izolatlar arasından her hastadan bir izolat olacak şekilde klinik açıdan etken olduğu düşünülen *Aspergillus spp.* izolatları arasından hastanın tekrarlayan örneklerinde duyarlılığı değişmeyen izolatlar için ilk izolat, hastanın tekrarlayan örneklerinde direnç gelişen izolatlar için en dirençli izolat seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik izolatların etken veya kolonizan ayırımında; direkt ve boyalı mikroskopik incelemenin ve kültürlerin pozitif olması (veya ardışık örneklerde kültürde üreme olması), hastaların serum veya BAL örneklerinde galaktomannan pozitifliği, radyolojik (akciğer tomografisinde halo işareti gibi) ve histopatolojik bulguları ve klinisyen görüşü ile değerlendirilerek yapılmıştır (Tümbay, 2021: 335-362; Sığ ve Arıkan, 2019; Patterson vd., 2016). Bu gibi ölçütlerin dışında kalan ve kontaminasyon olarak değerlendirilen izolatlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

D. *Aspergillus spp.* İzolatlarının Konvansiyonel Yöntemler İle Tanımlanması

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan izolatların tür tanımlaması yapılmıştır. Tür seviyesinde identifikasyon için organizmayı izole edebilmek amacıyla standart mikolojik besiyerlerine kültürü yapılmıştır.

İzolatların makroskopik olarak tanımlanmasında; SDA besiyerinde üreyen *Aspergillus spp.* kolonileri morfolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Mavi-yeşil renkte süet benzeri yüzeye sahip koloniler *A. fumigatus* olarak, perifer beyaz siyah renkte koloniler *A. niger* olarak, önce beyaz-sarı sonrasında yeşile dönen koloniler *A. flavus* olarak, kum-kahverengi, tarçın rengine süet benzeri yüzeye sahip koloniler *A. terreus* olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların mikroskopik olarak tanımlanmasında; PDA besiyerinde üreyen koloninin özellikle perifer kısmını da kapsayacak şekilde Lactophenol Cotton Blue ile selofan bant yöntemiyle mikroskopik görünümü incelenmiştir.

Mikroskopik özelliklerine göre; 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 değerlendirilmiştir. Mikroskopik olarak 40x görünümde; konidyoforları kısa, düz olup konidyoforlardan çıkan fiyalidler tek sıralı ve vezikülün üst 2/3'ünü kaplıyorsa izolat *A. fumigatus* olarak değerlendirilmiştir. Konidyoforları düzensiz, çukurlu veya dikenli yapıda olup konidyofordan çıkan fiyalidleri tek veya iki sıralı şekilde vezikülün tamamını kaplıyorsa izolat *A. flavus* olarak değerlendirilmiştir. Konidyoforları kısa, düz olup fiyalidleri iki sıralı, vezikülü kolumnar şekilde kaplıyorsa izolat *A. terreus* olarak değerlendirilmiştir.

- **Mantar Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışı**

Aspergillus spp. olarak tanımlanmış küf kolonilerinin izolasyonunda; SDA (Sabouraud Dekstroz Agar) besiyeri ve PDA (Potato Dekstroz Agar) besiyeri kullanılmıştır.

- **Sabouraud Dextrose Agar Besiyeri**

Mycological peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar	15 g

Besiyeri (Oxoid) üretici firmasından 500 g'lık kutuda hazır olarak alınmıştır. Toz halindeki içerikten (agar, dekstroz, hayvan dokusu peptik sindirimi, kazeinin pankreatik sindirimi) 65 gram tartılmış,1000 ml distile su içerisinde 121°C'de otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri içerisine 25.6 mg/L gentamisin eklenmiştir. pH ise 5.6 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. 9 cm çaplı steril petri kutularına hazırlanan besiyeri 20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

- **Potato Dextrose Agar (Difco)**

Potato Starch (from infusion)	4 g Dextrose 20 g
Agar	15 g

Besiyeri (Difco) üretici firmadan 500 g'lık kutuda hazır olarak alınmıştır. Toz halindeki besiyeri içeriğinden 39 gram tartılmış,1000 ml distile su içerisinde 121°C'de otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerinin pH'sı 5.6 ± 0.2 olacak şekilde ayarlanmıştır ve 45-50°C'ye kadar soğutulmuştur. 9 cm çaplı steril petri

kutularına hazırlanan besiyeri 20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüm besiyerleri kullanılana kadar 2-8°C'de, buzdolabında saklanmıştır.

- **Gliserollü sıvı Brucella besiyeri (Brucella broth)**

Brucella Broth	28 g
Gliserin	100 mL
Distile su	900 mL

Besiyeri (Acumedia) üretici firmadan 500 g'lık kutuda hazır olarak alınmıştır. Belirtilen prosedüre göre 28 g toz besiyeri 900 mL distile suda eritilmiş, 100 mL gliserin eklenmiş ve pH 7.5 ± 0.2'e ayarlanmıştır, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Kültürde üretilen izolatlar saflaştırıldıktan sonra gliserol içeren brucella broth besiyerinde -80 °C'de stoklara alınmıştır.

Brucella broth besiyerinde -80 °C'de stoklanmış olan *Aspergillus spp.* izolatları Sabouraud dekstroz agara (SDA) ve potato dekstroz agara (PDA) besiyerine ekimleri yapılmış, petri ler 25° ve 35°C'de inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonra üremelerin kontrolü yapılmıştır. Morfolojik olarak *Aspergillus spp.* türlerine benzeyen tüm koloniler saf olarak izole ettikten sonra *Aspergillus spp.* olarak tanımlaması doğrulanmış ve çalışmaya dahil edilmiştir.. İzolatların tanımlanmasında, makroskobik ve mikroskobik morfolojik özellikleri ve özellikle de 45°C'de (termotolerans testi) olmak üzere farklı sıcaklıklarda üreme özelliği dikkate alınmıştır. Koloni morfolojileri makroskobik olarak ve laktofenol pamuk mavisi ile mikroskobik olarak incelenmiştir. *Aspergillus niger* türleri 24 saat sonra izole edilirken, diğer *Aspergillus* türleri en erken 48 saat sonra izole edilmiştir ve üreme süreleri değerlendirilmiştir.

E. Azol Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmamızda, *Aspergillus spp.* olarak tanımlaması yapılmış olan türlerin azol grubuna (vorikonazol, itrakonazol ve posakonazol) duyarlılık testleri: gradient test (E-test), agar tarama plak yöntemi ve broth mikrodilüsyon ile yapılmıştır. *Aspergillus spp.* olarak izole edilen izolatlara antifungal duyarlılık testinin uygulanmasında, yeterli miktarda sporülasyonun sağlanması amacıyla izolatlar SDA'larda 37°C'de 2-7 gün inkübe edilmiştir. Azol grubu antifungallere karşı gradient test veya agar plak yöntemiyle direnç belirlenen izolatlara, broth

mikrodilüsyon yöntemiyle doğrulama amacıyla antifungal duyarlılık testleri tekrar yapılmıştır.

1. RPMI besiyerinin hazırlanması

Toz halindeki L-glutaminli RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyerinden 8,4 gr alınmış ve 34,53 gr MOPS (3-N-morfolinopropan sülfonik asit, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) tamponu ile 500 ml distile suyun içerisinde tortu kalmayacak şekilde karıştırılmıştır. RPMI ve MOPS besiyerlerinin homojenizasyonu sağlandıktan sonra 1M NaOH ile besiyerinin pH'ı 7'e ayarlanmıştır. Ayrı bir yerde 15 gr Bacto agar (Oxoid) ve 20 gr D glukoz (Oxoid) 500 ml distile suyun içerisinde çözündürülmüştür. Distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır. Filtrasyon yöntemi ile besiyeri sterilize edilmiş ve otoklavdan çıkan çözeltiler 45°C'de karıştırılmış ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (CLSI Document M38-A2).

Gradient Test (E-test) için RPMI besiyerinin hazırlanması: EUCAST önerileri doğrultusunda hazırlanan RPMI (%2 glukozlu) besiyeri steril 90 mm ×15 mm çaplı (~20-25 ml) petrilere (Gamma, Turkey) dağıtılmıştır.

Agar tarama plak yöntemi için RPMI besiyerinin hazırlanması: EUCAST önerileri doğrultusunda hazırlanan RPMI 1640 (%2 glukozlu) besiyerine, itrakonazol (4 mg/L), vorikonazol (2 mg/L), posakonazol (0.5 mg/L) ilave edilmiştir ve steril 35 mm ×10 mm çaplı (~4-5 ml) petrilere (Greiner, Germany) dağıtılmıştır. Antifungal ilaç içermeyen besiyerleri de hazırlanarak kontrol plağı olarak kullanılmıştır ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (Guinea vd., 2018; Build vd., 2017; Arendrup vd., 2018; www.eucast.org).

Mikrodilüsyon yöntemi için RPMI besiyerinin hazırlanması: CLSI M38-A2 referans mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antifungal duyarlılık testleri hazırlanmış ve uygulanmıştır.

İlaç çözeltileri: Antifungal ilaç dilüsyonlarının hazırlanması için VOR (UK-109, 496; Vfend [Pfizer, Pharmaceuticals, New York]), ITR için (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ve POS için (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) saf etken maddeleri kullanılmıştır. Antifungallerin 1600 µg/mL'lik stokları DMSO (dimetilsülfoksit, Merck KGaA, Almanya) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Son konsantrasyonları elde edilen ilaçlar birer mililitrelik

ependorflara dağıtılarak deneyler yapılmaya kadar -80°C'de bekletilmiştir. Çalışma zamanı DMSO'nun etkisini azaltmak ve çalışma konsantrasyonlarını hazırlamak için RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyeri ile iki kat seri sulandırılmıştır ve her bir antifungal ilacın son konsantrasyonu 0,032-16 µg/mL aralığında olacak şekilde U tabanlı mikrodilüsyon plaklarına 100'er µL dağıtılmıştır.

2. Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması

Gradient Test (E-test)'in uygulanması: SDA'dan saf kültürleri elde edilen izolatlardan, birkaç koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonu hazırlanmıştır. Oluşan süspansiyondaki ağır partiküllerin çökmesi için 3-5 dk beklenmiş ve üstteki homojen kısım başka bir steril tüpe aktararak 15 saniye vortekslenmiştir. McFarland 0,5 bulanıklığında ayarlanan *Aspergillus spp.* süspansiyon vortexlendikten sonra hazırlanmış olan RPMI 1640 besiyerlerine steril eküvyonlar ile yayılmıştır. E-test stripleri (ITC, VOR, POS; Biomerieux, USA) besiyerine pens yardımı ile yerleştirilmiş ve besiyeri 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır (<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest>).

Agar tarama plak yönteminin uygulanması: ITR, VOR, POS ilave edilmiş ve antifungal ilaç içermeyen (pozitif kontrol) RPMI 1640 (%2 glukozlu) agar içeren dört küçük petrinin her birine 0.5 McFarland standardında 25 µl konidial küf süspansiyonundan yayılmıştır ve petriler 37°C'deki etüvde 48 saat inkübe edilmiştir.

Mikrodilüsyon yönteminin uygulanması: Mikroplaklardaki her bir kuyucuğa 100 µl RPMI besiyeri konulmuştur. Daha sonra ilk kuyucuklara 16 µg/ml'den başlayarak seyreltilen ilaç süspansiyonlarından 100 µl konulmuş ve ilk kuyucuklardan 100 µl alınıp ikinci kuyucuklara konulmuş, ikinci kuyucuktan 100 µl alınıp üçüncü kuyucuklara konulmuş ve bu şekilde son iki kuyucuğa kadar devam edilerek en son alınan 100 µl dışarı atılmıştır. Son olarak, sondan bir önceki kuyucuk hariç her bir kuyucuğa 0.5 McFarland, 10 µl küf süspansiyonu ilave edilmiştir. İlaç ve küf süspansiyonu içermeyen sondan bir önceki kuyucuk besiyeri kontrol, ilaç içermeyen son kuyucuk ise mikroorganizma kontrol kuyucuğu olarak kullanılmıştır.

3. Antifungal duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi

Gradient Test (E-test)'in değerlendirilmesi: Duyarlılık testleri 35°C'de 24-48 saat inkübasyonun ardından değerlendirilmiştir. Üremenin yavaş olduğu bazı nadir *Aspergillus spp.* türleri de 48 saat 35°C'de ve ilave olarak 48 saatte 25°C'de inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Oluşan elips üzerinde üremenin inhibe olduğu MİK değerleri okunarak, **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'de belirtilen revize edilmiş EUCAST klinik sınır değerleri kullanılarak yorumlanmıştır. *Aspergillus spp.* türlerinde azol MIC'leri görsel okuma ile belirlenmiştir.

Gradient test yöntemiyle yapılan antifungal duyarlılık testleri *A. fumigatus* complex, *A. flavus* ve *A. niger* için 24. ve 48. saatte, *Aspergillus spp.* ve *A. terreus* için 48. saatte, üremenin yavaş olduğu bazı nadir *Aspergillus spp.* türleri için 72 saatte değerlendirilmiştir.

Agar tarama plak yönteminin değerlendirilmesi: Plaklar, 35°C'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında incelenmiştir. Posakonazol, itrakonazol ve vorikonazol içeren tarama plaklarındaki ve kontrol plağındaki üremeler var-yok diye değerlendirilmiştir. İtrakonazol ve vorikonazol ve posakonazol plaklarındaki üremeler, ilgili ilaca direnç olarak yorumlanmıştır. Değerlendirmeler yapılırken; gradient testin sonuçları ile agar tarama plak yönteminin sonuçları karşılaştırılmıştır.

Mikrodilüsyon yönteminin değerlendirilmesi: 35 °C'de inkübe edilen mikropalaklar, 24 ve 48 saatte değerlendirilmiştir. Mikroorganizma kontrolünde (son kuyucuk) üreme olduğu ve besiyeri kontrolünde (sondan bir önceki kuyucuk) üreme olmadığı tespit edildikten sonra, MİK değerleri CLSI M38-A2 mikrodilüsyon standart yöntemi ile belirlenmiştir. 48 saat sonunda antifungal içermeyen kontrol kuyucuğundaki üreme yoğunluğu ile karşılaştırıldığında, test edilen kökenin (Posakonazol, itrakonazol ve vorikonazol için) üremesinin inhibe olduğu kuyucuktaki bulanıklığı belirgin azaltan en düşük ilaç konsantrasyonu (gözle görülebilir büyümeyi engelleyen) MİK değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonra her antifungal için incelenen izolatlarda MİK50 ve MİK90 değerleri hesaplanmıştır. İzolatların %50'sini inhibe eden en düşük antifungal konsantrasyonu MİK50, %90'nını inhibe eden en düşük konsantrasyon ise MİK90

olarak tanımlanmıştır. Herhangi bir azol MİK değerinin direnç sınır değerinde veya üzerinde bulunması durumunda, antifungal duyarlılık testi doğrulama amacıyla tekrar edilmiştir.

Antifungal duyarlılık testlerini kontrol amacıyla CLSI M38-A tarafından önerilen ve MİK aralıkları bilinen *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida krusei* ATCC 6258 kökenleri kontrol kökenleri olarak kullanılmıştır.

F. Azol Direnci Belirlenen *Aspergillus spp.* İzolatlarının DNA Dizi Analizi İle Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmamızda azol direnci belirlenen klinik *Aspergillus* kökenleri tür düzeyinde tanımlamak için DNA dizi analizi yapılmıştır. Deney akışının aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. İzolasyon
2. ITS primerleri ile PCR
3. Jel elektroforezi
4. Sanger ile Dizileme

• İzolatların Tanımlanmasında Kullanılan Materyaller

1. Kullanılan Ticari Kitler

- 1.1.1. MicroLine Genomik DNA Ekstraksiyon (MicroLine, TR) kiti
- 1.1.2. MicroLine Master Mix Ready to Load with 12.5 mM MgCl₂, 5x PCR Kiti (MicroLine, TR)

2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- 2.1.1. ITS1-F (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') primeri
- 2.1.2. ITS4-R (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') primeri
- 2.1.3. Agaroz (Biomax, Türkiye)
- 2.1.4. 10X Tris-borat (TBE) tamponu (Wisent Inc., Kanada)
- 2.1.5. SafeGel red stain jel boyası 500 µl (GENAXXON bioscience, Almanya)

2.1.6. 6X DNA Loading Dye 1 mL (Yükleme boyası) (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD)

2.1.7. Canvax 100-1000 bp DNA Ladder (Canvax, UK)

3. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Vorteks karıştırıcı (DigitMex Instruments Ltd, Çin)

3.1.2. Santrifüj (Andreas Hettich GmbH & Co., Almanya)

3.1.3. Isı bloğu (Benchmark Scientific, ABD)

3.1.4. 10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik otomatik pipetler (Corning, ABD)

3.1.5. The SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, ABD) PCR cihazı

4. Cam ve Plastik Malzemeler

4.1.1. 2 ml plastik Eppendorf tüpleri (Axygen Scientific Inc., ABD)

4.1.2. 1,5 ml plastik mikrosantrifüj tüpleri (Axygen Scientific Inc., ABD)

4.1.3. 10 µl'lik steril pipet uçları (Microcult, Çin)

4.1.4. 20 µl'lik steril pipet uçları (Microcult, Çin)

4.1.5. 1000 µl'lik steril pipet uçları (Microcult, Çin)

1. DNA İzolasyon Yöntemi

Örneklerden DNA izolasyonu için ticari MicroLine Genomik DNA Ekstraksiyon (MicroLine, TR) kiti, üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. 8 *Aspergillus spp.* örneği, SDA besiyerinden tek kullanımlık steril öze yardımı ile alınarak 2 ml eppendorflar içerisindeki 500 µl distile su içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra tüp içerisine 400 µl Lizis Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklenerek 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüplere, 400 µl Binding Buffer eklenerek 15 saniye vortekslenmiştir. Tüp içerisindeki karışımdan 800 µl spin kolonlarına aktarılmış ve 10,000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Tüpün dibindeki sıvı atılmış ve spin kolonları yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. Spin kolonlara 500 µl Wash Buffer I eklenmiş ve 10,000

rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Tüp dibinde kalan sıvı atılmış ve spin kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirmiştir. 750 µl Wash Buffer II spin kolonlarına eklenmiş ve 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpün dibinde kalan sıvı atılmış ve bu adım tekrarlanmıştır. İkinci yıkamadan sonra spin kolonları 3 dakika boyunca 10,000 rpm'de kalan alkolün uzaklaştırılması için tekrar santrifüjlenmiştir. Spin kolonları 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiş ve spin kolonların tam ortasına olmak koşulu ile 200 µl Elüsyon Buffer eklenmiş ve oda ısısında 1 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Spin kolonları 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve tüpün dibinde kalan ve DNA içeren sıvı PCR yöntemi için hazırlanmak üzere saklanmıştır.

2. . PCR Protokolü

Aspergillus spp. örnekleri, ticari olarak hazır MicroLine Master Mix Ready to Load with 12.5 mM MgCl₂, 5x PCR Kiti (MicroLine, TR) kullanılarak PCR ile incelemesi yapılmıştır. PCR aşamasında üretici firmanın talimatları izlenerek ITS1-F (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') ve ITS4-R (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') primerleri (Sentromer DNA Technologies LLC, USA) kullanılarak hedef gen bölgeleri amplifiye edilmiştir. PCR yönteminde kullanılacak bütün primerler liyofilize halde iken üretici firmanın yönlendirmeleri ile uygun miktarlarda sulandırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. PCR reaksiyon karışımı üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Her *Aspergillus spp.* örneği için; 8 µl MicroLine Master Mix Ready to Load (5x), 1 µl ITS1 Forward primeri, 1 µl ITS4 Reverse primeri ve 5 µl izole DNA, PCR reaksiyon tüpünde karıştırılmış ve 5 µl su eklenerek reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra ticari kitte tavsiye edilen PCR şartlarına göre PCR cihazı hazırlanarak örnekler cihaza yüklenmiştir. The SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, ABD) cihazında PCR koşulları şu şekilde ayarlanmıştır:

Çizelge 8. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç PCR aktivasyonu	95 °C	3 dakika	
Döngüler	94 °C	45 saniye	40 döngü
Denatürasyon	57 °C	1 dakika	
Primer bağlanması	72 °C	1 dakika	
Uzama			
Son uzama	72 °C	10 dakika	

3. Jel Elektroforezi

Agaroz jeli hazırlamak için Erlenmeyer flask içerisine 135 ml distile su içerisine 15 ml TBE buffer ve 2 gr agaroz konulmuştur. Karışımın homojen bir hal alması için mikrodalgada 5 dakika boyunca çözdürülmüştür. Sıcaklık 50-55°C'ye geldiğinde 5 µl SafeGel red stain jel boyası eklenmiştir. Yatay elektroforez aletinin kenarları kapatılmış özel jel yatağına sızıntı olmamasına dikkat edilerek karışım dökülmüştür. Cepleri oluşturacak taraklar hazneye yerleştirilmiş ve jel oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Donma gerçekleşince taraklar dikkatlice çıkartılmış ve jel, içinde 100 ml TBE buffer ve 900 ml distile su kullanılarak hazırlanan tamponun bulunduğu elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jeldeki ceplerden ilk kuyucuğa 2 µl olacak şekilde bant uzunlukları bilinen ticari olarak hazır standart DNA ladder yüklenmiştir. Geri kalan kuyucuklara parafilm üzerinde 1 µl yükleme boyası ile karıştırılmış 5 µl PCR DNA ürünleri yüklenmiştir. Jel 40 dakika boyunca 120 V ve 150 mA akım geçirilerek DNA fragmentleri yürütülmüştür. Bu süre sonunda UV ışık altında 600 fg bant gözlenen örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4. Sanger Dizileme Protokolü

Dizilemesi yapılan PCR ürünleri için ilk olarak PCR Cleanup aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada dizilemede kullanılan örneklerin, PCR reaksiyonundan arta kalan primerlerden ve dNTP'lerden arındırılması sağlanmıştır. Bu amaçla ADS Exo-Alp PCR Cleanup Mix kiti kullanılmıştır. Çalışma için cleanup yapılan örnekten 5 ul alınıp yeni bir PCR tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 2 ul ADS Exo-Alp PCR Cleanup Mix eklenmiştir. Tüp kapatılıp vortekslenmiştir. Ardından termal cyclus'a yerleştirilmiştir. 37 °C'de 15 dakika, ardından 80 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamanın ardından elde edilen ürün sekans PCR'da kullanılmıştır.

Sekans PCR'ında ADS SupreDye™ Cycle Sequencing Kit ve ADS 5X Sequencing Buffer kullanılmıştır. Kit, kalıp DNA ve primer haricinde sekans için gerekli olan malzemelerin tamamını içermektedir. Kalıp DNA olarak Exo-Alp reaksiyonundan gelen ürün kullanılmıştır. Reaksiyonun içeriği aşağıda belirtilmiştir:

Çizelge 9. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR ile amplifikasyonu için kullanılan bileşen miktarları

Bileşenler	Miktarlar (ul)
SupreDye	1
ADS5X Sequencing Buffer	1.5
Primer (1 uM)	3.2
Distile Su	2.3
Template	2
Toplam hacim	10

PCR tüpü içerisinde reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra termal cycler'a yerleştirilmiştir. Sekans PCR'ı için kullanılacak protokol aşağıda belirtilmiştir:

Çizelge 10. *Aspergillus spp.* izolatlarında PCR ile amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri

Sıcaklık	Süre	Döngü
96 °C	1 dk	1
96 °C	10 s	30
50 °C	5 s	
60 °C	4 dk	
4 °C	∞	-

Sekans PCR'ı bittiğinde örnekler cihaza yüklenmeden önce, cleanup aşaması gerçekleştirilmiştir. Sekans PCR reaksiyonundan kalan kontaminantlar (florasan boyalar, tuzlar, dNTP, primer ve enzim) bu aşamada temizlenmiştir. Çalışmamızda ADS Sequencing Reaction Cleaning Beads kullanılmıştır. Çalışma basamakları aşağıda belirtilmiştir:

1. Yıkama solüsyonu olarak %85 etanol hazırlanmıştır.
2. Sekans PCR ürününden 10 ul alınır, üzerine 10 ul 1x Manyetik boncuk eklenmiştir.
3. 45 ul yıkama solüsyonu eklenmiştir.

4. Karıştırıp 5 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır.
5. Plate, manyetik rack üzerine yerleştirilip 2 dakika bırakılmıştır.
6. Plate, manyetik rack'ten ayrılmadan ters çevrilip sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.
7. 100 ul yıkama solüsyonu eklenmiştir.
8. Plate, manyetik rack'ten ayrılmadan ters çevrilip sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.
9. Yedi ve sekizinci basamaklar bir kez daha tekrarlanmıştır.
10. 45-65 ul deionize su veya ADS elüsyon buffer eklenmiştir.
11. Karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

G. Cyp51A Genindeki Mutasyonların Belirlenmesi

Çalışmamızda azol direncinden en fazla sorumlu olan cyp51A genindeki mutasyonları saptamak amacıyla sırasıyla aşağıdaki uygulamalar yapılmıştır.

- **Cyp51A Genindeki Mutasyonların Belirlenmesinde Kullanılan Materyaller**

1. Kullanılan Ticari Kitler

- 1.1. MicroLine Genomik DNA Ekstraksiyon (MicroLine, TR) kiti

- 1.2. MicroLine qPCR SYBR Green Master Mix (2x) (MicroLine, TR) kiti

2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- 2.1. CypA-L98H-F (5'-AAAAAACCACAGTCTACCTGG-3') primeri

- 2.2. CypA-L98H-R (5'-GGAATTGGGACAATCATAAC-3') primeri

- 2.3. CypA-M220-F (5'-GCCAGGAAGTTCGTTCCAA-3') primeri

- 2.4. CypA-M220-R (5'-CTGATTGATGATGTCAACGTA-3') primeri

3. Kullanılan Cihazlar

- 3.1. Vorteks karıştırıcı (DigitMex Instruments Ltd)

- 3.2. Santrifüj (Andreas Hettich GmbH & Co.)

3.3. Isı bloğu (Benchmark Scientific)

3.4. 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik otomatik pipetler (Corning)

3.5. Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems, Australia) Real-Time PCR cihazı

4. Cam ve Plastik Malzemeler

4.1. 2 ml plastik Eppendorf tüpleri (Axygen Scientific Inc.)

4.2. 1,5 ml plastik mikrosantrifüj tüpleri (Axygen Scientific Inc.)

4.3. 10 µl'lik steril pipet uçları (Axygen Scientific Inc.)

4.4. 20 µl'lik steril pipet uçları (Axygen Scientific Inc.)

4.5. 1000 µl'lik steril pipet uçları (Axygen Scientific Inc.)

1. PCR Protokolü

Aspergillus spp. örneğinde, MicroLine qPCR SYBR Green Master Mix (2x) (MicroLine, TR) ticari kiti kullanılmış ve gerçek zamanlı PCR ile direnç genlerinin varlığı incelenmiştir. PCR aşamasında üretici firmanın talimatları doğrultusunda;

- CypA-L98H-F (5'-AAAAAACCACAGTCTACCTGG-3') ve
- CypA-L98H-R (5'-GGAATTGGGACAATCATAACAC-3'),
- CypA-M220-F (5'-GCCAGGAAGTTCGTTCCAA-3') ve
- CypA-M220-R (5'-CTGATTGATGATGTCAACGTA-3')

primerleri (Sentromer DNA Technologies LLC, USA) kullanılarak hedef gen bölgeleri amplifiye edilmiştir. PCR yönteminde kullanılan bütün primerler liyofilize halde iken üretici firmanın yönlendirmeleri ile uygun miktarlarda sulandırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. PCR yönteminin optimal sonuçlar vermesi için MicroLine qPCR SYBR Green Master Mix (2x) kitinin üretici firmasının talimatları gereği her bir primerden 10 µl alınarak, 90 µl distile su ile konsantrasyonları ayarlanmıştır. Her bir hedef gen bölgesi için 10 µl MicroLine qPCR SYBR Green Master Mix (2x), 1 µl Forward primer ve 1 µl Reverse primer, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 5 µl izole örnek DNA'sı reaksiyon tüplerine eklenerek Real-Time PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her

primer, tüm örnekler için bu şartları taşıyacak şekilde hazırlanmıştır. Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems, Australia) cihazında PCR şartları Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.'deki gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 11. *Aspergillus spp.* için uygulanan Mic qPCR Cycler cihazındaki PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç PCR aktivasyonu	95 °C	3 dakika	
Döngüler	94 °C	45 saniye	40 döngü
Denatürasyon			
Primer bağlanması	57 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	
Erime eğrisi analizi	72 – 95 °C	0,3 °C aralıklarla artışta her 1 saniyede okuma	

Çizelge 12. *Aspergillus spp.* izolatlarında azol direncinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Çoğalttığı Gen Bölgesi	Bağlanma Sıcaklığı (Tm)	Amplikon Uzunluğu (bp)
CypA-L98H-F	5'-AAAAAACCACAGTCTACCTGG-3'	<i>L98H</i>	57°C	143
CypA-L98H-R	5'-GGAATTGGGACAATCATAAC-3'	<i>L98H</i>	57°C	
CypA-M220-F	5'-GCCAGGAAGTTCGTTCCAA-3'	<i>M220</i>	57°C	173
CypA-M220-R	5'-CTGATTGATGATGTCAACGTA-3'	<i>M220</i>	57°C	

Syber Green ile boyanan mutasyon bölgesine sahip olan numuneler, amplifikasyon eğrisi ile oluşan ct ve melt curve eğrisiyle oluşan grafiklere göre pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hiçbir ışımaya olmayan numunelerde nokta mutasyon saptanmadı diye değerlendirilmiştir.

H. İstatistik Analiz

Çalışmamızda azol grubu antifungallere direnci tespit edebilme açısından agar plak tarama yönteminin gradient test yöntemine göre duyarlılık ve özgüllük değerleri aşağıdaki tabloya göre hesaplanmıştır.

Çizelge 13. İstatiksel parametrelerin hesaplanma yöntemi

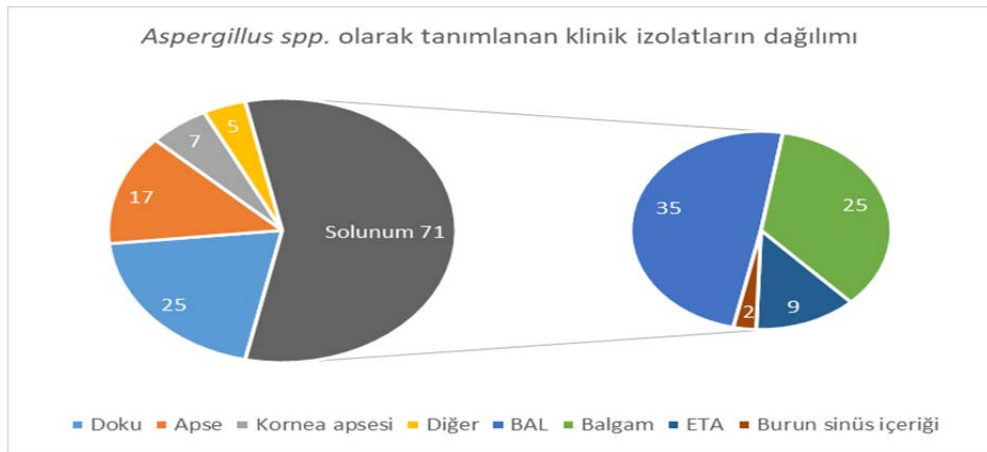
Agar plak yöntemi	Gradient test yöntemi		Toplam
	R	S	
R	a	b	a+b
S	c	d	c+d
Toplam	a+c	b+d	a+b+c+d

Duyarlılık: $(a/a+c) \times 100$ ve Özgüllük: $(d/b+d) \times 100$.

IV. BULGULAR

A. Çalışmaya Dahil Edilen *Aspergillus spp.* İzolatların Özellikleri

Çalışmamız; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Mikoloji Laboratuvarı'nda 2015-2021 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden (apse, kornea apsesi, biopsi, doku ve solunum örnekleri) izole edilerek *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış, -80°C'de saklanmış olan toplam 125 adet *Aspergillus spp.* izolatu ile yürütülmüştür. Çalışmaya alınan 125 izolattan 71'inin (%56,8) erkek, 54'ünün (%43,2) kadın hastaya ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca izolatların 27 tanesinin çocuk hastadan (%21,6), 98 tanesinin erişkin hastadan (%78,4) izole edildiği saptanmış, hastaların yaşlarının 3-82 arasında olup yaş ortalamasının 44 olduğu belirlenmiştir. *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan 125 izolatu, %56,8'inin (71) solunum yolu (bronkoalveoler lavaj (BAL), endotrakeal aspirasyon (ETA), balgam ve burun sinüs içeriği gibi), %20'sinin (25) doku, %13,6'sının (17) apse, %5,6'sının (7) kornea apsesi ve %4'ünün (5) diğer örneklerden (bos, plevra gibi vücut sıvıları, kateter vs.) izole edildiği saptanmıştır. Şekil 5'te çalışmaya dahil edilen *Aspergillus spp.* izolatlarının üretildiği klinik örneklerin dağılımı verilmiştir.

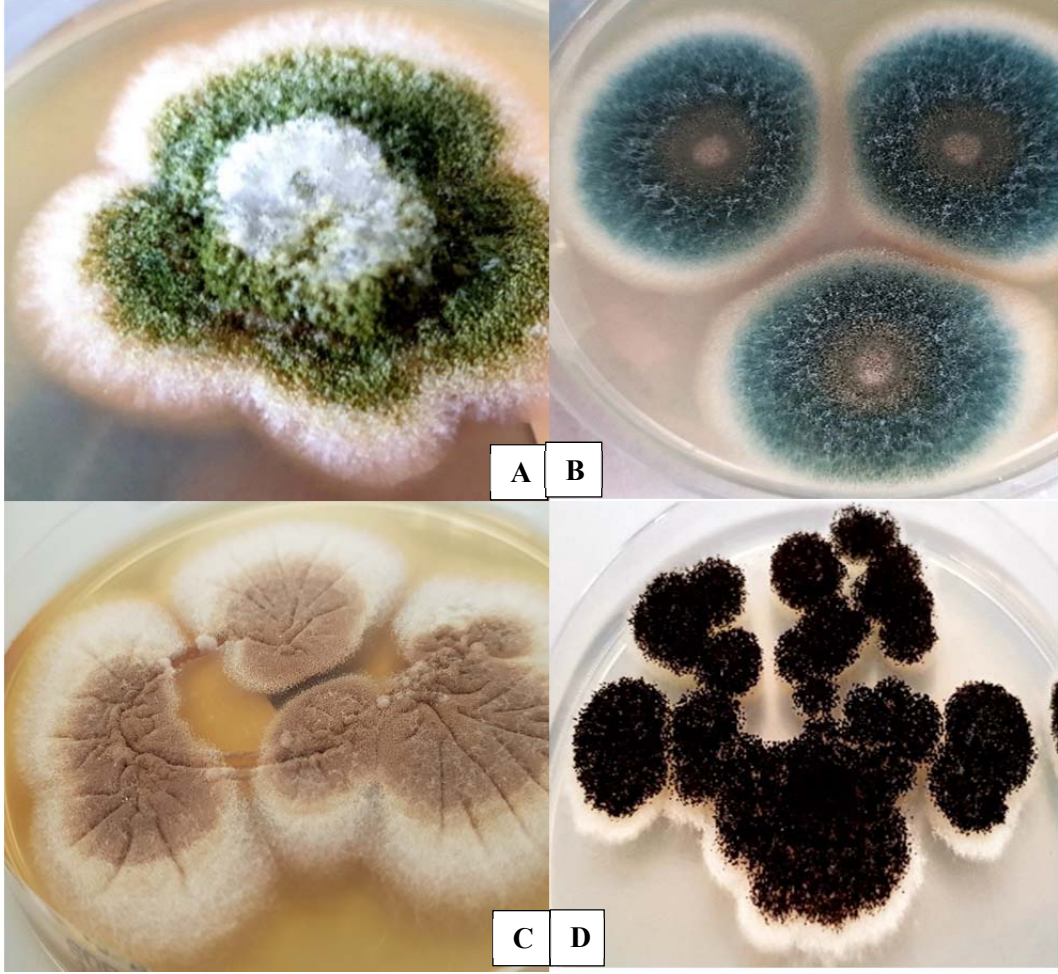


Şekil 5. Çalışmaya dahil edilen *Aspergillus spp.* izolatlarının üretildiği klinik örneklerin dağılımı

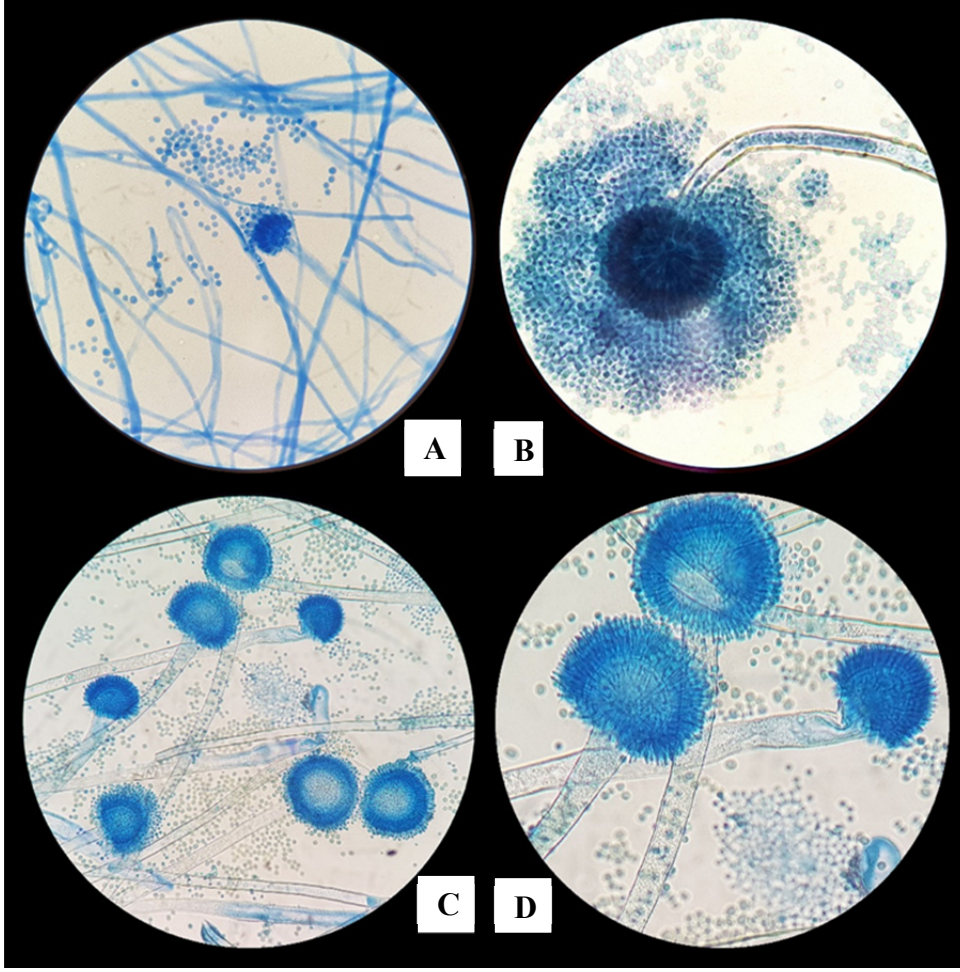
B. Konvansiyonel Yöntemler İle Tanımlanan *Aspergillus spp.* Türleri

Çalışmamızda *Aspergillus spp.* izolatlarının PDA besiyerinde üreyen kolonileri özellikle perifer kısmını da kapsayacak şekilde mikroskopik olarak değerlendirildiğinde; bölmeli hiplere 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 tanımlanmıştır.

Çalışmamızda 125 izolattan 107 izolat (%85,6) konvansiyonel yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanmış olup, 18 (%14,4) izolat konvansiyonel yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanamayıp *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmıştır. *Aspergillus spp.* izolatlarının SDA besiyerinde üreyen kolonileri morfolojik özellikleri açısından makroskopik olarak ve PDA besiyerinde üreyen kolonileri mikroskopik olarak değerlendirildiğinde; kolonileri mavi-yeşil renkte süet benzeri yüzeye sahip olanlar ve mikroskopik görünümünde konidyoforları kısa, düz olup konidyoforlardan çıkan fiyalidler tek sıralı ve vezikülün üst 2/3'ünü kaplayacak şekilde olanlar 55 (%44) adet olup *A. fumigatus* olarak tanımlanmıştır. SDA besiyerinde kolonileri önce beyaz-sarı sonrasında yeşil renkte olanlar ve mikroskopik görünümünde konidyoforları düzensiz, çukurlu veya dikenli yapıda olup konidyofordan çıkan fiyalidleri tek veya iki sıralı şekilde vezikülün tamamını kaplayacak şekilde olanlar 42 (%33,6) adet olup *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Makroskopik görünümünde kolonileri kum-kahverengi, tarçın renginde süet benzeri yüzeye sahip olanlar ve mikroskopide konidyoforları kısa, düz olup fiyalidleri iki sıralı, vezikülü kolumnar şekilde kaplayanlar 6 (%4,8) adet olup *A. terreus* olarak tanımlanmıştır. SDA besiyerinde kolonileri makroskopik olarak perifer beyaz siyah renkte olanlar ve mikroskopik olarak konidyoforları uzun, düzgün, konidyumlar kahverengimsi siyah renkte ve tüm vezikülün etrafını kaplayacak şekilde olanlar 4 (%3,2) adet olup *A. niger* olarak tanımlanmıştır (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**). Şekil 6'da farklı *Aspergillus spp.* türlerinin SDA besiyerinde koloni görünümü gösterilmiştir. Şekil 7'de çalışmamızda tanımlanmış olan çeşitli *Aspergillus spp.* türlerinin mikroskopik görünümleri laktofenol pamuk mavisi ile gösterilmiştir.



Şekil 6. SDA besiyerinde farklı tipte *Aspergillus spp.* türlerinin koloni görünümü
(A: *A. flavus*, B: *A. fumigatus*, C: *A. terreus*, D: *A. niger*)

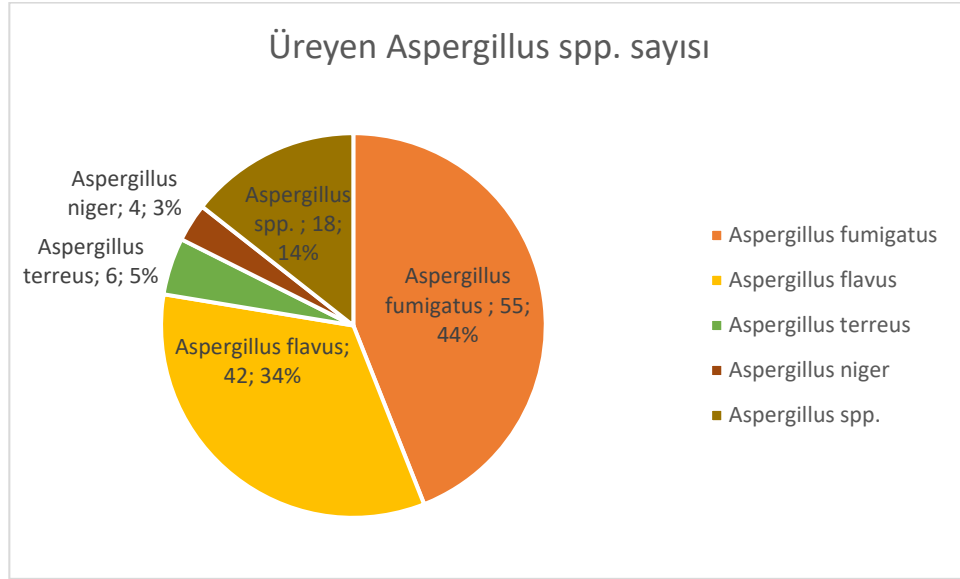


Şekil 7. *Aspergillus spp.* türlerinin Laktofenol pamuk mavisi (Lactophenol Cotton Blue) ile mikroskopik görünümü (A: *Aspergillus spp.*, B: *A. niger*, C: *A. fumigatus*, D: *A. flavus*, Çalışmadan, 40x)

Makroskobik ve mikroskopik morfolojik özellikleri ile *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış izolatların termotolerans testinde; 55 adet *A. fumigatus* complex'de 45°C'de üreme gözlenmiştir. 42 adet *A. flavus* ve 18 adet *Aspergillus spp.* 45°C'de üreme gözlenmemiştir. 6 adet *A. terreus* ve 4 adet *A. niger*'de genel olarak 45°C'de üreme gözlenmesine rağmen, bu türlerde farklı sıcaklıklarda üreme özelliği değişkenlik göstermiştir. *A. terreus* olarak tanımlanan H64'de ve *A. niger* olarak tanımlanan 3 izolatta (H29, H111 VE H16) 45°C'de üreme gözlenmiş, diğer 5 adet *A. terreus* ve 1 adet *A. niger*'de (H97) 45°C'de üreme gözlenmemiştir.

Çalışmamızda; 55 adet *A. fumigatus* complex (%44), 42 adet *A. flavus* (%33,6), 6 adet *A. terreus* (%5), 4 adet *A. niger* (%3) ve 18 adet *Aspergillus spp.* (%14) olmak üzere toplam 125 *Aspergillus* türü tanımlanmıştır. Çalışmaya

konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *Aspergillus spp.* türlerinin dağılımı Şekil 8’de verilmiştir.



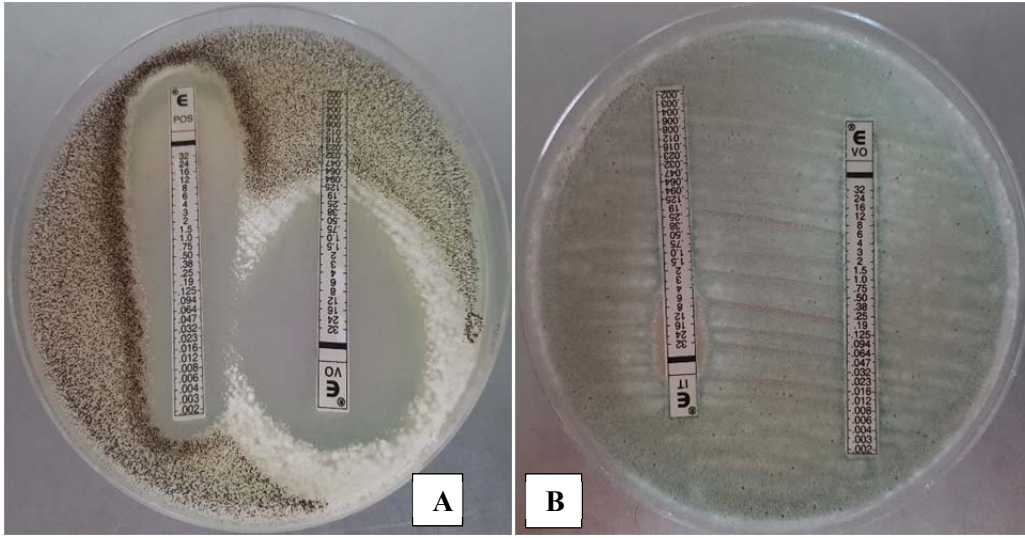
Şekil 8. Çalışmada konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *Aspergillus spp.* türlerinin dağılımı

C. *Aspergillus spp.* İzolatlarında Antifungal Duyarlılık Testleri ile Saptanan Azol Duyarlılık Sonuçları

Aspergillus spp. olarak tanımlanmış olan izolatların azol grubuna (vorikonazol, itrakonazol ve posakonazol) duyarlılık testleri gradient test (E-test) ve agar plak yöntemi ile yapılmıştır. Azol grubu antifungallere karşı gradient test ve agar plak yöntemiyle direnç belirlenen izolatlara, doğrulama amacıyla broth mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal duyarlılık testleri yapılmıştır. Gradient testte *Aspergillus spp.* için, EUCAST (EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 ve E.Def 11.0) prosedürlerini kullanan antifungal ECOFF'lar ve duyarlılıklar klinik sınır değerleri kullanılarak yorumlanmıştır. EUCAST rehberlerinin son düzenlemelerinde (Version 3.0, 2022-01-18); *A. fumigatus*'un ITR ve VOR'e ait direnç sınır değeri 2 µg/ml'den 1 µg/ml olarak revize edilmiştir. *A. flavus* ve *A. terreus*'un ITR'e ait direnç sınır değeri 2 µg/ml'den 1 µg/ml olarak revize edilmiştir.

***Aspergillus spp.* İzolatlarının Gradient Test Yöntemine Göre Duyarlılık Sonuçları**

Çalışmamızda elde ettiğimiz Gradient Test (E-test) sonuçlarına göre; çalışmaya dahil edilen 125 *Aspergillus spp.* izolatında VOR, ITR, POS için MİK değerlerinin aralığı, VOR; 0.023 - >32 µg/ml, ITR; 0.125 – 4 µg/ml, POS; 0.002 – 0.75 µg/ml olarak belirlenmiş olup, 8 (% 6,4) izolatta VOR, ITR, POS için MİK değerleri yüksek saptanmıştır. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 122 izolatta ≤1µg/ml (H64: 1 µg/ml), 1 izolatta 1-2 µg/ml aralığında (H23: 1,5 µg/ml), 2 izolatta ≥2 µg/ml (H3 ve H24), ITR için; 118 izolatta ≤1µg/ml (6 izolat: 1 µg/ml), 4 izolatta 1-2 µg/ml aralığında, 3 izolatta ≥2 µg/ml, POS için; 120 izolatta ≤0,125µg/ml, 2 izolatta 0,25µg/ml, 3 izolatta >0,25 µg/ml tespit edilmiştir. *Aspergillus spp.* izolatlarına gradient test yönteminin uygulandığı plaklar Şekil 9’da gösterilmiştir. Gradient test yöntemi ile MİK değerleri dirençli/yüksek saptanan izolatlar Çizelge 14’te verilmiştir.



Şekil 9. *Aspergillus spp.* izolatlarına uygulanan gradient test yöntemi plakları (A: *A.niger*'de duyarlı bulunan POS ve VOR, B: *A. fumigatus*'ta dirençli bulunan ITR ve VOR)

Çizelge 14. Gradient test yöntemi ile MİK değerleri dirençli/yüksek saptanan izolatlar

Numune No	Numune Türü	Organizma	E-TEST		
			VORICONAZOL	ITRAKONAZOL	POSACONAZOL
H 17	Doku	<i>ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP</i>	0,25	1,5	0,25
H 24	Doku	<i>ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP</i>	>32	4	0,75
H 72	ETA	<i>ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP</i>	0,125	1,5	0,094
H 64	Balgam	<i>ASPERGİLLUS TERREUS</i>	1	1	0,19
H 29	Doku	<i>ASPERGİLLUS NİGER</i>	0,38	2	0,012
H 3	Kornea Apsesi	<i>ASPERGİLLUS SPP.</i>	>32	4	0,5
H 23	Doku	<i>ASPERGİLLUS SPP.</i>	1,5	0,75	8

(ETA: Endotrakeal Aspirasyon)

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 55 *A. fumigatus* izolatında VOR, ITZ ve POS için gradient test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin aralığı incelendiğinde; sırasıyla 0.032 - >32 µg/ml, 0.19 – 4 µg/ml ve <0.002 – 0.75 µg/ml olduğu görülmüştür. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 54 izolatta ≤1µg/ml, 1 izolatta ≥2 µg/ml (H24: >32 µg/ml) tespit edilirken, 1-2 µg/ml aralığında MİK değerine sahip izolat tespit edilmemiştir. ITR için; 52 izolatta ≤1µg/ml (H8, H59, H86, H90, H106: 1 µg/ml), 2 izolatta 1-2 µg/ml aralığında (H17 ve H72: 1,5 µg/ml), 1 izolatta ≥2 µg/ml (H24: 4 µg/ml) tespit edilmiştir. POS için; 53 izolatta ≤0,125µg/ml, 1 izolatta 0,25 µg/ml (H17), 1 izolatta >0,25 (H24: 0,75 µg/ml) tespit edilmiştir. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri EUCAST rehberlerine göre değerlendirildiğinde; 55 *A. fumigatus* izolatından 1'inde (%1,8) (H24) VOR'e direnç, 3'ünde (%5,45) (H17, H24 ve H72) ITR'e direnç, 1'inde (%1,8) (H24) POS'e direnç tespit edilmiştir. 55 adet *A. fumigatus* izolatından ITR'e direnç saptanan H24 izolatında VOR'e (>32 µg/ml) ve POS'e (0,75 µg/ml) de direnç gözlenerek tüm azollere dirençli olduğu belirlenmiştir (Şekil 9). ITR için yüksek MİK değeri tespit edilen 1 izolatta (H17) POS'e 0,25µ/ml ile sınırdaki MİK değeri saptanmıştır. Gradient test ile belirlenen MİK değerlerine göre diğer *A. fumigatus* izolatlarının VOR, ITR ve POS'e duyarlı olduğu tespit

edilmiştir. *A. fumigatus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 18’de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 42 *A. flavus* izolatında VOR, ITZ ve POS için gradient test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin aralığı incelendiğinde; sırasıyla 0.047 – 0.75 µg/ml, 0.125 – 1 µg/ml ve <0.002 – 0.19 µg/ml olduğu görülmüştür. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 42 izolatta ≤1µg/ml, ITR için; 42 izolatta ≤1µg/ml, POS için; 41 izolatta ≤0,125µg/ml, 1 izolatta 0,25µg/ml (H96) tespit edilmiştir. İzolatlar gradient test ile belirlenen MİK değerleri EUCAST rehberlerine göre değerlendirildiğinde; 42 *A. flavus* izolatında ITR için gradient test yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. *A. flavus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 18’de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 6 *A. terreus* izolatında VOR, ITZ ve POS için gradient test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin aralığı incelendiğinde; sırasıyla 0.023 – 1 µg/ml, 0.125 – 1 µg/ml ve 0.012 – 0.19 µg/ml olduğu görülmüştür. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 6 izolatta ≤1µg/ml (H64: 1 µg/ml) tespit edilirken, 1-2 µg/ml aralığında ve ≥2 µg/ml MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. ITR için; 6 izolatta ≤1µg/ml (H64: 1 µg/ml) tespit edilirken, 1-2 µg/ml aralığında ve ≥2 µg/ml MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. POS için; 6 izolatta ≤0,125µg/ml tespit edilirken, >0,25 µg/ml MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. İzolatlar gradient test ile belirlenen MİK değerleri EUCAST rehberlerine göre değerlendirildiğinde; 6 *A. terreus* izolatında ITR ve POS için gradient test yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. *A. terreus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 18’de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 4 *A. niger* izolatında VOR, ITZ ve POS için gradient test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin aralığı incelendiğinde; sırasıyla 0.094 – 0.5 µg/ml, 0.5 – 2 µg/ml ve 0.012 – 0.19 µg/ml olduğu görülmüştür. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 4 izolatta ≤1µg/ml tespit edilirken, 1-2 µg/ml aralığında veya ≥2 µg/ml MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. ITR için; 3 izolatta ≤1µg/ml, 1 izolatta ≥2 µg/ml (H29: 2 µg/ml) tespit edilirken, 1-2 µg/ml aralığında MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. POS için; 4

izolatta $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ tespit edilirken, $>0,25 \mu\text{g/ml}$ aralığında MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. *A. niger* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 18’de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tür tanımı yapılamayan 18 *Aspergillus spp.* izolatında VOR, ITZ ve POS için gradient test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin aralığı incelendiğinde; sırasıyla $0.032 - >32 \mu\text{g/ml}$, $0.047 - 4 \mu\text{g/ml}$ ve $<0.002 - 8 \mu\text{g/ml}$ olduğu görülmüştür. İzolatların gradient test ile belirlenen MİK değerleri incelendiğinde VOR için; 16 izolatta $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 1 izolatta $1-2 \mu\text{g/ml}$ aralığında (H23: $1,5 \mu\text{g/ml}$), 1 izolatta $>2 \mu\text{g/ml}$ (H3: $>32 \mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir. ITR için; 17 izolatta $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 1 izolatta $>2 \mu\text{g/ml}$ (H3: $4 \mu\text{g/ml}$) tespit edilirken, $1-2 \mu\text{g/ml}$ aralığında MİK değerine sahip izolat tespit edilememiştir. POS için; 16 izolatta $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$, 2 izolatta $>0,25 \mu\text{g/ml}$ (H3: $0,5 \mu\text{g/ml}$ ve H23: $8 \mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir. *Aspergillus spp.* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 18’de verilmiştir.

Çalışmamızda, *A. fumigatus* complex (n=55) türleri için gradient test yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla $0.19 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$, $0.094 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK90 değerleri ise sırasıyla $0.38 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $0.19 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. *A. fumigatus* izolatları için, MİK50 ve MİK90 değerleri karşılaştırıldığında azol grubu antifungallerden özellikle ITR karşı MİK değerlerinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. *A. fumigatus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri Çizelge 15’de verilmiştir.

Çalışmamızda, *A. flavus* complex (n=42) türleri için gradient test yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla $0.19 \mu\text{g/ml}$, $0.38 \mu\text{g/ml}$, $0.064 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK90 değerleri ise sırasıyla $0.38 \mu\text{g/ml}$, $0.75 \mu\text{g/ml}$, $0.125 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. *A. flavus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri Çizelge 15’de verilmiştir.

Çalışmamızda, *A. terreus* (n=6) türleri için gradient test yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla $0.064 \mu\text{g/ml}$, $0.19 \mu\text{g/ml}$, $0.032 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK90 değerleri ise sırasıyla $0.125 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$, $0.064 \mu\text{g/ml}$ olarak

bulunmuştur. *A. terreus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri Çizelge 15’de verilmiştir.

Çalışmamızda, *A. niger* (n=4) türleri için gradient test yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 0.19 µg/ml olarak bulunmuştur. VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK90 değerleri ise sırasıyla 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 0.19 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. niger* izolatlarının çalışmada saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri Çizelge 15’de verilmiştir.

Çalışmamızda, *Aspergillus spp.* (n=18) türleri için gradient test yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla 0.125 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.094 µg/ml olarak bulunmuştur. VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK90 değerleri ise sırasıyla 0.5 µg/ml, 0.75 µg/ml, 0.19 µg/ml olarak bulunmuştur. *Aspergillus spp.* izolatlarının çalışmada saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri Çizelge 15’de verilmiştir.

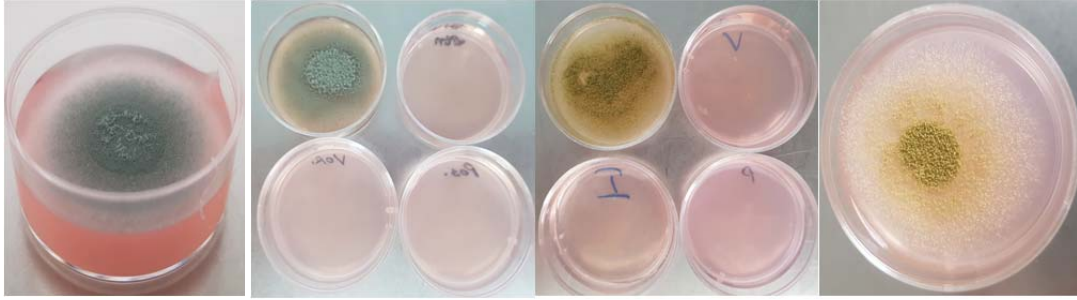
Çizelge 15. Çalışmada yer alan *Aspergillus spp.* izolatların antifungaller için in-vitro saptanan MİK50 ve MİK90 değerleri

	Antifungal	MİK aralığı (µg/mL)	MİK50 (µg/mL)	MİK90 (µg/mL)
<i>Aspergillus fumigatus</i> complex (n=55)	VOR	0,032 - >32	0,19 µg/ml	0,38 µg/ml
	ITR	0,19 - 4	0,5 µg/ml	1 µg/ml
	POS	<0,002 - 0,75	0,094 µg/ml	0,19 µg/ml
<i>Aspergillus flavus</i> complex (n=42)	VOR	0,047 - 0,75	0,19 µg/ml	0,38 µg/ml
	ITR	0,125 - 1	0,38 µg/ml	0,75 µg/ml
	POS	<0,002 - 0,19	0,064 µg/ml	0,125 µg/ml
<i>Aspergillus terreus</i> (n=6)	VOR	0,023 - 1	0,064 µg/ml	0,125 µg/ml
	ITR	0,125 - 1	0,19 µg/ml	0,5 µg/ml
	POS	0,012 - 0,19	0,032 µg/ml	0,064 µg/ml
<i>Aspergillus niger</i> (n=4)	VOR	0,094 - 0,5	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
	ITR	0,5 - 2	0,75 µg/ml	0,75 µg/ml
	POS	0,012 - 0,19	0,19 µg/ml	0,19 µg/ml
<i>Aspergillus spp.</i> (n=18)	VOR	0,032 - >32	0,125 µg/ml	0,5 µg/ml
	ITR	0,047 - 4	0,5 µg/ml	0,75 µg/ml
	POS	<0,002 - 8	0,094 µg/ml	0,19 µg/ml

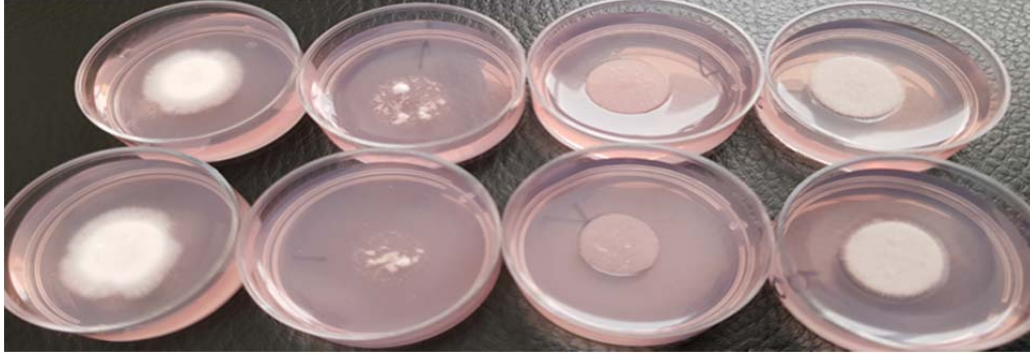
(*MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, VOR: Vorikonazol, ITR: Itrakonazol, POS: Posakonazol)

- ***Aspergillus spp.* İzolatlarının Agar Plak Yöntemine Göre Duyarlılık Sonuçları**

Çalışmamızda elde ettiğimiz azol grubu antifungaller için agar plak tarama yönteminin sonuçlarına göre; çalışmaya dahil edilen 125 *Aspergillus spp.* izolatında VOR, ITR ve POS içeren tarama plaklarındaki üreme direnç olarak belirlenmiştir. İzolatların agar tarama yöntemi ile belirlenen sonuçları incelendiğinde VOR için; 121 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 4 (% 3,2) izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. ITR için; 122 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 3 (%2,4) izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. POS için; 122 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 3 (%2,4) izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. *Aspergillus spp.* izolatlarına azol grubu antifungaller için uygulanan agar plak tarama yönteminin plakları Şekil 10’da gösterilmiştir. *Aspergillus spp.* izolatlarında agar plak tarama yöntemi ile direnç belirlenen izolata (H3) ait plaklar Şekil 11’de, pozitif kontrol plakları Şekil 12’de gösterilmiştir. Agar plak tarama yöntemi ile direnç saptanan izolatlar Çizelge 16’da verilmiştir.

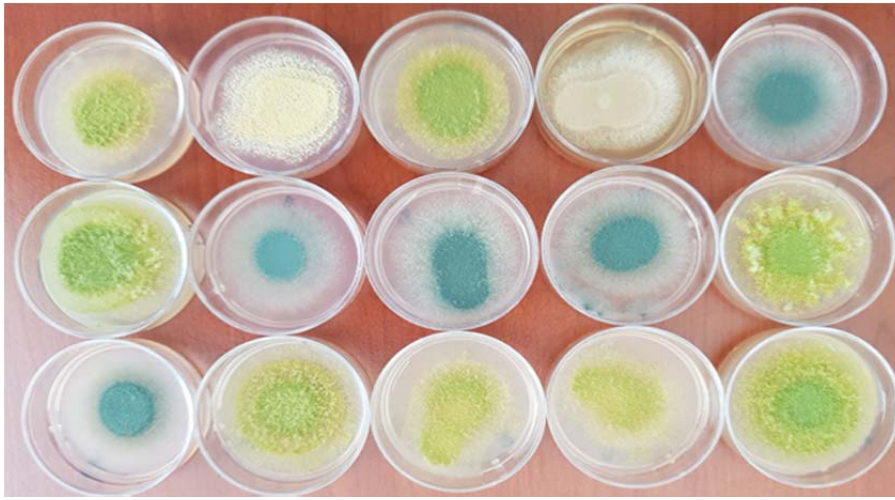


Şekil 10. *Aspergillus spp.* İzolatlarına azol grubu antifungaller için Uygulanan Agar Plak Tarama Yöntemi



Pozitif Kontrol Vorikonazol Itrakonazol Posakonazol

Şekil 11. *Aspergillus spp.* İzolatlarında Agar Plak Tarama Yöntemi ile Direnç Belirlenen Pozitif İzolat (H3)



Şekil 12. *Aspergillus spp.* İzolatlarına Uygulanan Agar Plak Tarama Yönteminde Pozitif Kontrol Plakları (*A. fumigatus*: gri renkte, *A. flavus*: yeşil renkte ve *A. terreus*: tarçın renğinde)

Çizelge 16. Agar plak tarama yöntemi ile direnç saptanan izolatlar

Numune No	Numune Türü	Organizma	AGAR PLAK		
			VORIKONAZOL	ITRAKONAZOL	POSAKONAZOL
H 24	Doku	<i>ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP</i>	R	R	R
H 64	Balgam	<i>ASPERGİLLUS TERREUS</i>	R	S	S
H 29	Doku	<i>ASPERGİLLUS NİGER</i>	S	R	S
H 3	Kornea Apsesi	<i>ASPERGİLLUS SPP.</i>	R	R	R
H 23	Doku	<i>ASPERGİLLUS SPP.</i>	R	S	R

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 55 *A. fumigatus* izolatında VOR, ITZ ve POS için agar tarama yönteminin sonuçları

incelendiğinde; 54 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmezken, 1 izolatta (H24) azol grubu antifungallerin (VOR, ITR, POS) olduğu petrilere üreme gözlenmiştir. İzolatların agar tarama yönteminin sonuçları değerlendirildiğinde; 55 *A. fumigatus* izolatından 1'inde (%1,8) (H24) VOR, ITR ve POS'de direnç ile tüm azollere direnç saptanırken, 54'ünün (%98,2) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *A. fumigatus* izolatlarının çalışmada saptanan agar tarama yönteminin sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 42 *A. flavus* izolatında VOR, ITZ ve POS için agar tarama yönteminin sonuçları incelendiğinde; VOR, ITR ve POS için; 42 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmemiştir. İzolatların agar tarama yönteminin sonuçları değerlendirildiğinde; 42 *A. flavus* izolatının VOR, ITR ve POS'e duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *A. flavus* izolatlarının çalışmada saptanan agar tarama yönteminin sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 6 *A. terreus* izolatında VOR, ITZ ve POS için agar tarama yönteminin sonuçları incelendiğinde; VOR için; 5 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmezken, 1 izolatta (H64) azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmiştir. ITR ve POS için; 6 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmemiştir. İzolatların agar tarama yönteminin sonuçları değerlendirildiğinde; 6 *A. terreus* izolatından 1'inde (%16,7) (H64) VOR'e direnç saptanırken, 5'inin (%83,3) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Agar tarama yönteminin sonuçları göre 6 *A. terreus* izolatlarının ITR ve POS'e duyarlı olduğu belirlenmiştir. *A. terreus* izolatlarının çalışmada saptanan agar tarama yönteminin sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan 4 *A. niger* izolatında VOR, ITZ ve POS için agar tarama yönteminin sonuçları incelendiğinde; VOR ve POS için; 4 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmemiştir. ITR için; 3 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmezken, 1 izolatta (H29) azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmiştir. İzolatların agar tarama yönteminin sonuçları değerlendirildiğinde; 4 *A. niger* izolatından 1'inde (%25) (H29) ITR'e direnç saptanırken, 3'ü (%75) duyarlı olarak tespit edilmiştir. Agar

tarama yönteminin sonuçlarına göre 4 *A. niger* izolatlarının VOR ve POS'e duyarlı olduğu belirlenmiştir. *A. niger* izolatlarının çalışmada saptanan agar tarama yönteminin sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tür tanımı yapılamayan 18 *Aspergillus spp.* izolatında VOR, ITZ ve POS için agar tarama yönteminin sonuçları incelendiğinde; VOR için; 16 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 2 izolatta (H3 ve H23) azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. ITR için; 17 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 1 izolatta (H3) azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. POS için; 16 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmezken, 2 izolatta (H3 ve H23) azol grubu antifungallerin olduğu petrilerde üreme gözlenmiştir. İzolatların agar tarama yönteminin sonuçları değerlendirildiğinde; 18 *Aspergillus spp.* izolatından 2'sinin (%11) (H3 ve H23) VOR ve POS'e dirençli olduğu saptanırken, 16'sının (%89) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. 18 *Aspergillus spp.* izolatından 1'inin (%5,6) ITR'e dirençli olduğu (H3) saptanırken, 17'sinin (%94,4) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yer alan *Aspergillus spp.* izolatlarından H3 izolatında VOR, ITR ve POS'e direnç ile tüm azollere direnç saptanırken, H23 izolatının VOR ve POS'e dirençli, ITR'e ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. *Aspergillus spp.* izolatlarının çalışmada saptanan agar tarama yönteminin sonuçları Çizelge 18'de verilmiştir.

- ***Aspergillus spp.* İzolatlarında Agar Plak ile Gradient Test Yöntemlerinin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırması**

EUCAST'in *A. fumigatus* kökenleri için önerdiği agar plak yöntemi, farklı *Aspergillus* türleri için denenmiş, hazırlanan VOR, ITR ve POS plaklarındaki üremeler, ilgili ilaca direnç olarak yorumlanmıştır. Çalışmamızda agar plak tarama yöntemi ile üreme saptadığımız 5 izolatın (H3, H23, H24, H29, H64) gradient test ile saptanan MİK değerleri; VOR için H64: 1 µg/ml, H23: 1,5 µg/ml, H3 ve H24: >32 µg/ml olarak, ITR için H3 ve H24: 4 µg/ml, H29: 2 µg/ml olarak, POS için H3: 0,5 µg/ml, H23: 8 µg/ml, ve H24: 0,75 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 17. Gradient test ve Agar plak yöntemi ile direnç saptanan izolatlar

Numune No	Numune Türü	Organizma	E-TEST			AGAR PLAK		
			VORICONAZO L	ITRAKONAZOL	POSACONAZO L	VORIKONAZO L	ITRAKONAZOL	POSACONAZO L
H 17	Doku	<i>ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP</i>	0,25	1,5	0,25	S	S	S
H 24	Doku	<i>ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP</i>	>32	4	0,75	R	R	R
H 72	ETA	<i>ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP</i>	0,125	1,5	0,094	S	S	S
H 64	Balgam	<i>ASPERGILLUS TERREUS</i>	1	1	0,19	R	S	S
H 29	Doku	<i>ASPERGILLUS NIGER</i>	0,38	2	0,012	S	R	S
H 3	Kornea	<i>ASPERGILLUS SPP.</i>	>32	4	0,5	R	R	R
H 23	Apsesi Doku	<i>ASPERGILLUS SPP.</i>	1,5	0,75	8	R	S	R

(ETA: Endotrakeal Aspirasyon)

Çalışmamızda yer alan *Aspergillus* türlerinin agar plak tarama yöntemi ile elde ettiğimiz verilerini ve gradient test ile belirlenen MİK değerlerini EUCAST sınır değerleri dikkate alınarak karşılaştırdığımızda; çalışmaya dahil edilen 55 *A. fumigatus* izolatında VOR için: agar plak tarama yöntemi ile 54 izolat duyarlı, 1 izolat (H24) dirençli tespit edilmiş, gradient test ile 54 izolat duyarlı, 1 izolat (H24) dirençli belirlenmiştir. ITR için; agar plak tarama yöntemi ile 54 izolat duyarlı, 1 izolat (H24) dirençli tespit edilmiş, gradient test ile 52 izolat duyarlı, 3 izolat (H17, H72, H24) dirençli belirlenmiştir. POS için; agar plak tarama yöntemi ile 54 izolat duyarlı, 1 izolat (H24) dirençli tespit edilmiş, gradient test ile 53 izolat duyarlı, 1 izolat 0,25 µg/ml, 1 izolat (H24) dirençli belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda agar plak tarama yönteminin *A. fumigatus* türlerinde duyarlılığı ve özgüllüğü VOR ve POS için %100, ITR için ise sırasıyla %33,3 ve %100 saptanmıştır.

Çalışmamızda 42 *A. flavus* izolatında agar plak tarama yöntemi ile elde edilen veriler gradient test ile karşılaştırıldığında; agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS için 42 izolatta azol grubu antifungallerin olduğu petrilere üreme gözlenmemiş ve duyarlı olduğu tespit edilmiştir. VOR için 42 izolatta gradient test yöntemi ile MİK değeri ≤1µg/ml, POS için 41 izolatta ≤0,125µg/ml, 1 izolatta 0,25µg/ml (H96) tespit edilmiştir. ITR ise 42 *A. flavus* izolatı EUCAST sınır değerlere göre gradient test yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda uyguladığımız agar plak tarama yönteminin *A. flavus* türlerinde ITR için duyarlılığı ve özgüllüğü %100 saptanmıştır.

Çalışmamızda 6 *A. terreus* izolatının agar plak tarama yöntemi ile elde edilen veriler gradient test ile karşılaştırıldığında; VOR için: agar plak tarama yöntemi ile 5 izolat duyarlı, 1 izolat (H64) dirençli tespit edilmiş, gradient test ile 6 izolatta MİK değeri $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (H64: $1 \mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir. ITR ve POS için; agar plak tarama yöntemi ve gradient test yöntemi ile 6 izolat duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda uyguladığımız agar plak tarama yönteminin *A. terreus* türlerinde ITR ve POS için duyarlılığı ve özgüllüğü %100 saptanmıştır.

Çalışmamızda 4 *A. niger* izolatında agar plak tarama yöntemi ile elde edilen veriler gradient test ile karşılaştırıldığında; VOR için agar plak tarama yöntemi ve gradient test yöntemi ile 4 izolat duyarlı bulunmuştur. ITR için agar plak tarama yöntemi ile 3 izolat duyarlı 1 izolat (H29) dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile 3 izolatta MİK değeri $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 1 izolatta $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (H29: $2 \mu\text{g/ml}$) saptanmıştır. POS için agar plak tarama yöntemi ile 4 izolat duyarlı tespit edilirken, gradient test yöntemi ile 4 izolatta MİK değeri $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ belirlenmiştir.

Çalışmamızda 18 *Aspergillus spp.* izolatında agar plak tarama yöntemi ile elde edilen veriler gradient test ile karşılaştırıldığında; VOR için: agar plak tarama yöntemi ile 16 izolat duyarlı, 2 izolat (H3 ve H23) dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değeri 16 izolatta $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 1 izolatta $1,5 \mu\text{g/ml}$ (H23) ve 1 izolatta $> 2 \mu\text{g/ml}$ (H3: $> 32 \mu\text{g/ml}$) saptanmıştır. ITR için; agar plak tarama yöntemi ile 17 izolat duyarlı, 1 izolat (H3) dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değeri 17 izolatta $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 1 izolatta $> 2 \mu\text{g/ml}$ (H3: $4 \mu\text{g/ml}$) saptanmıştır. POS için; agar plak tarama yöntemi ile 16 izolat duyarlı, 2 izolat (H3 ve H23) dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değeri 16 izolatta $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$, 2 izolatta $> 0,25 \mu\text{g/ml}$ (H3: $0,5 \mu\text{g/ml}$ ve H23: $8 \mu\text{g/ml}$) saptanmıştır. Çizelge 18'de çalışmada yer alan tüm *Aspergillus spp.* izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları verilmiştir.

Çizelge 18. *Aspergillus spp.* izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları

Numune No	Klinik <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarının özellikleri				SERVİS	AGAR PLAK			E-TEST		
	Numune Tarihi	Yaşı	Numune Türü	Organizma		VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS
H1	16.10.2015	54	Kornea Absesi	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,094	0,75	0,023
H2	16.05.2017	49	Kornea Absesi	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,25	0,38	0,125
H3	27.11.2017	82	Kornea Absesi	ASPERGILLUS PSEUDOGLAUCUS	Göz Hast. Kornea	R	R	R	>32	4	0,50
H4	13.06.2016	59	Kornea Absesi	ASPERGILLUS SP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,19	0,50	0,094
H5	22.03.2019	43	Kornea Absesi	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,25	0,38	0,064
H6	9.11.2021	79	Kornea Absesi	ASPERGILLUS SP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,125	0,094	0,047
H7	18.06.2015	30	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göz Hast. Kornea	S	S	S	0,19	0,25	0,047
H8	22.08.2016	38	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	KBB	S	S	S	0,25	1	0,19
H9	23.01.2017	43	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,25	0,38	0,125
H10	10.05.2017	40	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	KBB	S	S	S	0,19	0,38	0,125
H11	23.05.2017	75	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	S	S	S	0,25	0,50	0,094
H12	12.01.2018	69	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,38	0,5	<0,002
H13	19.02.2018	54	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Endokrinoloji Servisi	S	S	S	0,38	0,19	<0,002
H14	2.04.2019	17	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,125	0,38	0,125
H15	3.05.2019	64	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,25	0,38	0,064
H16	9.12.2019	75	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,094	0,19	0,032
H17	11.06.2020	49	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,25	1,5	0,25
H18	10.07.2020	23	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Hematoloji Servisi	S	S	S	0,047	0,19	0,012
H19	27.08.2020	55	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	S	S	S	0,094	0,25	0,064
H20	22.10.2020	30	Doku Parçası	ASPERGILLUS SP	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	S	S	S	0,064	0,064	0,016
H21	2.04.2021	56	Doku Parçası	ASPERGILLUS SP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,125	0,094
H22	17.08.2021	7	Doku Parçası	ASPERGILLUS SP	Plastik Cerrahi Servisi	S	S	S	0,19	0,5	0,125
H23	7.03.2020	71	Doku Parçası	ASPERGILLUS PSEUDOGLAUCUS	Dış Sevk	R	S	R	1,5	0,75	8
H24	10.12.2019	33	Doku Parçası	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Dış Sevk	R	R	R	>32	4	0,75
H25	2.08.2021	69	Doku Parçası	ASPERGILLUS SP	KBB	S	S	S	0,064	0,125	0,032
H26	15.10.2021	52	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,19	0,38	0,125
H27	19.06.2019	56	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Dış Sevk	S	S	S	0,125	0,125	0,094
H28	17.11.2021	48	Doku Parçası	ASPERGILLUS SP	KBB	S	S	S	0,125	0,047	0,008
H29	28.09.2021	57	Doku Parçası	ASPERGILLUS NİGER	Dış Sevk	S	R	S	0,38	2	0,012
H30	18.11.2021	49	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,047	0,50	0,125
H31	11.06.2021	5	Doku Parçası	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	KBB	S	S	S	0,25	0,38	0,047
H32	22.06.2015	17	Katater Ucu	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Çocuk Hast. Gastroente. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,012
H33	01.08.2017	18	Katater Ucu	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Beyin Cer. Yoğun Bakım	S	S	S	0,094	0,25	0,016
H34	08.08.2018	36	Kan	ASPERGILLUS TERREUS	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,023	0,19	0,032
H35	01.08.2019	28	BOS	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Beyin Cer. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,003
H36	16.11.2016	33	Apse	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,50	0,50	0,19

Çizelge 18.(devamı) *Aspergillus spp.* izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları

Numune No	Klinik <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarının özellikleri				AGAR PLAK			E-TEST			
	Numune Tarihi	Yaşı	Numune Türü	Organizma	SERVİS	VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS
H37	10.04.2017	49	Apse	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Endokrinoloji Servisi	S	S	S	0,38	1	0,19
H38	30.05.2017	4	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,25	1,5	< 0,002
H39	02.10.2017	44	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Beşin Cer. Servisi	S	S	S	0,094	0,38	0,003
H40	11.06.2020	3	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,125	0,50	0,003
H41	16.09.2020	9	Apse	ASPERGILLUS SP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,032	0,25	0,047
H42	26.08.2021	20	Apse	ASPERGILLUS SP	Kadın Hast. Ve Doğum Servisi	S	S	S	0,38	0,50	0,125
H43	06.10.2021	29	Komea Absesi	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göz Hast. Komea	S	S	S	0,38	0,38	0,094
H44	07.10.2021	35	Apse	ASPERGILLUS SP	Kadın Hast. Ve Doğum Servisi	S	S	S	0,19	0,25	0,016
H45	22.10.2020	11	Apse	ASPERGILLUS SPP.	Çocuk Hast. Yoğun Bakım Ünitesi	S	S	S	0,125	0,75	0,125
H46	08.12.2017	48	Apse	ASPERGILLUS TERREUS	Plastik Cerrahi Servisi	S	S	S	0,094	0,19	0,064
H47	07.11.2017	55	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	İç Hast. Onkoloji Servisi	S	S	S	0,125	0,19	0,032
H48	13.09.2017	51	Apse	ASPERGILLUS TERREUS	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	S	S	S	0,032	0,5	0,016
H49	10.01.2020	9	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,094	0,5	0,047
H50	14.02.2020	67	Apse	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Onkoloji Servisi	S	S	S	0,75	1	0,064
H51	31.01.2020	14	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Dış Sevk	S	S	S	0,19	0,38	0,047
H52	26.05.2017	38	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Plastik Cerrahi Servisi	S	S	S	0,25	0,75	0,19
H53	17.12.2018	10	Apse	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,125	0,50	<0,002
H54	13.04.2018	53	Plevra	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,094
H55	3.12.2021	17	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,25	0,50	0,004
H56	13.01.2017	62	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,38	0,75	0,19
H57	17.01.2017	71	Balgam	ASPERGILLUS TERREUS	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,064	0,38	0,047
H58	30.01.2020	3	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,38	0,5	0,125
H59	06.07.2021	16	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,125	1	0,094
H60	07.01.2019	20	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,25	0,25	0,19
H61	22.06.2017	58	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,094
H62	28.07.2021	25	Balgam	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,5	0,047
H63	16.01.2020	18	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,25	0,75	0,19
H64	01.06.2021	76	Balgam	ASPERGILLUS TERREUS	Göğüs Hast. Servisi	R	S	S	1	1	0,19
H65	7.02.2020	53	Balgam	ASPERGILLUS SP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,032	0,5	0,023
H66	17.02.2021	14	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,50	0,75	0,19
H67	25.04.2019	53	BAL	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,75	0,094
H68	15.01.2021	18	Balgam	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,19	0,38	0,125
H69	08.01.2020	46	BAL	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,38	0,5	0,094
H70	22.11.2018	65	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,19	0,125	0,016
H71	31.08.2021	80	BAL	ASPERGILLUS SP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,50	0,75	0,19
H72	11.11.2016	38	ETA	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	Beşin Cer. Yoğun Bakım	S	S	S	0,125	1,5	0,094
H73	27.12.2017	45	ETA	ASPERGILLUS FUMIGATI KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,25	0,5	0,094

Çizelge 18.(devamı) *Aspergillus spp.* izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları

Numune No	Klinik <i>Aspergillus spp.</i> izolatlarının özellikleri				AGAR PLAK			E-TEST			
	Numune Tarihi	Yaşı	Numune Türü	Organizma	SERVİS	VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS
H74	14.01.2019	54	ETA	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,032	0,38	0,023
H75	31.10.2017	67	ETA	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,125	0,19	0,032
H76	19.02.2020	70	ETA	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,25	0,38	0,094
H77	12.10.2021	68	ETA	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,38	0,50	0,064
H78	20.02.2017	53	ETA	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,38	1	0,19
H79	26.10.2021	68	ETA	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,19	0,75	0,094
H80	6.02.2019	76	PLEVRA	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,5	0,064
H81	8.11.2018	47	Burun Sinus İçeriği	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Onkoloji Servisi	S	S	S	0,19	0,38	0,125
H82	12.10.2017	66	Burun Sinus İçeriği	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,125	0,50	0,064
H83	12.10.2016	66	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,38	0,50	0,19
H84	16.12.2019	73	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	İç Hast. Endokrinoloji Servisi	S	S	S	0,19	0,5	0,125
H85	5.03.2015	54	BAL	ASPERGILLUS TERREUS	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,125	0,012
H86	27.07.2015	54	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	1	0,004
H87	16.09.2015	32	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,094	1	0,064
H88	04.06.2018	64	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,75	0,19
H89	30.01.2017	32	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,5	0,125
H90	10.08.2017	35	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	1	0,064
H91	11.10.2017	41	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,5	0,047
H92	13.10.2017	44	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,023
H93	30.01.2018	44	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,38	0,75	0,125
H94	15.05.2018	66	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,125
H95	13.06.2018	43	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,38	0,008
H96	22.06.2018	48	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,125
H97	28.01.2019	21	BAL	ASPERGILLUS NİGER	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,094	0,50	0,19
H98	8.03.2019	42	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,25	0,094
H99	7.08.2019	12	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Hast. Hemato. Onk.	S	S	S	0,19	0,38	0,094
H100	31.10.2019	64	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	İç Hast. Onkoloji Servisi	S	S	S	0,032	0,19	0,002
H101	20.12.2019	58	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Gen. Cer. Transplantasyon Servisi	S	S	S	0,50	0,75	0,125
H102	14.02.2020	60	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,25	0,064
H103	30.12.2019	8	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Çocuk Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,38	0,047
H104	7.07.2021	71	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,25	0,25	0,047
H105	7.07.2021	4	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Çocuk Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,75	0,047
H106	13.04.2021	10	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,19	1	0,064
H107	30.10.2020	73	BAL	ASPERGILLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,75	0,023
H108	21.10.2020	12	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,38	0,094
H109	20.10.2020	72	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,064	0,19	0,032
H110	1.09.2020	10	BAL	ASPERGILLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,125	0,25	0,047
H111	21.11.2019	80	BAL	ASPERGILLUS NİGER	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,50	0,75	0,19

Çizelge 18.(devamı) *Aspergillus spp.* izolatların gradient test ve agar plak tarama yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları

Klinik *Aspergillus spp.* izolatlarının özellikleri

AGAR PLAK

E-TEST

Numune No	Numune Tarihi	Yaşı	Numune Türü	Organizma	SERVİS	VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS
H112	01.11.2021	68	BAL	ASPERGİLLUS SP	Bein Cer. Yoğun Bakım	S	S	S	0,047	1,5	0,032
H113	25.10.2016	9	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	S	S	S	0,5	0,38	0,125
H114	02.03.2017	62	Balgam	ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,25	0,064
H115	07.02.2018	15	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Çocuk Hast. Nefroloji	S	S	S	0,064	0,125	0,032
H116	04.05.2018	37	Balgam	ASPERGİLLUS NİGER	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,50	0,75	0,19
H117	19.06.2020	65	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,064	0,38	0,016
H118	19.06.2018	75	Balgam	ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,125	0,38	0,094
H119	01.02.2019	61	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Yoğun Bakım	S	S	S	0,25	0,38	0,19
H120	27.08.2019	34	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Enfeksiyon Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,19	0,032
H121	25.08.2020	75	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,38	0,064
H122	19.08.2020	46	Balgam	ASPERGİLLUS SP	Plastik Cerrahi Servisi	S	S	S	0,032	0,125	<0,002
H123	06.07.2021	13	Balgam	ASPERGİLLUS FLAVUS KOMP	İç Hast. Onkoloji Servisi	S	S	S	0,094	0,75	0,047
H124	16.06.2021	66	ETA	ASPERGİLLUS SP	İç Hast. Hematoloji Servisi	S	S	S	0,5	0,5	0,125
H125	05.11.2020	22	Balgam	ASPERGİLLUS FUMİGATİ KOMP	Göğüs Hast. Servisi	S	S	S	0,19	0,38	0,064

(BAL: Bronkoalveoler Lavaj, ETA: Endotrakeal Aspirasyon, KOMP: Kompleks, S: Duyarlı, R: Dirençli)

(VOR: Vorikonazol, ITR: Itrakonazol, POS: Posakonazol)

- **Azol Grubu Antifungallere Direnç Saptanan *Aspergillus spp.* İzolatlarının Broth Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Duyarlılık Sonuçları**

Çalışmamızda gradient test ve agar plak yöntemiyle azol grubu antifungallere direnç belirlenen izolatlara, doğrulama amacıyla broth mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal duyarlılık testleri yapılmıştır. Gradient test ve agar plak yöntemiyle azol grubu antifungallere direnç saptanan 7 izolat (H3, H17, H23, H24, H29, H64, H72) ve duyarlı saptanan 1 izolat (H106) duyarlılığı doğrulamak için broth mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmamızda broth mikrodilüsyon yöntemiyle elde ettiğimiz sonuçlara göre MİK değerlerinin aralığı; VOR için: 0.25 - >32 µg/ml, ITR için: 1 – 16 µg/ml, POS için: 0.064 – 4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Broth mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerleri; VOR için 3 izolatta ≤1µg/ml (H17, H29 ve H64:0,5 µg/ml) ve 3 izolatta >2 µg/ml (H23: 8 µg/ml, H3 ve H24: >32 µg/ml) olarak tespit edilmiştir. ITR için; 1 izolatta ≤1µg/ml (H64:1 µg/ml), 3 izolatta 1-2 µg/ml aralığında (H23, H17 ve H72: 2 µg/ml) ve 3 izolatta >2 µg/ml (H24: 16 µg/ml, H3: 8 µg/ml ve H29: 4 µg/ml) olarak tespit edilmiştir. POS için; 1 izolatta ≤0,25µg/ml (H17:0,25 µg/ml), 3 izolatta >0,25 µg/ml (H3: 0,5 µg/ml, H24: 1 µg/ml ve H23: 4 µg/ml) olarak tespit edilmiştir. Duyarlı saptanan 1 izolatta (H106) ise MİK değerleri VOR: 0,25 µg/ml, ITR: 1 µg/ml ve POS: 0,032 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Çizelge 19'da

broth mikrodilüsyon yöntemi, agar plak yöntemi ve gradient test yöntemi ile direnç belirlenen izolatlar verilmiştir.

Çizelge 19. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatların gradient test, agar plak ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenen antifungal duyarlılık sonuçları

Numune No	Numune Türü	Organizma	GRADİENT TEST (E-TEST)			AGAR PLAK			MİKRODİLÜSYON		
			VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS
H 17	Doku	<i>A. fumigatus</i>	0,25	1,5	0,25	S	S	S	0,5	2	0,25
H 24	Doku	<i>A. fumigatus</i>	>32	4	0,75	R	R	R	>32	16	1
H 72	ETA	<i>A. fumigatus</i>	0,125	1,5	0,094	S	S	S	0,25	2	0,064
H 106	BAL	<i>A. fumigatus</i>	0,19	1	0,064	S	S	S	0,25	1	0,032
H 64	Balgam	<i>A. terreus</i>	1	1	0,19	R	S	S	0,5	1	0,12
H 29	Doku	<i>A. niger</i>	0,38	2	0,012	S	R	S	0,5	4	0,12
H 3	Kornea Apsesi	<i>Aspergillus spp.</i>	>32	4	0,5	R	R	R	>32	8	0,5
H 23	Doku	<i>Aspergillus spp.</i>	1,5	0,75	8	R	S	R	8	2	4

(VOR: Vorikonazol, ITR: Itrakonazol, POS: Posakonazol, ETA: Endotrakeal Aspirasyon, BAL: Bronkoalveoler Lavaj)

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan, gradient test ve/veya agar plak yöntemiyle azol grubu antifungallere direnç belirlenen 3 *A. fumigatus* izolatında VOR, ITZ ve POS için broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri; VOR için H24:>32 µg/ml, ITR için H24: 16 µg/ml, H17 ve H72: 2 µ/ml, POS için H24: 1 µg/ml olup, EUCAST rehberlerine göre değerlendirildiğinde direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan, gradient test ve agar plak yöntemiyle azol grubu antifungallere duyarlı olarak belirlenen bir *A. fumigatus* izolatında (H106) broth mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerleri; VOR: 0,25 µg/ml, ITR: 1 µg/ml ve POS: 0,032 µg/ml olup, EUCAST rehberlerine göre değerlendirildiğinde duyarlı olarak tespit edilmiştir. *A. fumigatus* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 19’da verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan ve agar plak yöntemiyle direnç belirlenen bir *A. terreus* izolatında (H64) broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR: 0,5 µg/ml, ITR: 4 µg/ml, POS: 0,12 µg/ml

saptanmış olup EUCAST rehberlerine göre ITR ve POS'e duyarlı olarak tespit edilmiştir. *A. terreus* izolatının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 19'da verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tanımlanmış olan ve agar plak yöntemiyle direnç belirlenen 1 *A. niger* izolatında (H29) broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR için 0,5 µg/ml, ITR için 1 µg/ml, POS için 0,064 µg/ml saptanmıştır. *A. niger* izolatının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 19'da verilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile tür tanımı yapılamayan, agar plak yöntemiyle azol grubu antifungallere direnç belirlenen 2 *Aspergillus spp.* izolatında (H3 ve H23) broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri; VOR için; H3: >32 µg/ml ve H23:8 µg/ml, ITR için; H3: 8 µg/ml ve H23: 2 µg/ml, POS için; H3: 0,5 µg/ml ve H23: 4 µg/ml olarak saptanmıştır. *Aspergillus spp.* izolatlarının çalışmada saptanan MİK değerleri Çizelge 19'da verilmiştir.

- ***Aspergillus spp.* İzolatlarında Gradient Test, Agar Plak ve Broth Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırması**

Gradient test ve/veya agar plak tarama yöntemi ile dirençli bulunan izolatlar broth mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda gradient test ve/veya agar plak tarama yöntemi ile dirençli saptanan 7 izolat (H3, H17, H23, H24, H29, H64, H72) ve duyarlı saptanan 1 izolat (H106) azol gurubu antifungallere duyarlılığın doğrulaması için broth mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. *A. fumigatus* olarak tanımlanan H17 izolatında: gradient test yöntemi ile ITR'e direnç saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a direnç saptanmazken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile ITR'e direnç saptanmıştır. *A. fumigatus* olarak tanımlanan H24 izolatında: gradient test yöntemi ile VOR ve ITR'e, agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a direnç saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile VOR ve ITR'e direnç saptanmıştır. *A. fumigatus* olarak tanımlanan H72 izolatında: gradient test yöntemi ile ITR'e direnç saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a direnç saptanmazken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile ITR'e direnç saptanmıştır. *A. fumigatus* olarak tanımlanan H106 izolatı gradient test, agar plak

tarama ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile VOR, ITR ve POS'e duyarlı saptanmıştır. *A. terreus* olarak tanımlanan H64 izolatında: gradient test yöntemi ile VOR ve ITR için MİK değeri 1 µg/ml (ITR: duyarlı) saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile VOR'e direnç saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile ITR için MİK değeri 1 µg/ml(duyarlı) saptanmıştır. *A. niger* olarak tanımlanan H29 izolatında: gradient test yöntemi ile ITR için MİK değeri 2 µg/ml saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile ITR'e direnç saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile ITR için MİK değeri 4 µg/ml saptanmıştır. *Aspergillus sp.* olarak tanımlanan H3 izolatında: gradient test yöntemi ile MİK değerleri VOR için >32 µg/ml, ITR için 4 µg/ml saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a direnç saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR için >32 µg/ml, ITR için 8 µg/ml saptanmıştır. *Aspergillus sp.* olarak tanımlanan H23 izolatında: gradient test yöntemi ile MİK değerleri VOR için 1,5 µg/ml, POS için 8 µg/ml saptanıp, agar plak tarama yöntemi ile VOR ve POS'e direnç saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR için 8 µg/ml, ITR için 2 µg/ml, POS için 4 µg/ml saptanmıştır (Çizelge 19).

D. Azol Grubu Antifungallere Direnç Saptanan *Aspergillus spp.* İzolatlarının DNA Dizi Analizi İle Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmamızda 125 klinik *Aspergillus spp.* izolatından azol grubu antifungallere karşı MİK değerlerinde artış belirlenen veya azol direnci saptanan 7 izolat (H3, H17, H23, H24, H29, H64, H72), duyarlı saptanan 1 izolat (H106) DNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile *A. fumigatus* olarak tanımlanarak direnç saptanan 3 izolat (H17, H24, H72) ve duyarlı saptanan 1 izolat (H106) DNA dizi analizi ile *A. fumigatus* olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile *A. terreus* olarak tanımlanarak direnç saptanan veya MİK değerinde artış belirlenen 1 izolat (H64) *A. terreus* olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile *A. niger* olarak tanımlanarak MİK değerinde artış belirlenen 1 izolat (H29) *A. niger* olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan ve MİK değerinde artış belirlenen 2 izolat (H3 ve H23), dizi analizi ile kriptik türlerden *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanmıştır. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile belirlenen *Aspergillus*

türleri Çizelge 20’de verilmiştir. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda DNA dizi analizi ile belirlenen *Aspergillus* türleri Çizelge 21 ve Şekil 13’de verilmiştir.

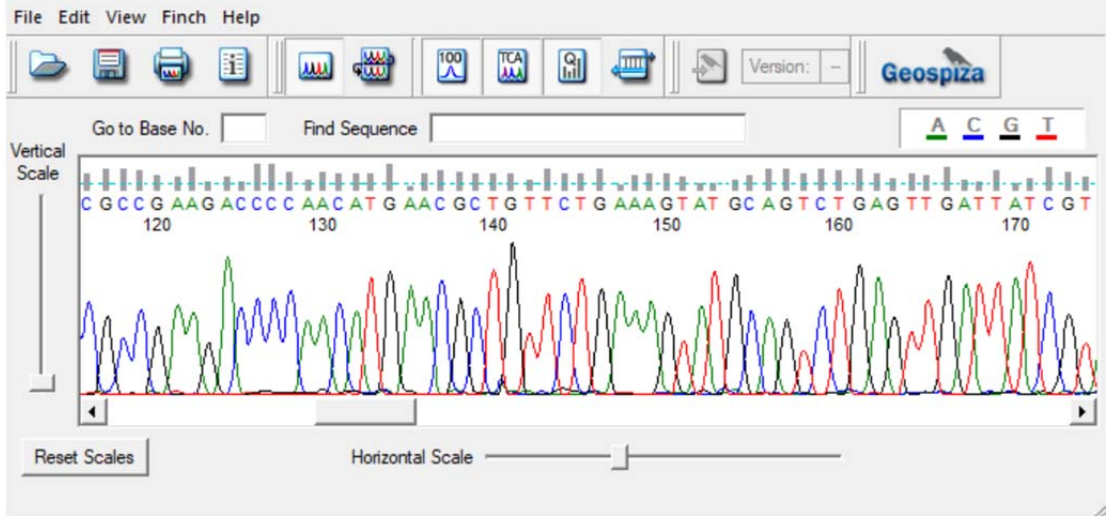
Çizelge 20. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda konvensiyonel ve moleküler yöntemler ile belirlenen *Aspergillus* türleri

Numune No	Numune Türü	Konvensiyonel Yöntemler İle Tanımlama	Moleküler Yöntemler İle Tanımlama
H 17	Doku	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
H 24	Doku	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
H 72	ETA	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
H 106	BAL	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
H 64	Balgam	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
H 29	Doku	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
H 3	Kornea Apsesi	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>
H 23	Doku	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>

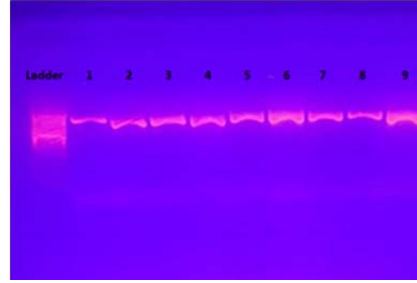
(ETA: Endotrakeal Aspirasyon, BAL: Bronkoalveoler Lavaj)

Çizelge 21. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda DNA dizi analizi ile belirlenen *Aspergillus* türleri

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show	100				
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate PM9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	1156	OR378792.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate bai_ITS4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	562	ON738578.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate bai_ITS1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	564	ON738577.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate FICR4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	587	OR142615.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus PW4000 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete seq...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	558	LC772256.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus PW1358 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete seq...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	558	LC772246.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate AGP1 ITS4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	560	OR144129.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus isolate AGP1 ITS1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	<i>Aspergillus fumigatus</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	550	OR144128.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aspergillus udagawae isolate BF32-93 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	<i>Aspergillus udagawae</i>	156	156	100%	6e-34	100.00%	581	OR143378.1



Şekil 13. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan izolatlarda DNA dizi analizi ile belirlenen *Aspergillus* türleri

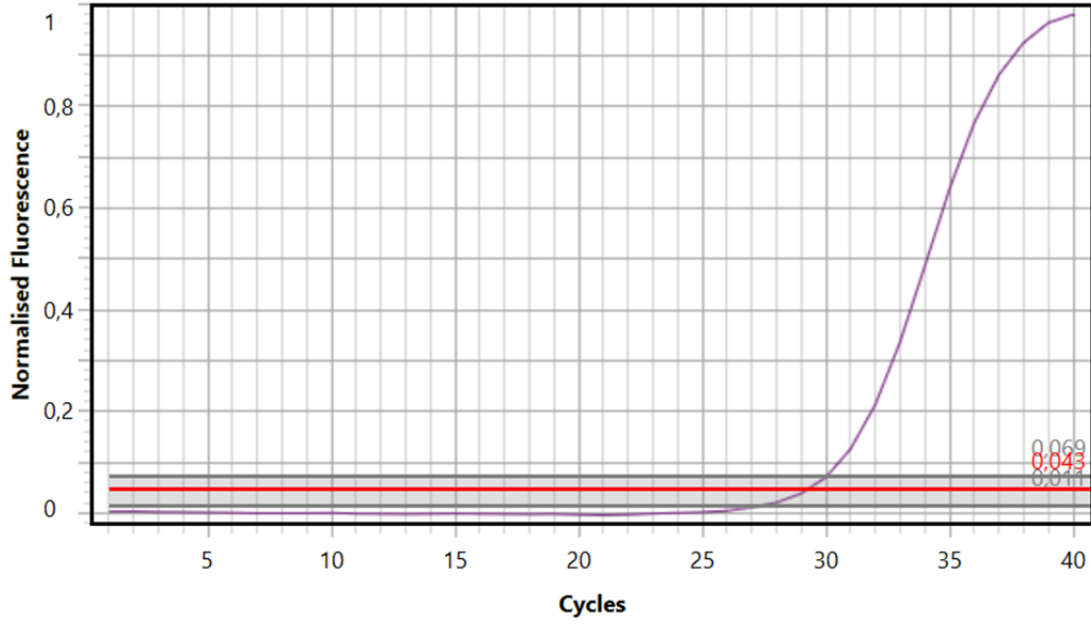


Şekil 14. *Aspergillus spp.* olarak tanımlanan izolatların PCR görüntüsü

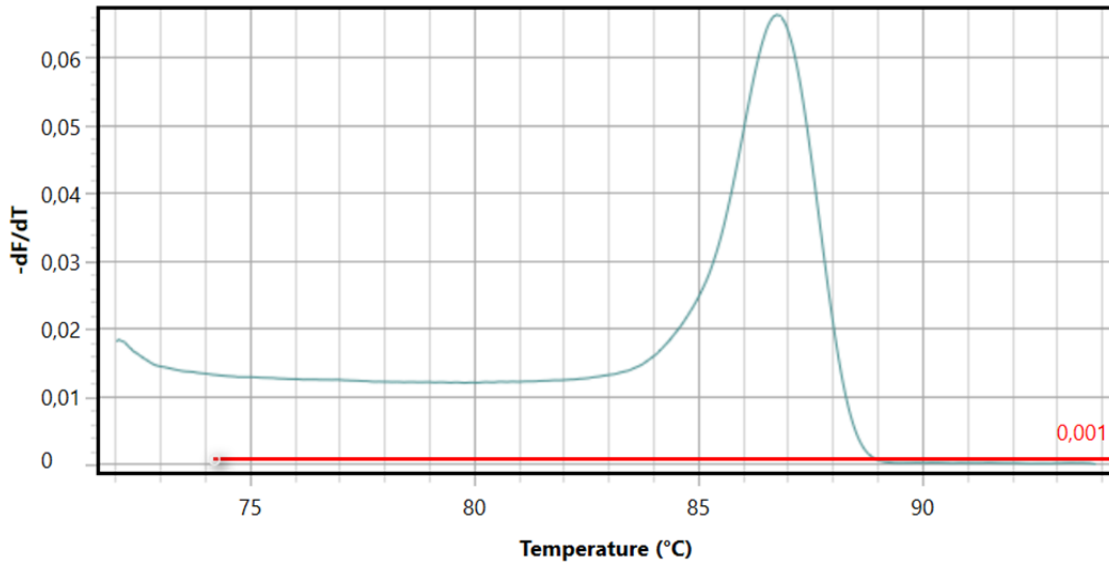
E. Cyp51A Genindeki Mutasyonların Belirlenmesi

Çalışmamızda azol grubu antifungallere karşı yüksek MİK değeri belirlenen veya azol direnci saptanan 7 izolatta (H3, H17, H23, H24, H29, H64, H72) ve duyarlı saptanan 1 izolatta (H106) *Aspergillus spp.* türlerinde azol direnci ile en sık ilişkilendirilen Cyp51A gen bölgesi mutasyon açısından araştırılmıştır. cyp51A genindeki CypA-L98H nokta mutasyonu 6 izolatta (H17, H23, H24, H29, H72 ve H106) ve CypA-M220 nokta mutasyonu 7 izolatta (H3, H17, H23, H24, H29, H72 ve H106) tespit edilmiştir (Çizelge 22). *A. terreus* olarak tanımlanan ve VOR'e karşı yüksek MİK değeri belirlenen 1 izolatta (H64) Cyp51A gen bölgesinde CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmemiştir. Şekil 15'te H24'ün, L98-H syber green görüntüsü Cycling analizi, Şekil 16'da H23'ün L98-H melt analizi, Şekil 17'de tüm izolatların L98-H Demeti-Syber Green Cycling analizi ve Şekil 18'de tüm izolatların L98-H melt analizi görüntüsü verilmiştir. Şekil 19'da H24'ün M220 syber green Cycling analizi, Şekil 20'de H24'ün M220 melt analizi görüntüsü, Şekil 21'de tüm izolatların M220 Görüntü

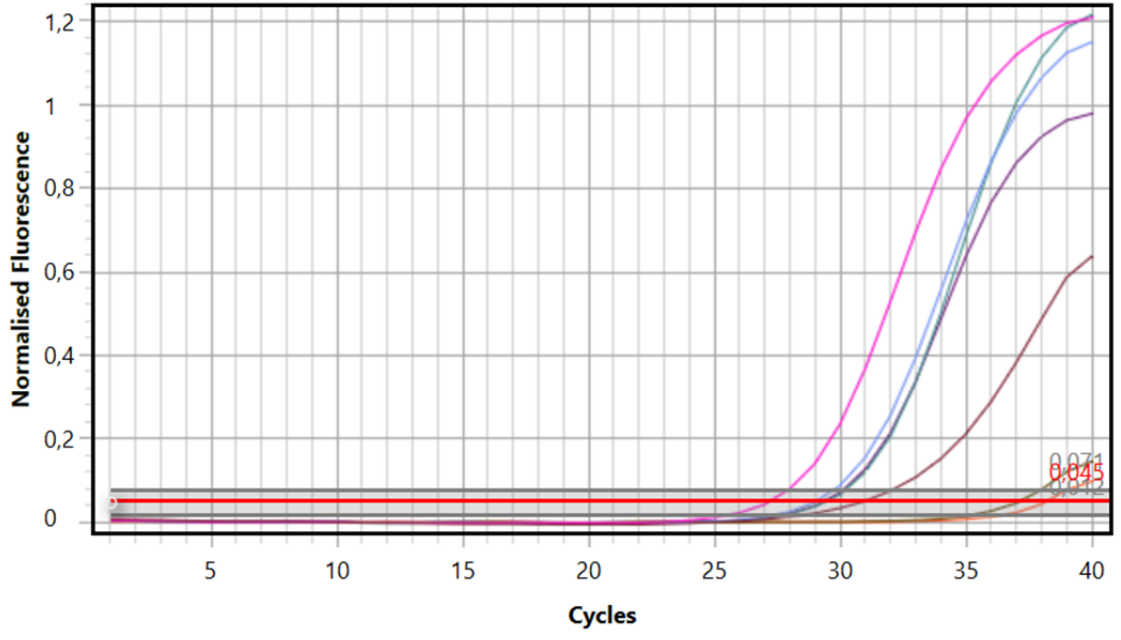
Demeti-syber green Cycling analizi ve Şekil 22’de tüm izolatların M220 melt analizi görüntüleri verilmiştir.



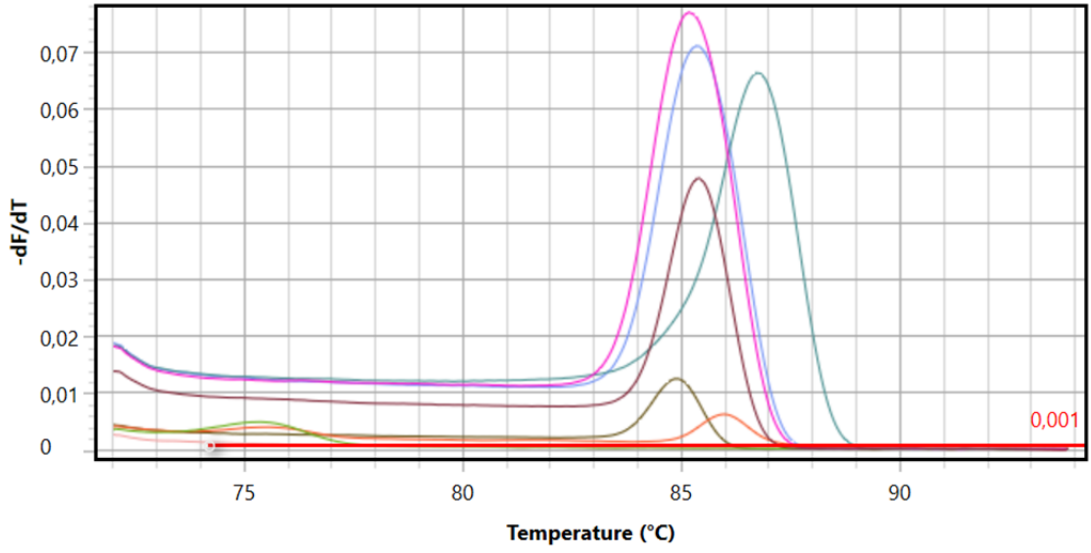
Şekil 15. L98-H 24 nolu hasta-syber green görüntüsü (Cycling Analizi)



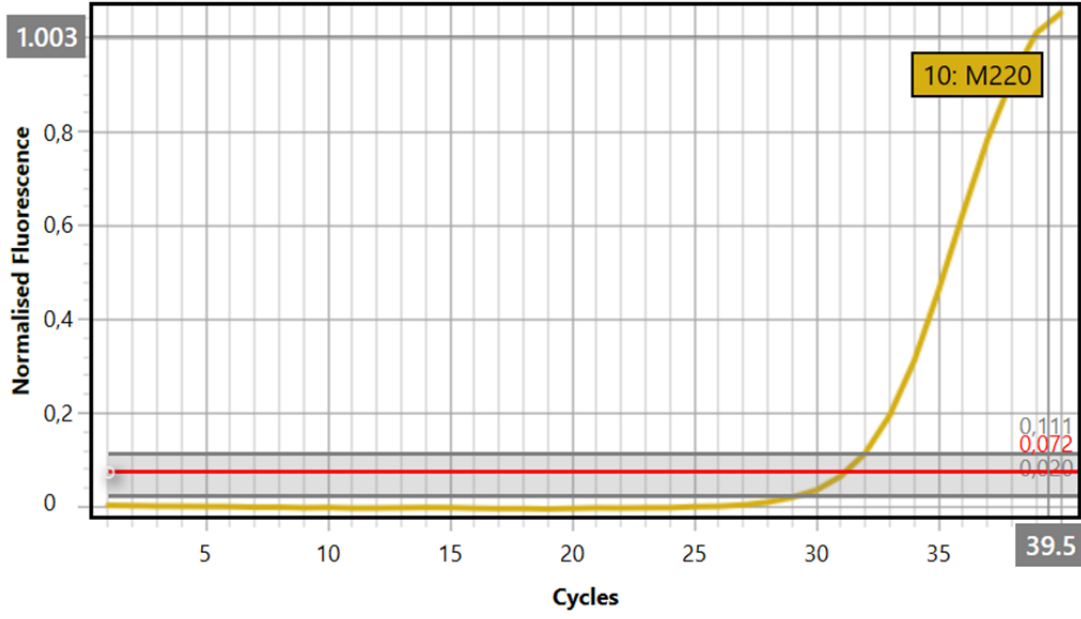
Şekil 16. L98-H 23 Nolu Hasta-Melt Analizi



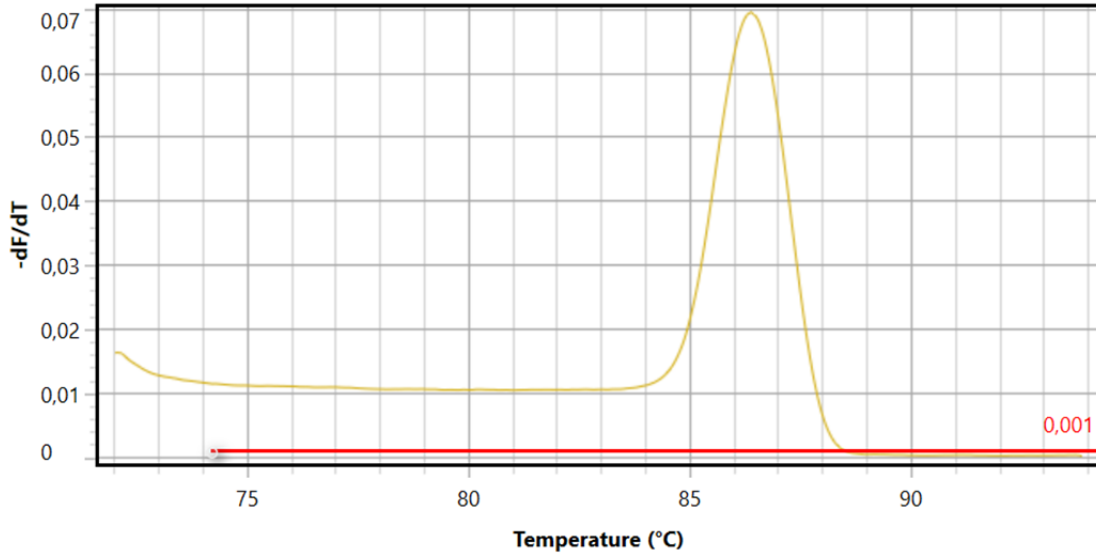
Şekil 17. L98-Tüm Görüntü Demeti-Syber Green (Cycling Analizi)



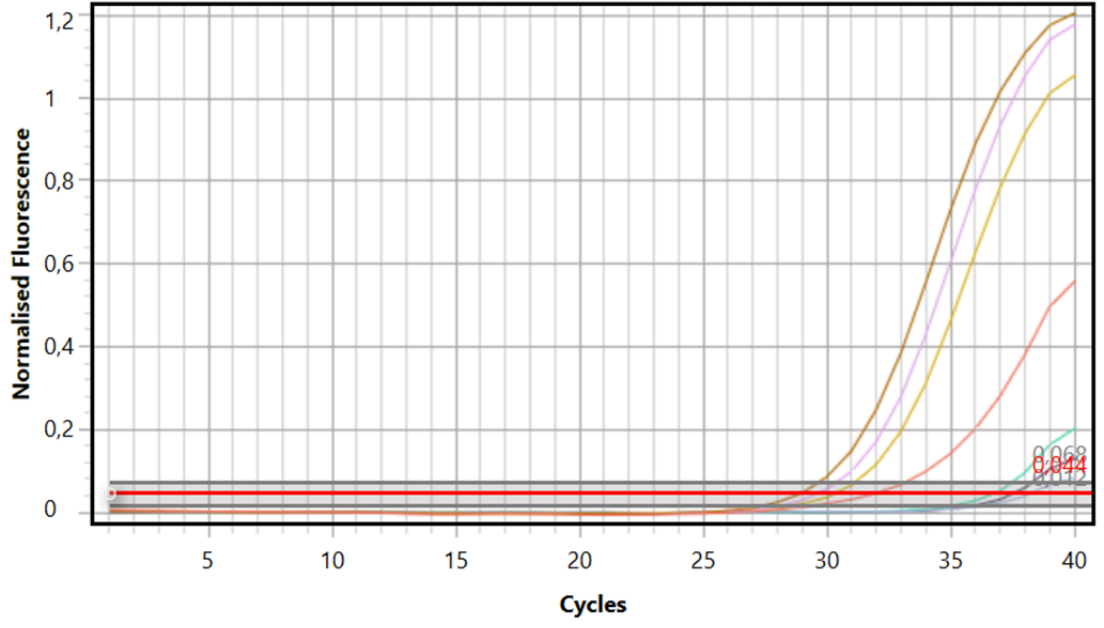
Şekil 18. L98-Tüm Hasta Melt Analizi Görüntüsü



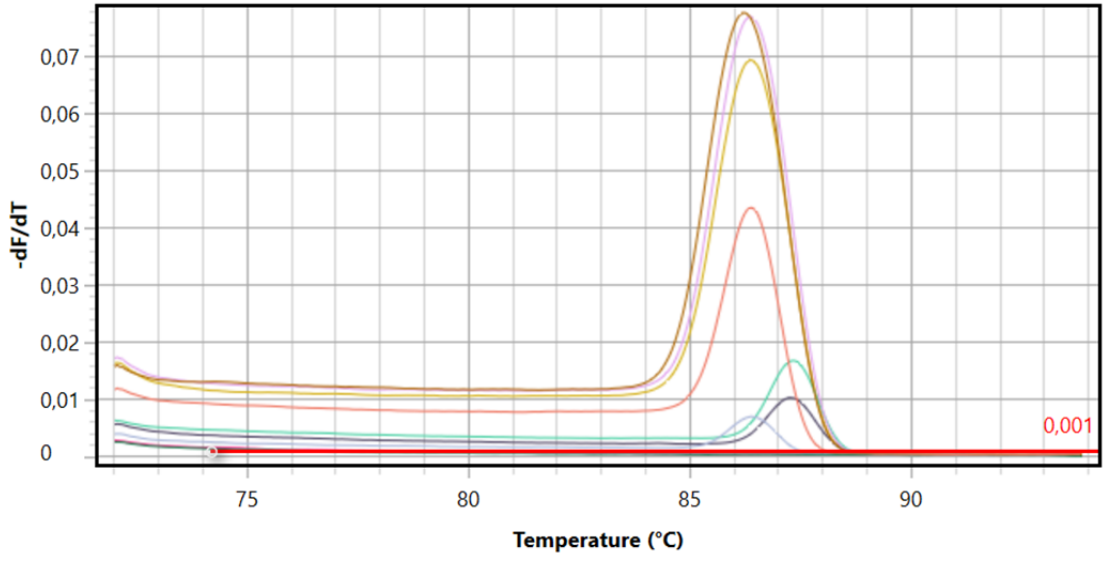
Şekil 19. M220-H 24 nolu hasta-syber green (Cycling Analizi)



Şekil 20. M220-H 24. Hasta Melt Analizi Görüntüsü



Şekil 21. M220-Tüm Hasta Görüntü Demeti-syber green (Cycling Analizi)



Şekil 22. M220-Tüm Hasta Melt Analizi Görüntüleri

Çizelge 22. *Aspergillus spp.* izolatlarında tespit edilen Cyp51A mutasyonları

Numune No	Numune Türü	Organizma	GRADIENT TEST (E-TEST)			AGAR PLAK			MİKRODİLÜSYON			CypA-L98H				CypA-M220			
			VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS	VOR	ITR	POS	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Tm	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Tm
H 17	Doku	<i>A. fumigatus</i>	0,25	1,5	0,25	S	S	S	0,5	2	0,25	28,89	0,96	0,999	85,36	29,58	1,04	0,99652	86,37
H 24	Doku	<i>A. fumigatus</i>	>32	4	0,75	R	R	R	>32	16	1	29,2	0,86	0,99992	84,2	30,29	0,83	0,99918	86,38
H 72	ETA	<i>A. fumigatus</i>	0,125	1,5	0,094	S	S	S	0,25	2	0,064	27,08	0,96	0,99938	85,2	28,94	1,01	0,99482	86,23
H 106	BAL	<i>A. fumigatus</i>	0,19	1	0,064	S	S	S	0,25	1	0,032	30,7	0,58	0,99772	85,39	31,91	0,52	0,99553	86,38
H 64	Balgam	<i>A. terreus</i>	1	1	0,19	R	S	S	0,5	1	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
H 29	Doku	<i>A. niger</i>	0,38	2	0,012	S	R	S	0,5	4	0,12	37	0,8	0,9987	84,88	38,2	0,71	0,99905	86,4
H 3	Kornea apsesi	<i>A. pseudoglaucus</i>	>32	4	0,5	R	R	R	>32	8	0,5	-	-	-	-	37,5	0,9	0,99989	87,27
H 23	Doku	<i>A. pseudoglaucus</i>	1,5	0,75	8	R	S	R	8	2	4	29,3	0,95	0,99717	86,75	36,72	0,85	0,99995	87,33

(ETA: Endotrakeal Aspirasyon, BAL: Bronkoalveoler Lavaj, S: Duyarlı, R: Dirençli)

Çalışmamızda *A. fumigatus* izolatlarından ITR'e direnç belirlenmiş olan H17 ve H72 izolatu ile pan-azol dirençli olan H24 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları saptanmıştır. *A. fumigatus* izolatlarından azollere duyarlı olup ITR için MİK değeri 1 µg/ml olan H106 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları saptanmıştır. *A. terreus* olarak tanımlanan ve ITR'e duyarlı olup, VOR MİK değeri 1 µg/ml olan H64 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmemiştir. *A.niger* olarak tanımlanan ve ITR için MİK değeri 4 µg/ml olan H29 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları saptanmıştır. *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan ve VOR için MİK değeri >32 µg/ml, ITR için MİK değeri 4 µg/ml olan H3 izolatında CypA-M220 mutasyonu tespit edilip, CypA-L98H mutasyonu tespit edilmemiştir. *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan ve VOR için MİK değeri 8 µg/ml, ITR için MİK değeri 2 µg/ml, POS için MİK değeri 4 µg/ml olan H23 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları saptanmıştır.

- **Azol Grubu Antifungallere Direnç Saptanan *Aspergillus spp.* İzolatlarının Klinik Tanısı ve Antifungal Kullanımı**

Çalışmamızda 125 klinik *Aspergillus spp.* izolatından 7 izolatta (H3, H17, H23, H24, H29, H64, H72) azol grubu antifungallere karşı MİK değerlerinde artış veya azol direnci saptanmıştır. Direnç saptanan 7 izolatın ve DNA dizi analizi ile tür tanımlaması yapılan H106 izolatının klinik tanı ve antifungal kullanımı Çizelge 23'de verilmiştir.

Çizelge 23. Azol grubu antifungallere dirençli bulunan *Aspergillus spp.* izolatlarının klinik tanı ve antifungal kullanımı

Numune No	Numune Türü	Organizma	Yaş	Tanı	Antifungal Kullanımı	İzole Edildiği Yıl
H 17	Doku	<i>A. fumigatus</i>	49	İPA ve akut lenfoblastik lösemi-malinite	+	2020
H 24	Doku	<i>A. fumigatus</i>	33	İPA ve kronik sinüzit	+	2019
H 72	ETA	<i>A. fumigatus</i>	38	Akut lenfoblastik lösemi ve organ-doku nakli	-	2016
H 106	BAL	<i>A. fumigatus</i>	10	Kistik fibrozis ve Covid-19	-	2021
H 64	Balgam	<i>A. terreus</i>	76	İPA ve intersitisyel akciğer hastalığı	+	2021
H 29	Doku	<i>A. niger</i>	57	İPA	+	2021
H 3	Kornea	<i>A.</i>	82	Keratit	-	2017
H 23	Apsesi Doku	<i>pseudoglaucus</i> <i>A.</i> <i>pseudoglaucus</i>	71	İPA	+	2020

(ETA: Endotrakeal Aspirasyon, BAL: Bronkoalveoler Lavaj, İPA: İnvaziv Pulmoner Aspergilloz)

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. fumigatus* olarak tanımlanan, gradient test ile ITR'e direnç saptanan H17 izolatu, doku örneğinden izole edilmiştir. 49 yaşındaki hastanın İPA ve akut lenfoblastik lösemi-malinite tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcuttur.

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. fumigatus* olarak tanımlanan, tüm azol grubu antifungallere direnç saptanan H24 izolatu doku örneğinden izole edilmiştir. 33 yaşındaki hastanın İPA ve kronik sinüzit tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcuttur.

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. fumigatus* olarak tanımlanan, gradient test ile ITR'e direnç saptanan H72 izolatu, ETA örneğinden izole edilmiştir. 38 yaşındaki hastanın akut lenfoblastik lösemi ve organ-doku nakli öyküsü vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcut değildir.

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. fumigatus* olarak tanımlanan ve azol grubu antifungallere duyarlı saptanan H106 izolatu, BAL örneğinden izole edilmiştir. 10 yaşındaki hastanın kistik fibrozis ve Covid-19 tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcut değildir.

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. terreus* olarak tanımlanan ve agar plak yöntemi ile VOR'e direnç saptanan H64 izolatu, balgam örneğinden (tekrarlayan balgam örneklerinden izole edilmiştir, tekrarlayan örneklerin hepsinde VOR'de direnç tespit edilmiştir) izole edilmiştir. 76 yaşındaki hastanın İPA ve intersitisyel akciğer hastalığı tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcuttur.

Konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle *A. niger* olarak tanımlanan ve agar plak yöntemi ile ITR'e direnç saptanan H29 izolatu, doku örneğinden izole edilmiştir. 57 yaşındaki hastanın İPA tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcuttur.

Konvensiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.*, moleküler yöntemlerle *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan, VOR, ITR ve POS'e direnç saptanan H3 izolatu, kornea absesinden izole edilmiştir. 82 yaşındaki hastanın keratit tanısı vardır ve daha önce antifungal kullanımı mevcut değildir.

Konvensiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.*, moleküler yöntemlerle *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan, VOR ve POS'de direnç saptanan H23 izolatu,

doku örneğinden izole edilmiştir. 71 yaşındaki hastanın İPA tanısı vardır ve uzun süreli antifungal kullanımı mevcuttur.

Çalışmamızda direnç saptanan izolatların kliniklere göre dağılım ve altta yatan hastalık bilgilerinde; 14 hastanın yoğun bakım ünitelerinden, 8 hastanın cerrahi servislerinden, 18 hastanın iç hastalıkları servisinden, 21 hastanın enfeksiyon servisinden, 27 hastanın göğüs hastalıkları servisinden, 8 hastanın göz hastalıklarının kornea biriminden, 11 hastanın KBB servisinden ve 17 hastanın hematoloji/onkoloji servislerinden geldikleri belirlenmiştir. 5 hasta ise dış sevk ile gelmiştir (Çizelge 19).

V.TARTIŞMA

Günümüzde artarak küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelen fungal patojenler ve bunların sebep olduğu hastalıklar Dünya Sağlık Örgütü tarafından öncelikli bir sorun olarak nitelendirilmiş ve buna ilişkin öncelikli patojenler listesi yayınlanmış ve kritik öncelikli tehdit listesinde *A.fumigatus* yer almıştır (WHO,2022). Ayrıca ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri fungal patojenleri içeren bulaşıcı hastalık öncelik tehdit listesine; azol dirençli *A.fumigatus*'u öncelik tehdit izleme listelerine eklemiştir (<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/antifungal-resistant.html>, 2021).

Aspergilloz, bağışıklığı baskılanmış hastalarda en sık görülen küf enfeksiyonudur ve önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Azol grubu antifungaller, hayatı tehdit eden bu hastalığın tedavisi için ilk olarak tercih edilmektedir. *A. fumigatus*'ta azol direnci giderek daha fazla rapor edilmektedir. Direnç oranlarındaki artış ile dirençli bir izolat ile enfekte hastalarda kötü terapötik sonuçlar oluşturmaktadır. Bu durumu destekler nitelikte 2023 yılında invaziv aspergillozda PCR tabanlı *Aspergillus* ve azol direnci tespitinin klinik etkisinin araştırıldığı prospektif çok merkezli bir çalışmada, triazol dirençli *A. fumigatus*'un neden olduğu invaziv aspergilloz, yüksek bir ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir. Direncin erken zamanda tespitinin, uygun tedavinin daha erken başlatılmasına katkı sağlayacağı önerilmiştir (Huygens vd., 2023). İnvaziv aspergillozda vorikonazol direnci ve mortalitenin araştırıldığı çok merkezli retrospektif bir çalışmada; vorikonazole dirençli İA'un (invaziv aspergillozun) mortalitesinin, vorikonazole duyarlı İA'un kıyasla %21 daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Uygun antifungal tedavide gecikmenin, %23 daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Azole dirençli İA'un olan hastalar, azole duyarlı İA'a kıyasla %20'nin üzerinde bir fazla mortalite ile karakterize edilmiştir. Uygun antifungal tedaviye erken geçiş, dirence atfedilen mortaliteyi azaltmaktadır (Lestrade vd., 2019).

İnvaziv aspergillozun küresel sağlık tehdidi haline gelmesi, antifungal direncin hızla artması ve birçok ortamda kaliteli teşhis ve tedaviye sınırlı erişim sorunu ile ortaya çıkmaktadır (Brown vd., 2012; Denning, 2022). İnvaziv aspergillozun, teşhisi zordur ve bu nedenle hasta özelliklerini, klinik ve radyolojik bulguları kullanarak çok boyutlu bir yaklaşımı ve bunlara ilaveten aspergillozdan etkilenen popülasyonların genişletilmesini gerektirir. Bu bağlamda Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü Bulaşıcı Hastalıklar Grubu ve Mikozlar Çalışma Grubu (EORTC/MSG), seçilmiş popülasyonlarda aspergillozu tanımlamak için konakçı faktörlere, klinik özelliklere ve mikolojik kanıtlara güvenilmesi gerektiğinin altını çizmiş, klinik çalışmalar, epidemiyolojik çalışmalar ve tanısal testlerin değerlendirilmesi için bu analizlerin gerekliliğini ortaya koymuştur (Donnelly vd., 2020). Klinik çalışmalarda aspergilloz riski taşıyan yeni gruplar sürekli olarak belirlense de, azol kullanmamış hastalarda ve özellikle kanser hastaları, kistik fibrozlu hastalar ve YBÜ'dekiler gibi yüksek riskli hastalarda azol direnci taraması önerilir ve antifungal profilaksi aspergillozu önleyebilir (WHO,2022). Profilaktik ve tedavi amaçlı azol grubu antifungallerin kullanımında dikkatli olunması ve gerekli durumlarda in vitro duyarlılık testleri ile direncin araştırılması gerekmektedir. *Aspergillus* enfeksiyonu şüphesiyle, antifungal tedaviye klinik materyal alımından önce başlanması kültürden etkenin izolasyon oranını düşürebilir ve etkenin üretilmediğinde direnç belirlenemeyeceğinden dolayı, laboratuvar ve klinisyen arasındaki iletişim *Aspergillus* türlerinin izole edilmesini sağlar ve uygun tedavinin belirlenmesinde yol gösterici olacaktır. Hastaneye ait direnç profili de ancak bu koşullar altında belirlenebilir. Laboratuvarlar izolatlarını sistematik olarak test etmediğinde direnç prevalansını doğru tahmin etmek zor olmaktadır. Buna bağlı olarak klinik mikoloji laboratuvarlarında, potansiyel azol direncine sahip *Aspergillus* izolatlarının tespiti için kullanımı kolay tarama prosedürlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan bu tez çalışmasında, insan sağlığı için giderek artan bir tehdit oluşturan *Aspergillus spp.* türlerinde direnç gelişimini ve antifungal duyarlılık testlerinde gradient test ile agar plak yöntemi karşılaştırarak pratik ve kolay uygulanabilir bir tarama sistemi ile direnç belirlenmesi değerlendirilmiştir.

Wang ve ark., invaziv aspergillozlu hastalarda; hastanın yaşının ve akciğer hastalıklarının, klinik risk faktörleri arasında yüksek oranda ilişkili olduğunu bulmuştur. İA'lu hastalarda en duyarlı yaş 61 ile 80 arasında ve yaş ortalaması 58 olarak bulmuştur. Genel olarak, İA insidansının, 80 yaşın üzerindeki hastalar dışında yaşla birlikte arttığı bildirilmiştir. Çalışmamız; 2015-2021 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden (apse, kornea apsesi, biopsi, doku ve solunum örnekleri) izole edilen 125 *Aspergillus spp.* izolatından 71'inin (%56,8) erkek, 54'ünün (%43,2) kadın hastaya ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca izolatların 27 tanesinin çocuk hastadan (%21,6), 98 tanesinin erişkin hastadan (%78,4) izole edildiği saptanmış, hastaların yaşlarının 3-82 arasında olup yaş ortalamasının 44 olduğu belirlenmiştir. Wang ve ark.'nın çalışmasında, erkek/kadın cinsiyet oranı 1,9 (102/54) iken, çalışmamızda erkek/kadın cinsiyet oranı ise 1,3 (71/54) bulunmuştur. Kadın hastalar toplam çalışmanın %43,2'sini, erkek hastalar ise %56,8'sini oluşturmuştur (Wang vd., 2022).

Aspergillozlu hastalardan üretilen türlerden *A. fumigatus* tipik olarak en yaygın olanıdır. Diğer yaygın türler arasında *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* bulunur. Wang ve ark.'nın çalışmasında, *Aspergillus* türlerinin dağılımı *A. fumigatus* %56,41, *A. flavus* %20,51, *A. niger* %15,38, *A. terreus* %1,92 ve *A. versicolor* %1,92 şeklinde bildirilmiştir (Wang vd., 2022). 19 ülkeden yapılan çok merkezli bir araştırmaya göre, 2941 *A. fumigatus* kompleks izolatları arasında azol direncinin genel prevalansı %3,2 bildirilmiştir. Bununla birlikte, azole dirençli izolatların %21,7'ye varan oranı *A. fumigatus* olarak değil, *A. lentulus*, *A. thermomutatus* ve *A. udagawae* gibi kriptik türler olarak tanımlanmıştır (Van der Linden vd., 2015).

ABD ve Kanada'da katı organ nakli alıcıları ve hematopietik kök hücre nakli geçirenlerde yapılan 6 yıllık sürveyans çalışmasında, Fumigati bölümünün üyeleri arasında %93,9'unun *A. fumigatus* ve %2,7 *A. lentulus* ve %2,0 *A. udagawae* dahil olmak üzere diğer türler olduğu bildirilmiştir (Balajee vd., 2009). ABD'de *A. fumigati* bölümündeki izolatların tür dağılımını ve duyarlılık profillerinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, 2138 izolatta en yaygın olarak *A. fumigatus* (%96,91) olarak bulunmuştur (Badali vd., 2022).

Dünyanın çoğu yerinde *A. fumigatus*, aspergillozun başlıca ajanı olarak tanımlansa da yakın zamanda Asya ve Afrika'daki iklim koşullarına uyum

sağlayabildiği için *A. flavus*'un tropikal bölgelerde önde gelen IA ajanı olma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Rudramurthy vd., 2019). Yakın tarihli bir sistematik inceleme ve meta-analiz çalışmasına göre, *A. flavus* İran'daki IA hastalarından izole edilen en yaygın tür olarak belirlenmiştir (Tavakoli vd., 2019). *A. flavus*, Orta Doğu bölgesinde geniş yayılım göstermeyen mantar enfeksiyonlarının önde gelen nedeni olarak bildirilmiştir (Hedayati vd., 2018).

Aspergilloz vakalarındaki dünya çapındaki artış göz önüne alındığında, hastalığa neden olan ajanı tür düzeyinde belirlemek, antifungal duyarlılık paternindeki farklılıklardan dolayı da önemlidir. Araştırmalarda son zamanlarda kriptik/nadir *Aspergillus* türleri tanımlanmıştır (Guegan vd., 2021; Pfaller vd., 2021; Nargesi vd., 2022; Badiie vd., 2022). *Aspergillus* kriptik türlerinin IA gelişimindeki klinik önemi hakkında artan bir farkındalık vardır. Kriptik görülen türler, yanlış tanımlama nedeniyle ihmal edilebildiği için epidemiyolojik dağılımları ve antifungal duyarlılıkları hakkında sınırlı bilgi vardır. Kriptik türlerden bazılarının şu anda mevcut olan antifungallere duyarlılığının azaldığı bildirildiğinden, bu bulgular klinik olarak anlamlı olabilir (Goncalves vd., 2016; Perlin vd., 2017; Ullmann vd., 2018; Arıkan-Akdagli vd., 2018). Çalışmamızda; 55 adet *A. fumigatus* complex (%44), 42 adet *A. flavus* (%33,6), 6 adet *A. terreus* (%5), 4 adet *A. niger* (%3) ve 18 adet *Aspergillus spp.* (%14) olmak üzere toplam 125 *Aspergillus* türü tanımlanmıştır. Bu izolatlardan direnç saptanan ve konvansiyonel yöntemler ile *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* olarak tanımlanan izolatlar DNA dizi analizi ile de aynı şekilde tanımlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda konvansiyonel yöntemler ile *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan ve MİK değerinde artış belirlenen izolatlar ise (H3 ve H23) dizi analizi ile kriptik türlerden *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanmıştır.

Solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* türlerinin izolasyonu ve mikroskopik incelemede hiflerin görülmesi; hematolojik maligniteli ve nötropenik hastalar ile organ nakil alıcıları gibi invazif aspergilloz riski yüksek olan hasta grubunda aspergilloz tanısını doğrulamaktadır (Risum vd., 2020; Hsu vd., 2022; Dagenais and Keller, 2009; Tümbay, 2021: 335-362; Sığ ve Arıkan, 2019; Patterson vd., 2016). Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Aspergillus* türlerinin tür düzeyinde tanımlanması epidemiyolojik olarak da anlamlı olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; solunum yolu örneklerinde *A. fumigatus*, *A.*

flavus ve *A. terreus* türleri etken olma oranı istatistiksel olarak daha belirgin olarak bildirilmesine rağmen, *A. niger* invazif aspergilloz etkeni olarak nadiren sorumlu tutulmaktadır (Dagenais and Keller, 2009; Sığ ve Arıkan, 2019; Risum vd., 2020; Hsu vd., 2022; Tümbay, 2021: 335-362). Çalışmamızda; *Aspergillus spp.* olarak tanımlanmış olan 125 izolatin, %56,8'inin (71) solunum yolu (bronkoalveoler lavaj (BAL), endotrakeal aspirasyon (ETA), balgam ve burun sinüs içeriği gibi), %20'sinin (25) doku, %13,6'sının (17) apse, %5,6'sının (7) kornea apsesi ve %4'ünün (5) diğer örneklerden (bos, plevra gibi vücut sıvıları, kateter vs.) izole edildiği saptanmıştır. *A. fumigatus* izolatlarında azol direncini tespit etmek için başta solunum yolları (BAL, ETA, balgam ve burun sinüs içeriği gibi) örnekleri olmak üzere çeşitli klinik (kornea apsesi, apse, doku gibi) örneklerden izole edilmiştir. İzolatların çoğu %56,8 gibi yüksek bir oranda solunum yolları örneklerine ait olması, *Aspergillus spp.* türlerinin hava yolu ile bulaşan bir etken olması nedeniyle doğaldır. Enfeksiyonun ana bulaş yolu, fungal konidilerin solunması yoluyla solunum yoludur. *Aspergillus* türlerinin diğerlerinin sporlarına göre *A.fumigatus* sporları havada fazla sayıda bulunabilmekte ve az bir hava akımında dahi kolaylıkla havaya saçılmakta ve yayılmaktadır. 2-3 µm olan spor çapları ile bunlar alt hava yollarına kolayca ulaşır. Bu nedenle üreyen *Aspergillus spp.* türlerinden en yaygın tanımlanan tür *A.fumigatus*'tur (Dagenais and Keller, 2009). Solunum yolunda sıklıkla üreyen küfler özellikle de hava yolu örneklerinde %16 ila %56,7'sinde bulunan *A. fumigatus* ile kolonize olmaktadır (Pihet ve ark., 2009). Çalışmamızda; *A. fumigatus* %60 ile solunum sistemi için ana enfeksiyöz ajan olarak bulunmuş, bunu % 19.26 ile *A. flavus* ve %14.07 ile *A. niger* ve *A. terreus* %2,22 değerleri ile izlemiştir.

2020 yılında 1083 örnek ile yürütülen bir çalışmada örneklerin büyük çoğunluğunun burun/sinüs (1609/1820) ve kulak örnekleri (182/1820) dahil olmak üzere hava yollarından kaynaklandığı, azole dirençli *A. fumigatus* izolatlarının prevalansının üst solunum yollarından alınan örneklerde, trakeal aspirat ve alt solunum yolu örneklerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Risum vd., 2020). 2022 yılında Tayvan'da yapılan bir diğer çalışmada ise; *A. fumigatus* olarak tanımlanan 113 izolat balgam (n = 58), bronş lavajı (n = 39), yara (n = 10), derin doku (n = 4) ve kornea (n = 2) gibi klinik örneklerden izole

edilirken, çalışılan örneklerin çoğunluğunu solunum yolu örnekleri oluşturmuştur (Hsu vd., 2022).

Yapılan çalışmalarda, *Aspergillus* izolatlarının çoğu (n=135, %86.54), derin alt solunum yollarından alınan balgam (n=123, %78.85) ve BAL (n=12, %7.69) dahil olmak üzere solunum örneklerinden elde edilmiştir. Ancak, solunum dışı sistemlerde, *A. fumigatus* dışı *Aspergillus* türleri %66 oranında baskın olarak bildirilmiştir (Wang vd., 2022). Çalışmamızda ise, solunum dışı sistemlerde, *A. fumigatus* dışı *Aspergillus* türleri Wang ve ark.'nın çalışması ile benzer bir şekilde %65 oranında bulunmuştur.

A. fumigatus izolatları ile yapılan çeşitli çalışmalarda en yüksek direnç oranı ITR'de görülmüştür. Aspergilloz infeksiyonlarında azol grubu antifungaller tedavinin temelidir. *Aspergillus*'da ilk azol direnci, 1997 yılında ITR tedavisi alan hastalardan bildirilmiştir (Denning vd., 1997; Chryssanthou, 1997; Verweij vd., 2016; Arikan-Akdagli, 2012). Azole dirençli izolatların başlıca yaygınlığı, Birleşik Krallık'ta en yüksek yaygınlık ile Avrupa ülkelerinde bildirilmiştir. Asya'da Tayvan, Japonya, Çin ve Hindistan'da daha düşük azol direnci oranları bildirilmiştir. Bu ülkelerde bildirilen direnç oranlarının çoğu %10'un altındadır. (Rivero-Menendez vd., 2016; Garcia-Rubio vd., 2017; Hsu vd., 2022).

Birleşik Krallık'ta 2009 yılında yapılan bir çalışmada, *A. fumigatus* (n=519) koleksiyon kökeninin 34'ünde (%6.5) ITR direnci saptanmıştır, 22 izolat VOR'a ve 25 izolat POS'a karşı çapraz direnç göstermiştir (Howard vd, 2009). Danimarka'da *A. fumigatus* ile kolonize olmuş hastalardan izole edilen 133 izolatın % 4.5 (6 izolatın) azollere direnç oranına sahip olduğu saptanmıştır (Arendrup vd., 2010).

Almanya'da 2010 - 2013 yılları arasında, hastaların solunum örneklerinden izole edilen 573 *A. fumigatus* izolatı azol direnci açısından taranmış ve 6 izolatta yüksek düzey ITR direnci olduğunu ve azollere direnç oranını %5,2 olarak bildirilmiştir (Bader vd., 2013).

Hollanda'da 7 farklı merkezin katıldığı bir çalışmada 2007 - 2009 yılları arasında farklı türlere ait 2062 klinik *Aspergillus* izolatının ITR direnci için tarandığı çalışmada, 1792 *A. fumigatus* izolatında ITR direnç prevalansı %5.3 olarak bildirilmiştir (Van der Linden, 2011). Hollanda'da 2010-2013 yılları

arasında ise; izole edilen 952 *A. fumigatus* izolatının 364'ünde (%38.2) azol direnci saptanmıştır (Van Ingen, 2015).

Fransa'da 2010- 2011 yılları arasında, hastaların %4.6'sının (6/131 hasta) azol direnç oranı ve TR34/L98H mutasyonu saptanmıştır (Chowdhary vd., 2015). Fransa'da yapılan bir başka çalışmada ise ITZ direnç prevalansı %8 olarak bildirilmiştir (Garczewska vd., 2016).

Danimarka'da 2018–2020 yılları arasındaki iki yıllık veriler ile *A. fumigatus* kolonize ve enfekte hastalarda azole dirençli *A. fumigatus* izolatlarının prevalansının ve direncinin belirlendiği çalışmada, azole dirençli izolatların oranını %6,5 (119/1820) olarak bildirmiştir. İzolatların %5,9'unda (108/1820) itrakonazol direnci ve %5,6'sında (102/1820) vorikonazol direnci bulunmuştur (Risum vd.,2020). Ülkemizde yapılan bir çalışmada Doğan ve ark.ları klinik *A. fumigatus* izolatlarında azol direncini değerlendirdiği çalışmasında 11 izolatta (%2.3) itrakonazole direnç bildirilmiştir (Doğan vd., 2020).

ABD'den klinik örneklerde 2.138 *A. fumigatus* izolatu tür dağılımı ve antifungal duyarlılıkları açısından değerlendirilmiş, *A. fumigatus*'ta azol direnci oranı %3,05 ile %4,07 arasında değiştiği ve bunun oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Badali vd., 2022).

Wang ve ark.1; *Aspergillus* türlerinde azole direnç oranını %5,79 (6/121) ve *A. fumigatus*'ta %4,11 (3/73) olarak bildirilmiştir (Wang vd., 2022). Çin'den bildirilen klinik *A. fumigatus* izolatlarında azol direnç oranı % 3,6'dır (4/111) (Su vd., 2021). Wu ve ark.ları, 2020'de Tayvan'da (2011-2018 yıllarında), (19/375) klinik izolatların azol direnç oranını %5,1 olarak bildirmiştir. (Wu vd., 2020). Tayvan'daki 2022 yılında *A. fumigatus*'un azole dirençli suşlarda cyp51A'daki mutasyonlar tespit edilmiştir. Azole dirençli izolatların genel prevalansı %1,77 bulunmuştur (2/113)(Hsu vd., 2022).

7 Afrika ülkesinden 2000 ve 2021 yılları arasında 1686 çevresel ve 46 klinik örnekten oluşan triazole dirençli *A. fumigatus* içeren çalışmalarında, çevresel ve klinik ortamlarda sırasıyla %17,1 (66/387) ve %1,3 (5/387) ITR, VOR ve POS dirençli olduğu bildirilmiştir. Test edilen izolatlar, yüksek MIC'lerle birlikte ITC, VRC ve POS'a çoklu triazol direnci göstermiştir (Amona vd.,2022).

Denardi ve ark. (Denardi vd., 2018), ITR dirençli *A. fumigatus* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada, azoller için gradient test yöntemiyle broth mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırmışlardır. *A. fumigatus* ITR'e dirençli suşlarda broth mikrodilüsyonu ve E-test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldığında antifungal duyarlılık sonuçları yüksek derecede uyumluluk gösterdiği bildirilmiştir. *A. fumigatus* izolatlarının MİK özellikleri broth mikrodilüsyon ve E-test arasındaki uyum yüzdesi, VOR için %100, ITR için %93,3 uyum oranlarıyla, azoller arasında önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Denardi vd., 2018). ITR ve POS için sonuçlar daha çok inkübasyon süresine bağlı; *A. fumigatus* için ITR 24 saatte (%90,3) ve POS 48 saatte (%95,2) daha iyi uyum gösterdiği bildirilmiştir (Denardi vd., 2018). Çalışmanın sonuçları, E-test'in azoller açısından *A. fumigatus* için güvenilir ve tekrarlanabilir bir duyarlılık testi olduğunu ve burada elde edilen EUCAST broth mikrodilüsyon bulgularıyla uyumlu olarak ITR direncinin tespit edilebildiğini doğrulamıştır (Denardi vd., 2018). Pfaller ve ark. CLSI broth mikrodilüsyon ile E-test arasındaki uyumu 376 *Aspergillus* izolatı ile değerlendirmiş ve VOR ve ITR için her iki yöntem arasında sırasıyla %97,6 ve %95,8 uyum tespit etmişlerdir (Pfaller vd., 2003). Lamoth ve Alexander ise 74 *A. fumigatus* izolatı içeren 290 klinik küf örneğini değerlendirdiği çalışmasında, VOR ve POS için her iki yöntem arasındaki uyumu VOR ve POS için sırasıyla %95 ve %89 uyum gösterdiğini bildirmiştir (Lamoth and Alexander, 2015). 2021 yılında ülkemizden Korkmaz, klinik *Aspergillus* izolatlarının antifungal duyarlılıklarını gradient test yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırdığı çalışmasında, uyum oranlarını VOR ve ITR için sırası ile %99.1 ve %87.8 olarak saptamıştır. Sonuç olarak Korkmaz, saptanan yüksek temel ve kategorik uyum oranlarına göre gradient test yönteminin, broth mikrodilüsyon yöntemine iyi bir alternatif olabileceğini bildirmiştir (Korkmaz, 2021).

Asya ve Batı Pasifik Bölgesi'nden *Aspergillus* türleri de dahil olmak üzere farklı fırsatçı filamentli mantar patojenlerine karşı CLSI yöntemi ile belirlenen azollerin in vitro aktivitesini, SENTRY Antifungal Gözetim Programının 2011–2019 yılları arasında broth mikrodilüsyon yöntemi ile elde ettiği verilerde, ITR MIC50/90 değerlerini *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* için 0.5/1 µg/ml ve *A. niger* için 1/2 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* NWT izolatlarının (ECV'lerin üzerindeki MİK'ler) genel sıklığı ITR

için sırasıyla %2.1, %0, 0 ve %2.2 olarak bulunmuştur (Pfaller vd., 2021). 2010–2017 yılları arasında Avrupa, Kuzey Amerika, Latin Amerika ve Asya-Pasifik'ten 1775 izolatını analiz eden başka bir büyük ölçekli çalışmada *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* için broth mikrodilüsyon yöntemi ile benzer MIC 50/90 sonuçları bildirilmiştir (Pfaller vd., 2021). Ayrıca *A. fumigatus*'un NWT izolatlarının genel bir sıklığını ITR için %0,9 olarak bildirilmiştir. Ayrıca Avrupa, diğer bölgelerle (%0,0-0,7) karşılaştırıldığında ITR için en yüksek NWT oranlarını (%1,7) sergilemiştir (Nargesi vd., 2022).

Jørgensen ve ark.nın 2019 yılında yapılan çalışmasında VOR için *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A.nidulans* ve *Aspergillus spp.* izolatları için broth mikrodilüsyon yöntemiyle MİK50 değerlerini sırasıyla 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5/1 µg/ml, 1 µg/ml, 0.25/0.5 µg/ml ve 0.25/8 µg/ml olarak, ITR için sırasıyla 0.25 µg/ml, 0,25 µg/ml, ≤0.125/0.25 µg/ml, 1 µg/ml, ≤0.125/0.5 µg/ml ve ≤0.125/>16 µg/ml olarak, POS için sırasıyla 0.125 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.06/0.5 µg/ml ve 0.06/>4 µg/ml olarak bildirilmiştir (Jørgensen vd., 2019).

İran'dan yakın zamanda broth mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan bir başka çalışmada ise; *A. fumigatus* ve *A. niger* için ITR'nin MIC/MIC 50/90 değerleri 4/≥8 µg mL⁻¹ (her biri) ve *Aspergillus spp.* için 0.5/1 µg/ml olarak bildirilmiştir (Badiee vd., 2022).

Çalışmamızda gradient test (E-test) yöntemi ile 125 *Aspergillus spp.* izolatından 8 (% 6,4) izolatta VOR, ITR, POS için MİK değerleri yüksek saptanmıştır. Tür düzeyinde incelediğimizde ise; 55 *A. fumigatus* izolatından 1'inde (%1,8) VOR'e direnç, 3'ünde (%5,45) ITR'e direnç, 1'inde (%1,8) POS'e direnç saptanmış olup, bu izolatlardan 1'inin (%1,8) tüm azollere dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 6 *A. terreus* izolatından 1'inde (%16,7) VOR 1 µg/ml, 4 *A. niger* izolatından 1'inde (%25) ITR 2 µg/ml, 18 *Aspergillus spp.* izolatından 1'inde (%5,6) VOR 1,5 µg/ml, 1 'inde (%5,6) >32 µg/ml, ITR 1'inde (%5,6) 4 µg/ml, POS ise 2 izolatta (%11) 0,5 µg/ml ve 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Azol grubu antifungallere direnç en sık *A. fumigatus*'ta tespit edilmiş ve ITR'de tespit edilen azol direnç oranı VOR ve POS'e göre daha fazladır. *A. fumigatus* için ITR'de %5,45'lik direnç oranı ve kriptik türlerde tespit edilen direnç oranı çalışmalar ile benzer şekilde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda gradient test yöntemiyle 48. saat ITR *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A.niger* ve *Aspergillus spp.* izolatları için MİK90 değerlerini sırasıyla 1 µg/ml, 0.75 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0,75 µg/ml ve 0,75 µg/ml olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise; Korkmaz 2021 yılında *Aspergillus* türleri için broth mikrodilüsyon yöntemiyle 48. saat ITR *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için MİK90 değerlerini sırasıyla 2 µg/ml, 1 µg/ml ve 1 µg/ml olarak bulmuştur (Korkmaz, 2021). *A. fumigatus*, *A. flavus* ve *A. terreus* izolatları için 2007 yılındaki çalışmasında Efe'nin yaptığı çalışmada broth mikrodilüsyon yöntemiyle ITR MİK90 değerlerini sırasıyla 1 µg/ml, 1 µg/ml ve 0.25 µg/ml olarak (Efe, 2007); 2002 yılında yaptıkları çalışmada Espinel-Ingroff ve ark. ise ITR MİK90 değerlerini aynı sırayla 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml ve 0.25 µg/ml olarak bulmuştur (Espinel-Ingroff vd., 2002). Yapılan çalışmalarda tüm *Aspergillus* türlerinde ITR'ün MİK90 değerlerinde yükseklik bildirilmiş olup, çalışmamızda da ITR için MİK değerlerinde yükseklik literatürde yapılan çalışmaları ile benzerdir.

Çalışmamızda gradient test yöntemiyle 48. saat VOR *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A.niger* ve *Aspergillus spp.* izolatları için MİK90 değerlerini sırasıyla 0.38 µg/ml, 0.38 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.5 µg/ml ve 0.5 µg/ml olarak bulunurken, gradient test yöntemiyle 48. saat POS *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A.niger* ve *Aspergillus spp.* izolatları için MİK90 değerlerini sırasıyla 0.19 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.064 µg/ml, 0.19 µg/ml ve 0.19 µg/ml olarak bulunmuştur. VOR ve POS için MİK90 değerleri normal sınırlar içerisinde saptanmıştır.

Tür düzeyinde incelediğimizde, *A. fumigatus* izolatları için çalışmamızda VOR MİK90 değeri 0.38 µg/ml saptanırken, 2021 yılında Korkmaz'ın çalışmasında 0.25 µg/ml bulunmuştur. *A. fumigatus* için ülkemizde yapılan çalışmalarda broth mikrodilüsyon yöntemiyle 48. saatte; VOR, ITZ ve POS ile saptanan MİK50 değerleri sırasıyla 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml ve 0.125 µg/ml olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da VOR, ITZ ve POS için saptanan sırasıyla MİK50 değerleri 0.19 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.094 µg/ml ve sırasıyla MİK90 değerleri 0.38 µg/ml, 1 µg/ml, 0.19 µg/ml olarak bulunmuştur. Erdem'in çalışmasında VOR, ITZ ve POS broth mikrodilüsyon yöntemiyle ile saptanan sırasıyla MİK90 değerleri 1 µg/ml, 0,5 µg/ml ve 0.125 µg/ml olarak bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda *A. fumigatus* için azol grubu antifungallerden en yüksek MİK değerine ITR'de rastlanırken, Erdem'in çalışmasında VOR'de rastlanmıştır (Erdem, 2018). Özmerdiven ise çalışmalarında *A. fumigatus* için VOR ve ITR broth mikrodilüsyon yöntemiyle ile saptanan sırasıyla MİK50 değerlerini 8 µg/ml ve >16 µg/ml olarak; MİK90 değerlerini ise sırasıyla 8 µg/ml ve >16 µg/ml olarak bulmuş olup, bu MİK50 ve MİK90 değerleri bizim çalışmamızdan oldukça yüksektir (Özmerdiven, 2014). Özmerdiven ve ark. tarafından 2015 yılında Bursa'dan bildirilen bir çalışmada klinik *A. fumigatus* izolatlarında %10.2 oranında ITR direnci bildirilmiş ve ITR dirençli suşlar, VOR de dirençli bulunmuştur. Tıbbi azollerde dirençli bulunan izolatlar, zirai azollerde de yüksek MİK değerleri saptanmış ve zirai azollerin dirençli *A. fumigatus* izolatlarının yayılmasında önemli rolü olabileceğini belirtmişlerdir (Özmerdiven vd., 2015).

A. fumigatus klinik izolatlarında azol direncinin erken tespitini sağlayacak stratejiler önemlidir. Azole dirençli *A. fumigatus* ile enfekte olmuş hastalardaki ölüm oranları, azol'e duyarlı izolatlarla enfekte olmuş kişilere göre önemli ölçüde daha yüksektir (Lestrade vd.,2018; Lestrade vd., 2019). *Aspergillus spp.* gibi küf türlerinde antifungal duyarlılık için CLSI (M38-A2) ve EUCAST (E.Def 9.4), çok merkezli çalışmalar sonucunda referans broth mikrodilüsyon yöntemini geliştirmiş olmasına rağmen, bu yöntemin zahmetli olması, çok zaman alması ve tecrübe istemesi nedeniyle basit, hızlı, uygun maliyetli duyarlılık yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur (Arendrup vd., 2017; Guinea vd.; 2018). Antifungal direnç tespiti ve MİK değerlerinin belirlenebilmesi için gradient test (e-test) yöntemi geliştirilmiş ve pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen gradient test yöntemi ile ilgili onaylanan standart bir klavuz bulunmadığından, antifungal duyarlılık testinin doğrulama için tekrarlanması gerekmektedir (Arendrup vd., 2017; Guinea vd.; 2018). EUCAST, ortak bir çalışma ile *A. fumigatus*'ta azol grubu antifungal ajanlar için; 48 saatte sonuç veren ve klinik mikoloji laboratuvarlarında uygulanması daha kolay olan ve uygun maliyet sağlayan agar plak yöntemini önermiştir (EUCAST, E.Def 10.1). Bu standart yöntem, rutin klinik mikoloji laboratuvarlarında ITR, VOR veya POS dirençli *A. fumigatus* izolatlarının fenotipik tespiti için tasarlanmıştır (EUCAST, E.Def 10.1). Guinea ve ark.nın, dört kuyucuklu azol içeren agar plakaları kullanılarak *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinin (ITR 4 mg/L), (VOR 2 mg/L), (POS 0,5 mg/L) saptanmasına

yönelik E.Def 10.1 tarama prosedürüne ilişkin çalışmasında; klinik *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinin saptanmasında bu kullanımı kolay tarama prosedürü ile mikrobiyoloji laboratuvarının günlük rutininde hızlı sonuca olanak sağlayacağı ve daha erken uygun tedaviyi kolaylaştıracağı bildirilmiştir (Guinea vd.; 2018). Ayrıca Cyp51A geninde G54, N284, M220 ve V101F (G54E/R/V/W, G54R+N284K, M220I/K/T/V, M220I+V101F) mutasyonlarını barındıran dirençli *A. fumigatus* suşları saptamak için agar tarama yönteminin genel duyarlılığı ve özgülüğü, TR34/L98H ve TR46/Y121F/T289A CYP51A mutasyonları sırasıyla %99 (%97-%100 aralığı) ve %99 (%95-%100) bulunmuştur (Arendrup vd., 2017).

Aspergillus türlerinde azol içeren agar plak yönteminin uygulanması, azol direncinin kolay ve güvenilir bir şekilde rutin olarak tespit edilmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda verilerin çoğu *Aspergillus* türlerinden *A. fumigatus* ile sınırlıdır. Genel *Aspergillus* türleri ve direnç gelişimi üzerine veriler ise çok azdır. Agar plak kullanımı ilk olarak Van der Linden ve diğerleri tarafından önerilmiştir ve o zamandan beri çeşitli çevresel ve klinik çalışmalarda kullanılmıştır (Van der Linden vd., 2015; Chowdhary vd., 2015; Mortensen vd., 2010).

EUCAST E.Def 9.4 prosedürlerinde; azol grubu antifungaller için teknik belirsizlik alanına (ATU) düşen MIC'lere yorumu şu şekilde yapılmıştır: ITR ve VOR (MIC=2 µg/ml), POS (MIC=0,25 µg/ml) izolat aynı zamanda itrakonazole dirençli ise) yeni bir yorum getirilmiştir. Prosedürlerdeki bu yeni yoruma göre; *A. fumigatus*'un vahşi tip popülasyonları için ITR, VOR için epidemiyolojik eşik değeri ≤1 µg/ml olarak belirlenmiştir. *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinin taranması için kesin belge olarak 2018'de yayınlanan EUCAST E.DEF 10.1 standart yöntemi, tüm *Aspergillus spp.* izolatlarına azol direncini taramak için kullanılmıştır ve *A. fumigatus* izolatlarındaki gibi güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (EUCAST E.Def 9.4 ve 10.1). Bizim çalışmamızda, test prensibi olarak ITR (4 mg/L), VOR (2 mg/L) ve POS (0,5 mg/L) ile desteklenmiş agarlar ve ilaçsız agar kontrol kuyucuğu içeren plaklar kullanılmış ve genel *Aspergillus spp.* türlerine uygulanmıştır.

Berkow ve ark.nın antifungal duyarlılık testlerini güncel yaklaşımları değerlendirdiği çalışmasında, azole dirençli *Aspergillus* taraması için basit bir

agar büyüme testinin bulunması, duyarlılık testlerinin daha yaygın hale gelmesine olanak sağlayacağını belirtmektedir (Berkow vd., 2020). Çalışmamızda agar plak tarama yönteminde ise 125 *Aspergillus spp.* izolatından 4 (% 3,2) izolatta VOR'e, 3 (%2,4) izolatta ITR'e ve 3 (%2,4) izolatta POS'e direnç saptanmıştır. Tür düzeyinde incelediğimizde ise; 55 *A. fumigatus* izolatından 1'inde (%1,8) VOR, ITR ve POS'e direnç ile tüm azollere direnç saptanırken, 6 *A. terreus* izolatından 1'inde (%16,7) VOR'e direnç, 4 *A. niger* izolatında 1'inde (%25) ITR'e direnç, 18 *Aspergillus spp.* izolatından 2'sinde (%11) VOR'e ve POS'e, 1'inde (%5,6) ITR'e direnç belirlenmiştir. (EUCAST 10.1).

Çalışmamızda EUCAST'in *A. fumigatus*'ta azol grubu antifungal ajanlar için önerdiği agar plak yöntemini genel *Aspergillus spp.* türlerine uygulayarak elde ettiğimiz sonuçlarımızı gradient test ile karşılaştırdığımızda; agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'e dirençli saptanan 1 *A. fumigatus* izolatı gradient test ile de dirençli tespit edilmiş, agar plak tarama yönteminin *A. fumigatus* türlerinde duyarlılığı ve özgüllüğü VOR ve POS için %100 saptanmıştır. Gradient test yöntemi ile ayrıca 2 *A. fumigatus* izolatında daha ITR'e direnç saptanırken, bu izolatlarda agar plak tarama yöntemi ile direnç tespit edilmemiş, agar plak tarama yönteminin *A. fumigatus* türlerinde ITR için duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %33,3 ve %100 saptanmıştır. *A. flavus* izolatları agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS duyarlı saptanırken, gradient test yöntemi ile 1 izolatta POS 0,25 µg/ml tespit edilmiş, agar plak tarama yönteminin *A. flavus* türlerinde ITR için duyarlılığı ve özgüllüğü %100 saptanmıştır. *A. terreus* izolatlarından 1'i agar plak tarama yöntemi ile VOR'e dirençli saptanırken, bu izolatta gradient test ile MİK değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca agar plak tarama yöntemi ile ITR ve POS duyarlı saptanırken, gradient test yöntemi ile duyarlı tespit edilmiş, agar plak tarama yönteminin *A. terreus* türlerinde ITR ve POS için duyarlılığı ve özgüllüğü %100 saptanmıştır. *A. niger* izolatlarından 1'i agar plak tarama yöntemi ile ITR'e dirençli saptanırken gradient test yöntemi ile MİK değeri 2 µg/ml) saptanmıştır. *Aspergillus spp.* izolatlarından 2'si agar plak tarama yöntemi ile VOR'e dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değeri 1,5 µg/ml ve >32 µg/ml) saptanmıştır. ITR'e agar plak tarama yöntemi ile 1 izolat dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değeri 4 µg/ml saptanmıştır. POS'e agar plak tarama yöntemi ile

2 izolat dirençli tespit edilirken, gradient test yöntemi ile MİK değerleri 0,5 µg/ml ve 8 µg/ml saptanmıştır. Çalışmamızda gradient test yöntemi ile *Aspergillus spp.* için, EUCAST (EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 ve E.Def 11.0) prosedürlerini kullanan antifungal ECOFF'lar ve duyarlılıklar klinik sınır değerleri kullanılarak yorumlanmıştır. EUCAST rehberlerinin son düzenlemelerinde (Version 3.0, 2022-01-18); *A. fumigatus*'un ITR ve VOR'e ait direnç sınır değeri 2 µg/ml'den 1 µg/ml olarak revize edilmiştir. *A. flavus* ve *A. terreus*'un ITR'e ait direnç sınır değeri 2 µg/ml'den 1 µg/ml olarak revize edilmiştir. *A. fumigatus* için tasarlanan agar plak yönteminin, tüm *Aspergillus* türlerine uyguladığımızda yüksek MİK değerleri olan izolatları belirleyebildiği, ancak EUCAST rehberlerinin son düzenlemelerine (Version 3.0, 2022-01-18) göre gradient test direnç sınırları bildirilen izolatlarda sınır değerlerin güncellenmiş olmasına rağmen agar plak tarama yönteminde (EUCAST 10.1) güncellenme olmaması nedeniyle uyumsuzluklar saptanmıştır. Agar plak tarama yönteminin VOR, ITR VE POS için ilaç hazırlama konsantrasyonlarının EUCAST 10.2 rehberindeki direnç sınır değerlerine göre güncellendiğinde daha uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda agar plak tarama yönteminin MİK değerlerinin belirlenememesi ve kalitatif sonuç vermemesi gibi dezavantajları vardır.

İspanya'da Serrano-Lobo ve ark.nın yaptığı çalışmada, klinik *A. fumigatus* ve kriptik tür izolatlarında agar tarama yöntemi ile ITR'e %39,2, VOR'e %54,5 ve POS'e %41,3 direnç bildirilmiştir. Araştırmacılar agar tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllük değerlerini sırasıyla %100 ve %93,3 saptayarak, azole duyarlı ve azol dirençli klinik *A. fumigatus* izolatlarını ayırt etmek için uygun bir tarama yöntemi olduğu sonucuna varmışlardır. Azol içeren agar plakalar, *A. fumigatus*'ta direncin taranması için kullanışlı ve güvenilir bir araç olarak bulunmuş, ancak kriptik türlere karşı performansı çok daha düşük olduğu bildirilmiştir (Serrano-Lobo vd., 2021).

Arendrup ve ark. çalışmalarında, azole duyarlı olmayan izolatlar için E.Def 9.3.1 belgesine göre referans mikro broth dilüsyon testi ile doğrulamanın önemini belirtmiştir (Arendrup vd., 2015). Agar plak ile direncin saptanması durumunda doğrulama için referans MIC testi yapılmalıdır (Ullmann vd., 2018). Çalışmamızda *Aspergillus* izolatları; ITR, VOR ve POS'e karşı in vitro antifungal

duyarlılığı agar plak ve gradient test yöntemlerinde, 24. ve 48. saatte yapılan okumalar kaydedilmiştir. Agar plak ve gradient test yöntemleri ile dirençli bulunan kökenlere kontrol için CLSI M38-A2 klavuzundaki önerileri doğrultusunda broth mikrodilüsyon yöntemi çalışılmıştır. Çalışmamızda gradient test ve/veya agar plak tarama yöntemi ile dirençli bulunan 7 izolattan *A. fumigatus* olarak tanımlanan 3 izolatin; 2'si agar plak tarama yöntemi ile duyarlı saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ITR'e dirençli, 1'i agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a dirençli saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile VOR ve ITR'e dirençli saptanmıştır. İzolatlardan *A. terreus* olarak tanımlanan 1 izolat agar plak tarama yöntemi ile VOR'e dirençli saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı saptanmıştır. *A. niger* olarak tanımlanan 1 izolat agar plak tarama yöntemi ile ITR'e dirençli saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile ITR için MİK değeri 4 µg/ml saptanmıştır. *Aspergillus spp.* olarak tanımlanan 2 izolattan 1'i agar plak tarama yöntemi ile VOR, ITR ve POS'a dirençli saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR için >32 µg/ml, ITR için 8 µg/ml, 1'i agar plak tarama yöntemi ile VOR ve POS'e dirençli saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri VOR için 8 µg/ml, ITR için 2 µg/ml, POS için 4 µg/ml saptanmıştır. İzolatlardan *A. fumigatus* olarak tanımlanan 1 izolat agar plak tarama yöntemi ile duyarlı saptanırken, broth mikrodilüsyon yöntemi ile de duyarlı saptanmıştır. Çalışmamızda agar plak tarama yöntemi ile elde ettiğimiz veriler broth ile mikrodilüsyon yöntemi verileri ile bazı izolatlar için uyumluluk gösterirken, bazılarında uyumsuzluk mevcuttur. Özellikle agar plak tarama yöntemi ile duyarlı saptanan izolatların broth mikrodilüsyon yöntemi ile dirençli saptanması, ayrıca agar plak tarama yöntemi ile dirençli saptanan izolatların broth mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı saptanması da söz konusudur. Bu sonuçlardaki uyumsuzluğun sebebinin ise *Aspergillus spp.* türlerinde MİK sınır değerlerinin EUCAST rehberlerinin son düzenlemelerinde (Version 3.0, 2022-01-18) güncellenmesine rağmen agar plak yöntemi için değişiklik yapılmamasına bağlı olduğu ve bu yöntemle doğru sonuçlar elde edebilmek için güncel sınır değerler ile uyumlu agar plak tarama yönteminin VOR, ITR VE POS için ilaç hazırlama konsantrasyonlarının güncellenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Jørgensen ve ark.nın 2019 yılında yapılan çalışmasında, *A. fumigatus* izolatları için, ITR (4 mg/litre), VOR (1 mg/litre) ve POS (0,5 mg/litre) ile desteklenmiş RPMI %1640-2 glukoz agar içeren dört kuyucuklu bir plaka kullanılarak EUCAST E.Def 10.1'e göre azol direnci açısından tarandığı çalışmasında, *A. fumigatus* izolatlarının 30/322'si (%9,3) dirençli olarak sınıflandırılırken, 10/322'si (%3,1) yabancı olmayan tip olarak ve üç (%15) *A. fumigatus* izolatu itrakonazole karşı çapraz dirençli olarak (MIC \geq 16 μ g/ml) sınıflandırılmıştır. Bu izolatlardan ikisinde Cyp51A değişiklikleri ve aynı zamanda POS ve VOR (MIC sırasıyla \geq 4 mg/litre ve 2 mg/litre) veya yalnızca POS (M220K; MIC \geq 4 mg/litre) karşı çapraz direnç saptanmıştır. MİK değerleri $>$ 2 mg/litre olan 10 *A. fumigatus* izolatının tümü ITR, POS ve VOR dirençli ve bu izolatların sekizinde (%80) Cyp51A değişiklikleri saptanmıştır (Jørgensen vd.,2019).

Azollere direnç, CYP51A geninde nokta mutasyonları ve belirli kodonlarda (örn. G54E, G138, G448S ve M220K vd.) amino asit değişiklikleri ile gelişebilir. CYP51A içindeki nokta mutasyonlarına ek olarak, bu izolatlar ayrıca CYP51A geninin promotör bölgelerinde ekspresyon artışına neden olan tekrarlar sahiptir (örn. TR 34 /L98H, TR 46 /Y121F/T289A, TR34 3 /L98H, TR 46 3 /Y121F/M172I/T289A/G448S). Antarktika hariç yedi kıtanın tamamından, *A. fumigatus*'ta spesifik moleküler mekanizmalar TR 34 /L98H veya TR 46 /Y121F/T289A'ya bağlı azol direnci rapor edilmiştir (Van der Linden, 2011; Bader vd., 2013; Vermeulen vd., 2013; Özmerdiven vd., 2015; Rivero-Menendez vd., 2016; Garcia-Rubio vd.,2017; Wu vd., 2020; Hsu vd., 2022; Wang vd., 2022; Ener vd., 2022).

2007 yılında Hollanda'da, daha önce hiç azol tedavisi almamış hastalar dahil 9 hastanın 13 izolatıyla yapılmış ve bunların 12'sinde baskın direnç mekanizmasının TR34/L98H olduğu bildirilmiştir (Verweij vd., 2007). 2009 yılında yapılan çalışmada, azol dirençli izolatlarda TR34/L98H ve diğerlerinde hedef enzimde yapısal değişikliklere yol açan 4 tanesi yeni olmak üzere 18 farklı aminoasit değişikliği saptanmıştır (Howard vd, 2009). Hollanda'da 2010-2013 yılları arasında ise; izole edilen 952 *A. fumigatus* izolatının 225'inin (%62) TR34/L98H, 98'inin (%27) ise TR46/Y121F/T289A mutasyonuna sahip olduğu, 39 (%10.5) izolatın cyp51A geninde direnci açıklayacak hiçbir mutasyon

taşımadığı, diğer 2 izolatın ise *cyp51A* geninin dirençle ilişkili diğer mutasyonları taşıdığı gösterilmiştir (Van Ingen, 2015). Belçika ve Hollanda'da, 2014 yılında ilk defa panazol dirençli suşlarda TR46/Y121F/T289A mutasyonu saptanmıştır (Vermeulen vd., 2012; Van der Linden vd., 2013).

Danimarka'da *A. fumigatus* ile kolonize olmuş hastalardan izole edilen 133 izolatın *cyp51A* geninin TR/L98H, TR/L98H/S297T/F495I, M220K, M220I/V101F ve Y431C mutasyonlarını taşıdıkları saptanmıştır. Azol grubu antifungallere dirençli bu 6 izolata sahip hastaların tamamının öncesinde azol kullanım öyküsü olduğu belirtilmiştir (Arendrup vd., 2010). Danimarka'da, azol kullanmamış hastalardan izole edilen *A. fumigatus* TR 46 /Y121F/T289A ve TR 34 /L98H mutasyonunun klinik numunelerden ilk tespiti 2014 yılında yapılmıştır (Astvad vd., 2014).

Almanya'da 2010 - 2013 yılları arasında yapılan bir çalışmada *A. fumigatus* izolatlarının TR34/L98H mutasyonunu taşıdığı saptanmıştır. Dirençli suş saptanan hastaların %52,9'unda *cyp51A* geninde mutasyon saptamışlardır (Bader vd., 2013).

Fransa'da 2010- 2011 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise, hastaların %4.6'sının (6/131 hasta) azol dirençli izolatlarla kolonize olduğu ve TR34/L98H mutasyonu taşıdığı saptanmıştır (Chowdhary vd., 2015). Fransa'da yapılan bir başka çalışmada ise ITZ direnç prevalansı %8 olarak bildirilmiştir (Garczewska vd., 2016).

ABD'den klinik örneklerde 2.138 *A. fumigatus* izolatı tür dağılımı ve antifungal duyarlılıkları açısından değerlendirilmiş CYP51A geninde azol direnci ile ilişkili amino asit değişikliklerine yol açan mutasyonlar, dirençli veya vahşi tip olmayan izolatların %75,3'ünde bulunmuştur. Çok sayıda izolatta mutasyonlar belirlenmesine rağmen promotör bölgesinde tandem tekrarları tespit edilmemiştir (Badali vd., 2022).

Wang ve ark.1; azole dirençli *A. fumigatus*'ta *cyp51A* geninin üç mutant lokusu TR46/Y121F/T289A olarak tanımlanmıştır (Wang vd., 2022). Çin'den bildirilen *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinde TR 34 /L98H/S297T/F495I, baskın direnç mekanizması olarak bildirilmiştir ve bunu TR 34 /L98H takip etmiştir. Çoğunlukla bir *cyp51A* tek nokta mutasyonu barındıran TR aracılı

olmayan TRAF izolatları, TR aracılı dirençli izolatlardan daha fazla genetik çeşitlilik göstermiştir (Su vd., 2021). Tayvan'daki 2022 yılında *A. fumigatus*'un azole dirençli suşlarında, cyp51A'da TR 34 /L98H ve TR 34 /L98H/S297T/F495I mutasyonları belirlenmiştir. VOR orta derecede duyarlı bir suş ise, kodlama bölgelerinde nokta mutasyonları nedeniyle beş amino asit ikamesi (F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K) bulunmuş ve üç suşta üç farklı mutasyon paterni tespit edilmiştir (Hsu vd., 2022).

Afrika'da TR 34 /L98H, TR 46 /Y121F/T289A, G54E, F46Y/M172V/E427K ve M172V olmak üzere beş farklı cyp 51A mutasyonu bildirilmiştir. TR 34/ L98H, TR 46 ile Afrika izolatları /Y121F/T289A ve G54E mutasyonları yakından ilişkiliydi ve iki kümeden birinde (küme-B) gruplandırılabilirken, cyp 51A -M172V mutasyonu çoğu cyp 51A-WT suşu (küme-A) ile kümelenmiştir. Moleküler epidemiyolojideki bu benzerlikler, uzak bölgelerden direnç özellikleri taşıyan izolatların olası göçünü akla getirmektedir. TR 34 /L98 mutasyonunu barındıran tüm Afrika TRAF izolatları ITR'e dirençli bulunmuştur. TR 34 /L98H, Afrika'daki klinik hastalarda bulunan tek dirençli mekanizma olarak bildirilmiştir. Cyp51A genindeki beş mutasyon, Afrika'da dirençli mekanizma olarak rapor edilmiştir (Amona vd.,2022).

İran'da ITR dirençli *A. fumigatus*'un farklı klinik izolatlarında, genomik değişikliklerin tam bir haritasını elde etmek için cyp51A, cyp51B, Cdr1B, AtrR, Hmg1, HapE ve FfmA genlerindeki mutasyonu tam genom dizileme (WGS) tekniği ile değerlendirmişler ve bu gen lokuslarında farklı isimli mutasyonlar bulmuşlardır. ITR MİK değeri 16 µg mL⁻¹'in üzerinde olan *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* ve *A. terreus* suşlarında cyp51A ve cyp51B genleri polimorfizm oluşturabilmektedir. İran'dan gelen ilk rapor olan bu çalışmada ayrıca *Aspergillus* izolatlarını incelemek için cyp51 olmayan gen lokuslarını mutasyonlar açısından değerlendirmiş ve farklı izolatlarda çok sayıda mutasyon gözlemlemiştir (Nargesi vd., 2022).

Ülkemizdeki çalışmalar incelendiğinde, Özmerdiven ve ark. tarafından 1999-2012 yılları arasında Bursa'dan bildirilen bir çalışmada *A. fumigatus* izolatlarında %10.2 oranında itrakonazol direnci bildirilmiş ve dirençli izolatların %86.8'inde TR34/L98H mutasyonu saptamıştır. İtrakonazol dirençli suşlar, vorikonazole de dirençli bulunmuştur (Özmerdiven vd., 2015). Doğan ve ark.ları

linik ve çevresel *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinin fenotipik ve genotipik olarak değerlendirdiği çalışmasında, 11 izolatta (%2.3) itrakonazole direnç bildirirken, cyp51A geninde mutasyon saptanmamışlardır (Doğan vd., 2020). Ener ve ark.1 ise, 2022 yılında çevresel örneklerde *A. fumigatus* izolatlarında %1,3 ve klinik örneklerde (n=392) ise %3,3 oranında direnç ve cyp51A geninde %47,4 TR34/L98H mutasyonu tespit etmişlerdir (Ener vd., 2022).

Çalışmamızda azollere direnç saptanan izolatlarda CYP51A geninde azol direnci ile ilişkili aminoasit değişikliklerine yol açan nokta mutasyonlar araştırılmış ve cyp51A genindeki CypA-L98H nokta mutasyonu 6 izolatta ve CypA-M220 nokta mutasyonu 7 izolatta tespit edilmiştir (

). *A. fumigatus*, *A.niger* ve *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan (H23) izolatlarda, CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonlarının her ikisi de tespit edilmiştir. *A. pseudoglaucus* olarak tanımlanan ve VOR için MİK değeri >32 µg/ml, ITR için MİK değeri 4 µg/ml olan H3 izolatında CypA-M220 mutasyonu tespit edilip, CypA-L98H mutasyonu tespit edilmemiştir. *A. terreus* olarak tanımlanan ve ITR'e duyarlı olup MİK değeri 1 µg/ml olan H64 izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmemiştir.

Arendrup ve ark.ları çalışmalarında CYP51A gen dizilimi ile dirençli *A. fumigatus* izolatlarını saptamak için ITR (4 mg/L), VOR (2 mg/L) ve POS (0.5 mg/L) içeren 4 kuyucuklu azol içeren agar plakalar kullanmış ve azol agar tarama yönteminin genel duyarlılığı ve özgüllüğü, TR34/L98H ve TR46/Y121F/T289A CYP51A mutasyonlarını taşıyan izolatlarda %99 olarak bulunmuştur. ITR içeren agar, G54, M220 ve TR 34 /L98H mutantlarını tanımlamıştır. Buna karşılık, VOR içeren agar, %9 TR 34 /L98H, %76 M220 ve hemen hemen tüm G54 mutantları (%97) tanımlanamamıştır(Arendrup vd., 2017).

Spiess ve ark.1 çalışmasında; klinik örneklerden *cyp51A* geninde doğrudan azol direncini tespit ettikleri çalışmasında, bir *A. fumigatus* izolatında TR değişikliğiyle birlikte L98H mutasyonu, azole dirençli bir izolatta ise M220T değişikliği tespit edilmiştir (Spiess vd., 2012). Garcia-Rubio ve ark.1 çalışmalarında, VOR ve POS'de görülen yüksek MİK değerinde ve ITR direncinde M220 mutasyonu belirlemiştir (Garcia-Rubio vd., 2017). Garcia-Effron ve ark. *A. fumigatus*'ta triazol antifungal direncinin tespit edildiği çalışmasında, L98H mutasyonunun tek başına azol direncine aracılık etmediğini ancak TR değişikliği ile kombinasyon halinde anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (Garcia-Effron G, vd., 2008). Çalışmamızda *A. fumigatus* izolatlarında Cyp51A gen bölgesinde CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmiştir.

A. terreus izolatlarında (n=26) azol direnç mekanizması üzerine geniş kapsamlı bir çalışmada; *cyp51A* geni T650C, A649G, G1030A ve A956G amino asit dizilerinde değişiklikler tespit edilmiştir (Zoran vd., 2018). *A. terreus* izolatında (n=12) yapılan bir çalışmada da, D344N'deki ikameler iki izolatta ve M217I bir izolatta ve iki *A. terreus* izolatı arasında sadece AR2 izolatı, *cyp51A* ve *cyp51B* genlerinde nokta mutasyonu bildirilmiştir (Rivero-Menendez vd., 2019). Çalışmamızda agar plak yöntemi ile VOR'de agar plakta üreme tespit

edilen *A. terreus* izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmemiştir.

A. niger ile ilgili 2022 yılında Nargesi ve ark.'nın tüm genomun analizini yaptıkları çalışmalarında ise, cyp51A ve cyp51B genlerinde tespit edilen 15 sessiz mutasyon dışında, cyp51A ve cyp51B genlerinde sırasıyla 3 ve 2 değiştirme mutasyonu tespit edilmiştir. Ek olarak, cyp51B geninde mutasyon bulunmamasına rağmen *A. tubingensis*'te (AT1 ve AT2 izolatları) cyp51B geninde sırasıyla 20 ve 21 sessiz mutasyon saptamışlardır (Nargesi vd., 2022). *A. niger* izolatlarında yapılan bir çalışmada, bir sınıftaki cyp51A geninde mutasyonla ilişkili azol direnci bildirmezken, diğer sınıfın *A. niger* izolatlarında altı değiştirme mutasyonu meydana geldiği bildirilmiştir ve gen mutasyonları üzerine yapılan çalışmada, ilgili kuşaklarda çelişkiler göstermiştir (Howard vd., 2011). Çalışmamızda MİK değerlerinde artış belirlenen *A. niger* izolatında CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmiştir.

Çalışmalarda, kriptik türlerin sadece klinik vakalarda yayılmadığını, aynı zamanda genomik kompozisyonlarında azol direncine yol açan nokta mutasyonlarının yüksek oranda olduğunu bildirilmektedir (Nargesi vd., 2022). Bizim çalışmamızda da kriptik türlerden *A. pseudoglaucus* izolatının birinde CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmiş, birinde ise CypA-M220 mutasyonu tespit edilmesine rağmen CypA-L98H mutasyonu tespit edilmemiştir.

TR34/L98H değişimi ile ortaya çıkan dirençte, hedef modifikasyonu ve buna bağlı ilaç enzim etkileşimi bozulmasının yanı sıra, promotor bölgedeki 34 baz çiftlik bölgenin çift kopya oluşu rol oynamaktadır (Verweij vd.,2009). Cyp51A geninde azol direnci ile ilişkili bilinen nokta mutasyonlardan M220, ilacın enzime bağlanma bölgesi gibi ilaç enzim ilişkisinin önemli olduğu bölgelerde meydana gelmektedir. Bu bölgelerde mutasyon oluştuğunda azol grubu antifungaller lanosterol demetilaz enzimiyle etkileşmemekte; bu durum hastanın kliniğine izole ITR, POS veya VOR direnci ya da tüm azollere karşı panazol direnci olarak yansıyabilmektedir (Hagiwara vd., 2016). Çalışmamızda *A. fumigatus* izolatlarında tespit edilen M220 mutasyonu, Türkiye'den bildirilen ilk nokta mutasyondur.

Yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmaya devam etmektedir ve azollerin aspergilloz tedavisindeki rolünü tehlikeye atarak klinik sonuçları doğrudan etkilemektedir (Wang vd., 2022). Türkiye'ye ait bu konu ile ilgili epidemiyolojik veriler sınırlı sayıdadır. Azole direnç sürveyans programları azdır ve ülkemizde ve dünya genelinde azole dirençli vakaların yaygınlığına ilişkin veriler *A. fumigatus* ile çok sınırlıdır. *Aspergillus* türlerine ait verilere ihtiyaç vardır. Aspergilloz prevalansı coğrafi olarak değişken olması ile bu konuda dağılımı belirlemek için her coğrafi bölgeden verilere ihtiyaç duyulması bizi bu konuda antifungal duyarlılık ve direnç çalışmaya yönlendirmiştir.

Ülkemizde küf üremeleri takip edilen hastaların klinik örneklerinden izole edilen *Aspergillus* izolatlarında pan-azole dirençli izolat ve ITR dirençli suşların varlığının belirlenmiş olması önemli bir endişe konusudur. Tedaviye cevap alınamadığı durumlarda antifungal duyarlılık testi çalışılması çok önemli olmakla birlikte azol grubu antifungallere karşı direncin belirlenmesi için daha pratik, maliyeti düşük ve uygulaması kolay direnç tarama yöntemi kullanılmasına ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aspergilloz günümüzde farklı risk gruplarında artan sıklıklarda görülmeye başlayan ve yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlardır. Aspergilloz vakalarındaki dünya çapındaki artış göz önüne alındığında, hastalığa neden olan ajanı tür düzeyinde belirlemek, hem tanısal zorlukları hem de yüksek mortalite oranları nedeniyle önem taşımaktadır. Bu çalışmada *Aspergillus spp.* izolatlarında tür dağılımı belirlenmiş ve literatür ile uyumlu olarak *A. fumigatus* suşlarının baskın olduğu görülmüştür. *A. fumigatus* suşlarında azol direnci son zamanlarda, tedavi başarısızlığının bir nedeni olarak giderek daha fazla bildirilmektedir. *Aspergillus spp.* türlerinde ilaç direncinin ortaya çıkması, küresel halk sağlığı sorunudur ve klinik pratikte endişe verici bir konudur.

Aspergilloz enfeksiyonu açısından yüksek risk taşıyan ve uzun süreli tedavi gerektiren hastalar için azoller tedavinin temelidir. Yüksek riskli gruplarda antifungal profilaksi aspergillozu önleyebilir. Azole dirençli aspergilloz enfeksiyonlarında uygun tedavi için in vitro antifungal duyarlılık testleri ile direncin belirlenmesi gerekir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında azole dirençli *Aspergillus spp.* vakaların hızlı tespiti için rutin olarak direnç taramasının yapılması önerilmektedir. Klinik *Aspergillus spp.* izolatlarında azol direncinin saptanmasına yönelik kullanımı kolay tarama prosedürü, mikrobiyoloji laboratuvarının günlük rutininde hızlı test yapılması ile erken zamanda uygun tedavi kolaylaştıracaktır.

Çalıştığımız iki antifungal duyarlılık yöntemi agar plak (EUCAST 10.1) ve gradient test yöntemini karşılaştırdığımızda uyumlu bulunmuştur, ancak agar plak ilaç konsantrasyonlarının EUCAST rehberlerinin son düzenlemelerinde (Version 3.0, 2022-01-18) rehberi ile uyumlu olarak güncellenmesi gerekmektedir. Böylelikle *Aspergillus spp.* türleri için kullanılan agar plak yöntemi, rutin kullanımda hızlı, pratik ve güvenilir olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolayca uygulanabilir. Azol direncinin güvenilir bir şekilde saptanması ve hastanın daha erken uygun tedaviden fayda sağlamanın yanında

daha fazla laboratuvar azol direncini tarayacağından, daha fazla direnç saptanabilir ve özellikle taramanın yaygın olmadığı alanlarda, azol direncinin epidemiyolojisi üzerinde etkileri olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre azol grubu antifungallere direnç oranı %5,6 saptanmıştır ve *Aspergillus spp.* izolatlarında azol direnci ile en sık ilişkilendirilmiş olan Cyp51A gen bölgesinde CypA-L98H ve CypA-M220 mutasyonları tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda ülkemizde *Aspergillus spp.* türleride azol direncinin kazanılmasıyla ilgili olabilecek cyp51A'da görülen mutasyonların tespiti ile farklı bölgeler arasındaki dağılımların belirlenebileceği düşünülmüştür. Ayrıca invaziv enfeksiyon etkeni olan *Aspergillus spp.* izolatlarında azol direncinin gözlenmesi, aktif sürveyans çalışmalarının gerekliliğine işaret etmiş, *Aspergillus spp.* türlerinde azol grubu antifungallerin sürekli sürveyans çalışmaları, hızlı duyarlılık testinin önemini göstermiş ve agar plak tarama yönteminin azol direncinin belirlenmesinde uygulanabileceğini düşündürmüştür.

VII. KAYNAKÇA

KİTAPLAR

DAVİSE H. LARONE (2002). **Medically İmportant Fungi**. İdentification of fungi in culture; 293.

LARONE DH. (2011). **Medically İmportant Fungi: A Guide to İdentification.**, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. (2010). **Tıbbi Mikrobiyoloji** Başustaoğlu AC(çeviren) 6.Baskı, Ankara: Atlas.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA. (2016). **Medical Microbiology**. Çeviren: Us D, Başustaoğlu A. Tıbbi Mikrobiyoloji. 7. Basım, Pelikan Kitabevi, İstanbul; s:605-618.

TÜMBAY E. (2021). **Tıbbi Mikoloji** 1.Baskı, İzmir: Gilead.

YÜCESOY M. (2009). Antifungal Ajanlara Direnç Mekanizmaları. İçinde Başustaoğlu A. (Ed.). **Klinik Mikrobiyoloji**. 9. Baskı. Ankara. Atlas Kitapçılık. 1961-1970.

MAKALELER

ABDOLRASOULİ, A.; RHODES, J.; BEALE, M.A.; HAGEN, F.; ROGERS, T.R.; CHOWDHARY, A.; MEİS, J.F.; ARMSTRONG-JAMES, D.; FİSHER, M.C. (2015). Genomic context of azole resistance mutations in *Aspergillus fumigatus* determined using whole-genome sequencing. **MBio**, 6, e00536.

ALVAREZ-MORENO C, LAVERGNE RA, HAGEN F, MORİO F, MEİS JF, LE PAPE P. (2017). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. **Sci Rep.**; 7:45631.

- AMORÌM A, GUEDES-VAZ L, ARAUJO R. (2010). Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. **Int J Antimicrob Agents.**;35: 396-399.
- ARAUJO R, PÌNA-VAZ C, RODRÌGUES AG, AMORÌM A, GUSMAO L. (2009). Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. **Clin Microbiol Infect.**; 15:260-266.
- ARENDRUP MC, MAVRÌDOU E, MORTENSEN KL, SNELDERS E, FRÌMODT-MØLLER N, KHAN H, et al. (2010). Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. **PLoS One**; 5(4):e10080.
- ARENDRUP MC, VERWEÌJ PE, MOUTON JW, LAGROU K, MELETÌADÌS J. (2017). Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **J Antimicrob Chemother**;72:3325e33.
- ARENDRUP MC, VERWEÌJ PE, MOUTON JW, LAGROU K, et al. (2018). Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **J Antimicrob Chemother.**;73(8):2274.
- ARENDRUP M, MELETÌADÌS J, MOUTON J, et al. (2015). EUCAST definitive document E.Def 9.3.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.[http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/ susceptibility_testing_of_moulds](http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_moulds).
- ARÌKAN-AKDAGLÌ S. (2012). Azole resistance in *Aspergillus*: global status in Europe and Asia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**; 1272:9-14.
- ARÌKAN-AKDAGLÌ S, GHANNOUM M, MEÌS J. (2018). Antifungal Resistance: Specific Focus on Multidrug Resistance in *Candida auris* and Secondary Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**; 4:129.

- ASTVAD KMT, JENSEN RH, HASSAN TM, MATHIASSEN EG, THOMSEN GM, PEDERSEN UG, CHRISTENSEN M, HILBERG O, ARENDRUPA MC. (2014). First Detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H Alterations in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment. **American Society for Microbiology; Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 5096 –5101.
- BADALI H, VAEZI A, HAGHANI I, YAZDANPARAST SA, HEDAYATI MT, MOUSAVI B, et al. (2013). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. **Mycoses.**; 56(6):659-663.
- BADALI H, CAÑETE-GIBAS C, MCCARTHY D, PATTERSON H, SANDERS C, P. DAVID M, MELE J, FAN H, WIEDERHOLDA N (2022). Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of *Aspergillus* Section Fumigati Isolates in Clinical Samples from the United States. **J Clin Microbiol.**: 10.1128/jcm.00280-22. Volume 60, Issue 5.
- BADDLEY JW, MARR KA, ANDES DR, WALSH TJ, KAUFFMAN CA, KONTOYIANNIS DP, et al. (2009). Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. **J Clin Microbiol.**; 47(10):3271-3275.
- BADER O, WEIG M, REICHARD U, LUGERT R, KUHNS M, CHRISTNER M et al. (2013). *cyp51A*-Based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**:57;3513-3517.
- BADIEE, P.; BOEKHOUT, T.; ZAREI MAHMOUDABADI, A.; MOHAMMADI, R.; AYATOLLAHI MOUSAVI, S.A.; NAJAFZADEH, M.J.; SOLTANI, J.; HASHEMI, J.; DIBA, K.; GHADIMI-MOGHADAM, A.; et al. (2022). Multicenter Study of Susceptibility of *Aspergillus* Species Isolated from Iranian University Hospitals to Seven Antifungal Agents. **Microbiol Spectr.** 10, e0253921.

- BALAJEE SA, GRIBSKOV J, BRANDT M, ITO J, FOTHERGILL A, MARR KA. (2005). Mistaken identity: *Neosartorya pseudofisherii* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol.**; 43:5996-5999.
- BALAJEE SA, NICKLE D, VARGA J, MARR KA. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. **Eukaryot Cell.**; 56:477-86.
- BALAJEE SA, KANO R, BADDLEY JW, MOSER SA, MARR KA, ALEXANDER BD, ANDES D, KONTOYIANNIS DP, PERRONE G, PETERSON S, BRANDT ME, PAPPAS PG, CHILLER T. (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. **J Clin Microbiol** 47: 3138–3141.
- BARNEL-MARTÍNEZ L, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, CUENCA-ESTRELLA M. (2016). **Future Microbiology**. Diagnostics and susceptibility testing in *Aspergillus*.; 11:315-28.
- BERKOW EL, LOCKHART SR, OSTROSKY-ZEICHNER L. (2020). Antifungal susceptibility testing: Current approaches. **Clin Microbiol Rev.**;33(3):1–30.
- BROWN GD, DENNING DW, GOW NA, LEVITZ SM, NETEA MG, WHITE TC. (2012). Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med.**; 4(165):165rv113.
- BUEID A, HOWARD SJ, MOORE CB, RICHARDSON MD, HARRISON E, BOWYER P, et al. (2010). Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. **J Antimicrob Chemother.**; 65(10):2116-2118.
- BUIJ JB, VAN DER LEE HAL, RIJS AJMM, ZOLL J, et al. (2017). Single-center evaluation of an agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* by using VIPcheck. **Antimicrob Agents Chemother.**;61(12):1–9.

- BURGEL PR, BAIXENCH MT, AMSELLEM M, AUDUREAU E, CHAPRON J, KANAAN R ve ark. (2012). High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. **Antimicrob Agents Chemother.**;56(2): 869-874.
- CANNON RD, LAMPING E, HOLMES AR, NIIMI K, BARET PV, KENIYA MV, et al. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev.**; 22(2):291-321.
- CHEN SCA, SORRELL TC, MEYER W. (2015). *Aspergillus* and *Penicillium*. İçinde Jorgensen JH, Pfaller MA (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press 11th Edition. 2030- 2056.
- CHOWDHARY A, KATHURIA S, XU J, SHARMA C, SUNDAR G, SINGH PK. (2012). Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. **PLoS One.**; 7(12):e52871.
- CHOWDHARY A, SHARMA C, KATHURIA S, HAGEN F, MEIS JF. (2013). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. **J. Antimicrob Chemother.**; 69(2):555-557.
- CHOWDHARY A, KATHURIA S, XU J, MEIS JF. (2013). Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS Pathog.**; 9:e1003633.
- CHOWDHARY A, SHARMA C, KATHURIA S, HAGEN F, MEIS JF. (2015). Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. **Frontiers in Microbiology.**:6;428.
- CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J.F. (2017). Azole-resistant aspergillosis: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J. Infect. Dis.**, 216, S436–S444.

- CHRYSSANTHOU E. (1997). In Vitro Susceptibility of Respiratory Isolates of *Aspergillus* species to Itraconazole and Amphotericin B. Acquired Resistance to Itraconazole. **Scand J Infect Dis.**; 29(5):509-512.
- DAGENAIS TR, KELLER NP. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clin Microbiol Rev.**; 22(3): 447-465
- DENARDI LB, KELLER JT, DE AZEVEDO MI, OLIVEIRA V, et al. (2018). Comparison between etest and broth microdilution methods for testing itraconazole-resistant *Aspergillus fumigatus* susceptibility to antifungal combinations. **Mycopathologia**;183(2):359–70.
- DENG, S.; ZHANG, L.; JI, Y.; VERWEIJ, P.E.; TSUI, K.M.; HAGEN, F.; HOUBRAKEN, J.; MEIS, J.F.; ABLIZ, P.; WANG, X.; et al. (2017). Triazole phenotypes and genotypic characterization of clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in China. **Emerg. Microbes Infect.**, 6, e109.
- DENNING DW, VENKATESWARLU K, OAKLEY KL, ANDERSON MJ, MANNING NJ, STEVENS DA et al. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**; 41:1364-1368.
- DENNING DW, RADFORD SA, OAKLEY KL, HALL L, JOHNSON EM, WARNOCK DW. (1997). Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. **J Antimicrob Chemother**; 40:401–414.
- DENNING DW. Invasive aspergillosis. (1998) **Clin Infect Dis.**;781-805.
- DENNING DW, PARK S, LASS-FLORL C, FRACZEK MG, KIRWAN M, GORE R, et al. (2011). High-frequency triazole resistance found In nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. **Clin Infect Dis. : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**; 52(9):1123-1129.
- DENNING DW (2022). Antifungal drug resistance: an update. **Eur J Hosp Pharm.**; 29(2):109–12.

- DE VALK HA, KLAASSEN CHW, YNTEMA JB, HEBESTREÏT A, SEÏDLE M, HAASE G ve ark. (2009). Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis.**;8;110-114.
- DÍAZ-GUERRA TM, MELLADO E, CUENCA-ESTRELLA M, RODRÍGUEZ-TUDELA JL. (2003). A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**; 47:1120-4.
- DİKEREL Ş, OTAĞ F, ASLAN G, ÜLGER M, EMEKDAŞ G. (2012). Klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların iki farklı yöntemle tanımlanması ve duyarlılık sonuçları. **Mikrobiyol Bül.**; 46:65-78.
- DOĞAN Ö, GÜLMEZ D, ARIKAN-AKDAĞLI S. (2020). Phenotypic and genotypic evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from clinical and environmental specimens. **Mikrobiyol Bul.**; 54: 291–305.
- DONNELLY JP, CHEN SC, KAUFFMAN CA, STEINBACH WJ, BADDLEY JW, VERWEIJ PE, et al. (2020). Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. **Clin Infect Dis.**;71(6):1367-76.
- DUONG TN, LE TV, TRAN KH, NGUYEN PT, NGUYEN BT, NGUYEN TA et al. (2021). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* is highly prevalent in the environment of Vietnam, with marked variability by land use type. **Environ Microbiol.**;23(12):7632–42.
- ENER B, ERGİN Ç, GÜLMEZ D, AĞCA H, TİKVEŞLİ M et al. (2022). Frequency of azole resistance in clinical and environmental strains of *Aspergillus fumigatus* in Turkey: a multicentre study. **J Antimicrob Chemother**; 77: 1894–1898.
- ERTURAN Z. (2006). *Aspergillus*'larda Üreme Şekilleri. İçinde Ener B. (Ed.) *Aspergillus*. İstanbul: **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını** No:56;45-52.

- ESPÍNEL-INGROFF A, REZUSTA A. (2002). 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.**;40(6):2101–7.
- ESPÍNEL-INGROFF A. (2003). Susceptibility test methods; yeasts and filamentous fungi. **Manual of clinical microbiology**:1880-1893.
- FELTON IC, SIMMONDS NJ. (2014). *Aspergillus* and cystic fibrosis: old disease- new classifications. **Curr Opin in Pulm Med.**: 20:632-638.
- FISCHER J, VAN KONINGSBRUGGEN-RIETSCHEL S, RIETSCHEL E, VEHRESCHILD MJGT, WISPLINGHOFF H, KRÖNKE M ve ark. (2014). Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus spp.* isolates from German cystic fibrosis patients. **J Antimicrob Chemother**;69:1533-1536.
- GAMS W, CHRISTENSEN M, ONIONS H, PITT I, SAMSON A. (1985). Intrageneric Taxa of *Aspergillus*-Advances in *Penicillium* y *Aspergillus* systematics. **Plenum Press**, New York; p:55-62.
- GARCÍA-EFFRON G, et al. (2008). Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. **J. Clin. Microbiol.** 46:1200 – 1206.
- GARCÍA-RUBÍO R, CUENCA-ESTRELLA M, MELLADO E. (2017). Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. **Drugs**; 77(6):599-613.
- GARCZEWSKA B, JARZYŃKA S, KUS J, SKORUPA W, AUGUSTYNOWICZ-KOPEC E. (2016). Fungal infection of cystic fibrosis-single center experience. **Pneumonologia i Alergologia Polska.**:84;151-159.
- GEORGIADOU SP, KNTOYIANNIS DP. (2012) The impact of azole resistance on aspergillosis guidelines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**;1272:15-22.

- GHANNOUM MA, EDWARDS KE, EDWARDS JE JR. (1995) Pathogenesis of fungal infections. Baillière's Clinical Infectious Diseases'de. **Ed.F.Meunier.;** 2; 1-16.
- GHANNOUM MA, RICE LB. (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev.;** 12(4):501-517.
- GIBBONS JG, ROKAS A. (2013). The function and evolution of the Aspergillus genome. **Trends Microbiol.;**21(1):14- 22.
- GREGG KS, KAUFFMAN CA (2015). Invasive aspergillosis: epidemiology, clinical aspects, and treatment. **In: Semin Respir Crit Care Med.;** 36(5) 662- 672.
- GONCALVES, S.S.; SOUZA, A.C.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J.F.; COLOMBO, A.L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus. **Mycoses.**
- GÖTTINGEN, GERMANY (2000). Interdisciplinary forum on aspergillosis **Mycology Newsletter;** 1: 9-16.
- GUEGAN, H.; PRAT, E.; ROBERT-GANGNEUX, F.; GANGNEUX, J.P. (2021). Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: A Five-Year Follow Up Experience in a Tertiary Hospital With a Special Focus on Cystic Fibrosis. **Front. Cell Infect. Microbiol.,** 10, 613774.
- GUÍNEA, P.E. VERWEIJ, J. MELETIADIS, J.W. MOUTON, F. BARCHIESI, M.C. (2018). How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in Aspergillus fumigatus isolates using four-well azole-containing agar plates. **Clin Microbiol Infect;** 25(6): 681-7.
- GUPTA P, KHARE V, KUMAR D, AHMAD A, et al. (2015). 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.;**9(1):DC04-7.

- GÜRCAN Ş, TİKVEÇLİ M, ERYILDIZ C, EVCİ C, ENER B. (2010). İnvazif Aspergillozlu olgulardan izole edilen *Aspergillus* spp. suşlarının antifungal duyarlılıkları. **Mikrobiyol Bül.**; 44:273-278.
- HAGİWARA D, WATANABE A, KAMEİ K, GOLDMAN GH. (2016). Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi. **Front Microbiol.**; 7: 1382.
- HEDAYATİ M, PASQUALOTTO A, WARN P, BOWYER P, DENNING D. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**; 153(6):1677-1692.
- HEDAYATİ MT, ARMAKİ MT, CHARATİ JY, HEDAYATİ N., SEYEDMOUSAVİ S., DENNING DW (2018). Burden of fungal infections in Iran. **J. Enfeksiyon geliştirici denemeler.**; 12 :910–918. doi: 10.3855/jidc.10476.
- HODIAMONT CJ, DOLMAN KM, TEN BERGE IJ, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE, PAJKRT D. (2009). Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. **Med Mycol.**; 47(2):217-220
- HOWARD SJ, CERAR D, ANDERSON MJ, ALBARRAG A, FİŞHER MC, PASQUALOTTO AC, et al. (2009). Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. **Emerg Infect Dis.**; 15(7):1068-76.
- HOWARD SJ, ARENDUP MC. (2011). Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. **Medical Mycology**: 49;90-95.
- HOWARD, S.J.; HARRİSON, E.; BOWYER, P.; VARGA, J.; DENNING, D.W. (2011). Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 55, 4802–4809.
- HSU TH, HUANG PY, FAN YC AND SUN PL (2022). Azole Resistance and cyp51A Mutation of *Aspergillus fumigatus* in a Tertiary Referral Hospital in Taiwan. **J. Fungi**, 8, 908.

- HUYGENS S, DUNBAR A, BUIÏ JB, KLAASSEN CHW, VERWEÏ PE, DÏJK K, JONGE N, JANSSEN JJWM, VELDEN WJFM, BIEMOND BJ VD. (2023). Clinical impact of PCR-based *Aspergillus* and azole resistance detection in invasive aspergillosis. A prospective multicenter study. **Clinical Infectious Diseases**, ciad141.
- JØRGENSEN KM, ASTVAD KMT, HARE RK, ARENDRUP MC. (2019). EUCAST Susceptibility Testing of Isavuconazole: MIC Data for Contemporary Clinical Mold and Yeast Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**; Jun 24;63(6):e00073-19.
- JOHNSON EM, CAVLÏNG-ARENDRUP M. (2015). Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. İçinde Jorgensen JH, Pfaller MA (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press 11th Edition. 2255- 2281.
- KONTOYÏANNÏS DP, MARR KA, PARK BJ, ALEXANDER BD, ANAÏSSÏE EJ, WALSH TJ, et al. (15 Nisan 2010). Hematopoyetik kök hücre nakli alıcılarında invaziv mantar infeksiyonları için ileriye dönük sÏrveyans, 2001-2006: **Transplant Klinik Enfeksiyon Dis.**; 50(8):1091-100.
- KOSMÏDÏS C, DENNING DW. (2015) The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**; 70(3): 270-7.
- KUÏPERS S, BRUGGEMANN RJ, DE SEVAUX RG, et al. (2011). Failure of posaconazole therapy in a renal transplant patient with invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* with attenuated susceptibility to posaconazole. **Antimicrob Agents Chemother**; 55:3564-6.
- LAMOTH F, ALEXANDER BD (2015). Comparing Etest and Broth Microdilution for Antifungal Susceptibility Testing of the Most-Relevant Pathogenic Molds. **J Clin Microbiol.**; 53(10):3176-81.
- LASS-FLØRL C. (2010). In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. **Future Microbiology**.;5(5):789-799.

- LATGÉ JP. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev.**; 2: 310-350.
- LESTRADE PP, VAN DER VELDEN, BOUWMAN F, et al. (2018). Epidemiology of invasive aspergillosis and triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with haematological malignancies: a single-centre retrospective cohort study. **J Antimicrob Chemother**; 73(5): 1389–1394.
- LESTRADE PP, BENTVELSEN RG, SCHAUWVLÏEGHE A, SCHALEKAMP S, VAN DER VELDEN W, KUÏPER EJ, et al. (2019). Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. **Clin Infect Dis.**;68(9):1463-71.
- LESTRADE PPA, MEÏS JF, MELCHERS WJG, VERWEÏJ PE. (2019). Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. **Clin Microbiol Infect**, 25:799–806.
- LELIËVRE L, GROH M, ANGEBAULT C, MAHERAULT A-C, DIDÏER E, BOUGNOUX M-E. (2013). Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. **Med Mal Infect.**; 43(4):139-145.
- LOCKHART SR, FRADE JP, ETÏENNE KA, PFALLER MA, DÏEKEMA DJ, BALAJEE SA. (2011). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. **Antimicrobial Agents Chemother**; 55:4465–4468.
- MAJÏMA H, ARAÏ T, KUSUYA Y, TAKAHASHÏ H, WATANABE A, MÏYAZAKÏ Y, KAMEÏ K (2021). Genetic differences between Japan and other countries in *cyp51A* polymorphisms of *Aspergillus fumigatus*. **Mycoses**, 64(11), 1354-1365.
- MAYR A, LASS-FLÖRL C. (2011). Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease- Review of the literature. **Eur J Med Res.**:16:153-157.
- MEERSSEMAN W, VANDECASTEELE SJ, WÏLMER A, VERBEKEN E, PEETERMANS WE, VAN WÏJNGAERDEN E. (2004). Invasive

aspergillosis in critically ill patients without malignancy. **Am J Respir Crit Care Med.**; 170(6):621-625.

MEIS, J.F.; CHOWDHARY, A.; RHODES, J.L.; FISHER, M.C.; VERWEIJ, P.E. (2016). Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philos Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.**, 371.

MELETIADIS, J.; LETH MORTENSEN, K.; VERWEIJ, P.E.; MOUTON, J.W.; ARENDRUP, M.C. (2017). Spectrophotometric reading of EUCAST antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus*. **Clin. Microbiol. Infect.** 23, 98–103.

MELLADO E, DÍAZ-GUERRA TM, CUENCA-ESTRELLA M, RODRÍGUEZ-TUDELA JL. (2001). Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **J Clin Microbiol.**; 39(7):2431-2438.

MELLADO E, GARCÍA-EFFRON G, ALCAZAR-FUOLÍ L, CUENCA-ESTRELLA M, RODRÍGUEZ-TUDELA JL. (2004). Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother.**; 48:2747-50.

MORIO F, AUBIN GG, DANNER-BOUCHER I, HALOUN A, SACCHETTO E, GARCÍA-HERMOSO D et al. (2012). High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. **J Antimicrob Chemother.**;67:1870-1873.

MORTENSEN KL, MELLADO E, LASS-FLÖRL C, RODRÍGUEZ-TUDELA JL, JOHANSEN HK, ARENDRUP MC. (2010). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. **Antimicrob Agents Chemother.**; 54(11):4545-9.

MORTENSEN KL, JENSEN RH, JOHANSEN HK, SKOV M, PRESSLER T, HOWARD SJ et al. (2011). *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-

- based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. **Journal of Clinical Microbiology**; 49;2243- 2251.
- MÓRICZ Á, FATÉR Z, OTTA K, TYIHÁK E et al. (2007). Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in red paprika. **Microchem J - Microchem J**. Jan 31;85:140–4.
- NABİLİ M, SHOKOHİ T, MOAZENİ M, KHODAVAİSY S, et al. (2016). High prevalence of clinical and environmental triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Iran: is it a challenging issue? **J Med Microbiol**. Jun;65(6):468-475.
- NAGANO Y, ELBORN JS, MILLAR BC. (2010). Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. **Med Mycol.**; 48:166- 76.
- NARGESİ S, VALADAN R, ABASTABAR M, KABOLİ S, THEKKİNİATH J AND HEDAYATİ MT (2022). A Whole Genome Sequencing-Based Approach to Track down Genomic Variants in Itraconazole-Resistant Species of *Aspergillus* from Iran. **J. Fungi**, 8, 1091.
- OAKLEY KL, MORRISSEY G, DENNING DW. (1997). Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother.**; 41:1504-1507.
- ONISHİ K, MUHAMMAD SARUMOH B, HAGİWARA D, WATANABE A, KAMEİ K, TOYOTOME T. (2017). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* containing a 34-bp tandem repeat in *cyp51A* promoter is isolated from the environment in Japan. **Med Mycol J.**;58(2):e67-e70.
- OSHEROV N, KONTOYİANNİS DP. (2017). The anti-*Aspergillus* drug pipeline: Is the glass half full or empty? **Med Mycol.**; 55(1):118-124.
- OZMERDİVEN GE, AK S, ENER B, AGCA H, CİLO BD, TUNCA B, ET AL. (2015) First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. **J Infect Chemother**; 21(8): 581-6.

- ÖZ Y, AKŞİT F, ASLAN M, KAŞİFOĞLU N, KİRAZ N. (2012). Klinik *Aspergillus* izolatları: Tür dağılımı ve antifungal duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesi. **Ankem Derg.**; 26:69-73.
- ÖZKÜTÜK A, ERGON C, METİN DY, YUCESoy M, POLAT SH. (2008). Comparison of disk diffusion, E-test and broth microdilution test in determination of susceptibility of *Aspergillus* species to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. **Journal of Chemotherapy.**; 20:87-92.
- ÖZYARAL O. (2006). *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında basit ve kolay morfolojik kriterler. Ener B.(Editör) *Aspergillus*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını No: 56; 1.Basım. İstanbul, Birmat Matmaacılık. **3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyumu**, Bursa; s:30-41.
- PAPPAS PG, ALEXANDER BD, ANDES DR, HADLEY S, KAUFFMAN CA, FREİFELD A, et al. (15 Nisan 2010). Organ nakli alıcıları arasında istilacı mantar infeksiyonları: **Nakille İlişkili Klinik Enfeksiyon Dis.**;50(8):1101-11.
- PFALLER JB, MESSER SA, HOLLİS RJ, DİEKEMA DJ, et al. (2003). In vitro susceptibility testing of *Aspergillus spp.*: comparison of E-test and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. **J Clin Microbiol.**;41(3):1126-9.
- PFALLER, M.A.; CARVALHAES, C.G.; RHOMBERG, P.; MESSER, S.A.; CASTANHEİRA, M. (2021). Antifungal susceptibilities of opportunistic filamentous fungal pathogens from the Asia and Western Pacific Region: Data from the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2011-2019). **J. Antibiot.** 74, 519-527.
- PFALLER, M.A.; CARVALHAES, C.G.; MESSER, S.A.; RHOMBERG, P.R.; CASTANHEİRA, M. (2021). In vitro activity of posaconazole and comparators versus opportunistic filamentous fungal pathogens globally collected during 8 years. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 101, 115473.

- PASQUALOTTO A.C. (2010). *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Berlin: **Springer**.
- PATTERSON TF. (2010). *Aspergillus species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and practice of infectious disease*. 7th edition. Philadelphia PA: **Churchill Livingstone**. 3241-56.
- PATTERSON TF, THOMPSON GR, DENNING DW, FISHMAN JA, HADLEY S, HERBRECHT R, et al. (2016). Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**; 63(4):e1-e60.
- PERFECT JR. (2016) “Is there an emerging need for new antifungals?”. **Expert Opinion on Emerging Drugs.**; 21(2):129-131.
- PERLİN DS, SHOR E, ZHAO Y. (2015). Update on antifungal drug resistance. **Current clinical microbiology reports** 2:84-95.
- PERLİN DS (2015). Mechanisms of Resistance to Antifungal Agents. İçinde Jorgensen JH, Pfaller MA (Ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press 11th Edition. 2236-2254.
- PERLİN DS, RAUTEMAA-RICHARDSON R, ALASTRUEY-IZQUIERDO A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect Dis**; 17: e383-e392.
- PHAM CD, REISS E, HAGEN F, MEIS JF, LOCKHART SR. (2014). Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. **Emerg Infect Dis.**; 20(9):1498.
- PİHET, M., CARRERE, J., CİMON, B., CHABASSE, D., DELHAES, L., SYMOENS, F., et al. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. *Med. Mycol.* 47, 387–397.
- REISS E, SHADOMY HJ, LYON GM. (2012). **Fundamental Medical Mycology**. Wiley Blackwell.
- REN J, JİN X, ZHANG Q, ZHENG Y, LİN D, YU Y. (2017). Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations

of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. **J Hazard Mater.**; 326:54-60.

RESENDÍZ SHARPE A, LAGROU K, MEİS JF, CHOWDHARY A, LOCKHART SR, VERWEİJ PE. (2018). Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.**; 56(suppl_1):83-92.

RHODES J, ABDOLRASOULİ A, DUNNE K, SEWELL TR, ZHANG Y, BALLARD E et al. (2022). Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. **Nat Microbiol.**;7(5):663–74.

RİSUM M, HARE RK, GERTSEN JB, et al. (2020). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* among Danish cystic fibrosis patients: increasing prevalence and dominance of TR34/L98H. **Front Microbiol.**;11:1850.

RİVERO-MENENDEZ O, ALASTRUEY-IZQUİERDO A, MELLADO E, CUENCA-ESTRELLA M. (2016). Triazole resistance in *Aspergillus* spp.:A worldwide problem? **Journal of Fungi**: 2;21.

RİVERO-MENENDEZ, O.; SOTO-DEBRAN, J.C.; MEDİNA, N.; LUCİO, J.; MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUİERDO, A. (2019). Molecular identification, antifungal susceptibility testing, and mechanisms of azole resistance in *Aspergillus* species received within a surveillance program on antifungal resistance in Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 63, e00865-19.

RUDRAMURTHY SM, PAUL RA, CHAKRABARTİ A., MOUTON JW, MEİS JF (2019). *Aspergillus flavus* tarafından İnvaziv aspergilloz: Epidemiyoloji, tanı, antifungal direnç ve yönetim. **J. Mantarlar**; 5:55.doi: 10.3390/jof5030055.

NARGESİ S, ABASTABAR M, VALADAN R, MAYAHİ S, YOUN JH, HEDAYATİ MT AND SEYEDMOUSAVİ S (2021). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* Targeting the cyp51A Gene. **Pathogens**, 10(10), 1279.

- SANCAK B. (2009). Duyarlılık Test Yöntemleri: Mayalar ve Küfler. İçinde Başustaoglu A. (Ed.). **Klinik Mikrobiyoloji**. 9. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık. 1972-1982.
- SERRANO-LOBO J, GÓMEZ A, RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ B, MUÑOZ P, ESCRIBANO P, GUINEAA J. (2021). Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolate Screening in Azole-Containing Agar Plates. Low Impact of Plastic Trays Used and Poor Performance in Cryptic Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 65:e00482-21.
- SEYEDMOUSAVI S, HASHEMI SJ, ZIBAFAR E, et al. (2013). Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Iran. **Emerg Infect Dis.**; 19:832-3.
- SHAPIRO RS, ROBBINS N, COWEN LE. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev.**; 75:213-67.
- SİLLEY P. (2012). Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? Rev. **Sci. Tech. Off. İnt. Epiz.**: 31;33-41.
- SİNGH, A.; SHARMA, B.; MAHTO, K.K.; MEİS, J.F.; CHOWDHARY, A. (2020). High-Frequency Direct Detection of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* from Patients with Chronic Pulmonary Fungal Diseases in India. **J. Fungi**, 6, 67.
- SNELDERS E, VAN DER LEE HA, KUIJPERS J, RIJS AJM, VARGA J, SAMSON RA, et al. (2008). Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Med.**; 5(11):e219.
- SNELDERS E, RIJS AJ, KEMA GH, MELCHERS WJ, VERWEIJ PE. (2009). Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. **Appl Environ Microbiol.**; 75(12):4053-4057.
- SNELDERS E, CAMPS SM, KARAWAJCZYK A, RIJS AJ, ZOLL J, VERWEIJ PE, et al. (2015). Genotype–phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A *cyp51A* azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol.**; 82:129-135.

- SPIESS B, SEIFARTH W, MERKER N, HOWARD SJ, REINWALD M, DIETZ A, HOFMANN WK, BUCHHEIDTA D (2012). Development of Novel PCR Assays To Detect Azole Resistance-Mediating Mutations of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A Gene in Primary Clinical Samples from Neutropenic Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 56(7):3905–3910.
- STENSVOLD CR, JORGENSEN LN, ARENDRUP MC. (2012). Azole-resistant invasive aspergillosis: Relationship to agriculture. **Curr Fungal Infect Rep.**; 6:178- 191.
- SU H, ZHU M, TSUI CK, LEE H, TEHUPEIORY-KOOREMAN M, ZOLL J, ENGEL T, LI L, ZHU J, LU Z, ZHANG Q, VERWEIJ PE, DENGH S (2021). Potency of Olorofim (F901318) Compared to Contemporary Antifungal Agents against Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates and Review of Azole Resistance Phenotype and Genotype Epidemiology in China. **Antimicrob Agents Chemother.**; 65:e02546-20.
- SUGUI JA, KWON-CHUNG KJ, JUVVADI PR, LATGÉ J-P, STEINBACH WJ. (2015) *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harb Perspect Med.**; 5(2):a019786.
- SUTTON P, NEWCOMBE NR, WARING P, MULLBACHER A. (1994). Immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. **Infect Immun**; 62: 1192-1198.
- TAVAKOLI M., YAZDANI CHARATI J., HEDAYATI MT, MOOSAZADEH M., BADIIE P., SEYEDMOUSAVI S., DENNING DW (2019). İran'da invaziv aspergillozun insidans, prevalans ve engelliliğe göre ayarlanmış yaşam yıllarında Ulusal eğilimler: Sistematik bir derleme ve meta-analiz. **Uzman Rev.Med.**;13:1121–1134. doi: 10.1080/17476348.2019.1657835.
- TSUCHIDO, Y.; TANAKA, M.; NAKANO, S.; YAMAMOTO, M.; MATSUMURA, Y.; NAGAO, M. (2019). Prospective multicenter surveillance of clinically isolated *Aspergillus* species revealed azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34/L98H mutation in the Kyoto and Shiga regions of Japan. **Med. Mycol.**, 57, 997–1003.

- ULLMANN, A.J.; AGUADO, J.M.; ARİKAN-AKDAGLI, S.; DENNING, D.W.; GROLL, A.H.; LAGROU, K.; LASS-FLÖRL, C.; LEWIS, R.E.; MUNOZ, P.; VERWEIJ, P.E.; et al. (2018). Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. **Clin. Microbiol. Infect.**, 24, e1–e38.
- VAN LINDEN JWM, ARENDRUP MC, VERWEIJ PE, et al. (2011). Prospective international surveillance of azole resistance in Aspergillus fumigatus: SCARE-Network. Abstract M-490. In: 51st **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Chicago, IL.
- VAN LINDEN JWM, SNELDERS E, KAMPİNGA GA, et al. (2011). Clinical implications of azole resistance in Aspergillus fumigatus, the Netherlands, 2007- 2009. **Emerg Infect Dis.**; 17:1846-54.
- VAN DER LINDEN JW, CAMPS SM, KAMPİNGA GA, ARENDS JP, DEBETS-OSENKOPP YJ, HAAS PJ, et al. (2013). Aspergillosis due to voriconazole highly resistant Aspergillus fumigatus and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. **Clin Infect Dis.**:an official publication of the Infectious Diseases Society of America; 57(4):513-520.
- VAN DER LINDEN J, ARENDRUP M, WARRİS A, LAGROU K, PELLOUX H, HAUSER P, et al. (2015). Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in Aspergillus fumigatus. **Emerg Infect Dis.**; 21(6):1041-1044.
- VAN DER LINDEN JWM, ARENDRUP MC, MELCHERS WJG, VERWEIJ PE. (2016). Azole Resistance of Aspergillus fumigatus in immunocompromised patients with invasive aspergillosis. **Emerg Infect Dis.** Jan;22(1):158–9.
- VAN INGEN J, VAN DER LEE HA, RİJS TAJ, ZOLL J, LEENSTRA T, MELCHERS WJG, et al. (2015). Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A Aspergillus fumigatus isolates in the Netherlands. **J Antimicrob Chemother.**; 70(1):178-181.

- VERMEULEN E, MAERTENS J, SCHOEMANS H, LAGROU K. (2012). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium. **Euro Surveill.**; 17(48):20326.
- VERMEULEN E, LAGROU K, VERWEIJ PE. (2013). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. **Curr Opin Infect Dis.**;26(6):493–500.
- VERWEIJ PE, TE DORSTHORST DT, RIJS AJ, DE VRIES-HOSPERS HG, MEIS JF, Mycoses DIWPF: (2002). Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. **J Clin Microbiol.**; 40(7):2648-2650.
- VERWEIJ PE, MELLADO E, MELCHERS WJ. (2007). Multiple-triazole-resistant aspergillosis. **N Engl J Med.**; 356(14):1481-1483.
- VERWEIJ PE, HOWARD SJ, MELCHERS WJG, DENNING DW. (2009). Azole- resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. **Drug Resistance Updates.**;12:141-147.
- VERWEIJ PE, SNELDERS E, KEMA GH, MELLADO E, et al. (2009). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? **Lancet Infect Dis.**; 9(12):789–95.
- VERWEIJ P, CHOWDARY A, MELCHERS W, et al. (2016). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? **Clin Infect Dis.**; 62:362-368.
- YENTÜR G, ER B. (2012). The evaluation of the aflatoxin presence in foods. **Turk Hij ve Deney Biyol Derg.**; 69(1):41–52.
- ZHANG J, SNELDERS E, ZWAAN BJ, SCHOUSTRA SE, MEIS JF, VAN DIJK K, et al. (2017). A novel environmental azole resistance mutation in *Aspergillus fumigatus* and a possible role of sexual reproduction in its emergence. **MBio.**; 8(3):e00791-00717.
- ZHOU D, KORFANTY GA, MO M, WANG R, LI X, LI H et al. (2021). Extensive genetic diversity and widespread azole resistance in

greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. **mSphere.**;6(1):e00066-21.

ZORAN, T.; SARTORI, B.; SAPPL, L.; AIGNER, M.; SÁNCHEZ-REUS, F.; REZUSTA, A.; CHOWDHARY, A.; TAJ-ALDEEN, S.J.; ARENDRUP, M.C.; OLIVERI, S. (2018). Azole-resistance in *Aspergillus terreus* and related species: An emerging problem or a rare phenomenon? **Front. Microbiol.**, 9, 516.

WANG Y, ZHANG L, ZHOU L, ZHANG M AND XU Y (2022). Epidemiology, Drug Susceptibility, and Clinical Risk Factors in Patients With Invasive Aspergillosis. **Front. Public Health** 10:835092.

WEI X, ZHANG Y, LU L. (2015); The molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: from bedside to bench and back. **J Microbiol.**; 53(2):91-99.

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

WIEDERHOLD, N.P.; VERWEIJ, P.E. (2020). *Aspergillus fumigatus* and pan-azole resistance: Who should be concerned? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 33, 290–297.

WINTERS B, CUSTER J, GALVAGNO SM JR, COLANTUONI E, KAPOOR SG, LEE H, et al. (Kasım 2012). Yoğun bakım ünitesindeki tanı hataları: otopsi çalışmalarının sistematik bir incelemesi. **BMJ Qual Saf.**;21(11):894-902.

WU, C.J.; LIU, W.L.; LAI, C.C.; CHAO, C.M.; KO, W.C.; WANG, H.C.; DAI, C.T.; HSIEH, M.I.; CHOI, P.C.; YANG, J.L.; et al. (2020). Multicenter Study of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates, Taiwan. **Emerg. Infect. Dis.**, 26, 804–806.

ELEKTRONİK KAYNAKLAR

ASPERGİLLOZ (2018). Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi.

(<http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/ums/a/Aspergilloz.pdf>).

BEYZAENER (2015).
http://fungamentaltoplantilari.org/public/uploads/1/Antifungal_Direnc_Beyza_Ener.pdf.

CENTERS FOR DİSEASE CONTROL AND PREVENTİON (2021). Antifungal-resistant Aspergillus. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/antifungal-resistant.html>.

CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard (CLSI document M38-A2). 2nd ed. www.CLSI.org

DERELİ MD, KOÇ AN, CLSI-EUCAST antifungal duyarlılık testleri standartlarının karşılaştırılması. <http://www.tmc-online.org/?action=sayfa&id=2>.

EUCAST (2018). In: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Agents, Breakpoint tables for interpretation of MICs, Version 90. www.eucast.org

EUCAST (2020). (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents Version 10.0
<http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.

<http://www.broad.mit.edu>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest>

SARAÇLI MA. (2011). **Antifungal duyarlılık testlerinde Etest.**
http://www.tmc-online.org/userfiles/file/konya_adts_sunumlar/2.pdf.

TEZLER

BUEİD A. Laboratory epidemiology and mechanisms of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* (2012). University of Manchester, School of Medicine, Doctoral thesis, Manchester (Advisor: Prof. Dr. David Denning).

- CAMPS S. (2013). *Molecular Mechanisms of Azole Resistance in Aspergillus fumigatus* (Doktora Tezi). Nijmegen: Radboud University.
- EFE Ş. (2007). 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.
- ERDEM K. (2018). Klinik materyallerden ve çevreden izole edilen *aspergillus fumigatus* kökenlerinde olası azol direnci ile ilişkili TR34/L98H ve diğer mutasyonların araştırılması. Tez çalışması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İstanbul.
- GÜNGÖR Ö. (2016). *Aspergillus fumigatus* kompleksi suşlarının identifikasyonu, *aspergillus fumigatus*'da azol direncinin belirlenmesi ve TR/L98H ile ilişkisi. Tez çalışması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul.
- KORKMAZ E. (2021). Sistemik klinik örneklerden üretilen *aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılıklarının farklı yöntemlerle araştırılması. Tez çalışması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İzmir.
- SNELDERS E. (2012). *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Collateral Damage of Fungicide Use*. Doctoral thesis. Nijmegen: Radboud University. Advisor: Prof. Dr. Paul E. Verweij.

DİĞER KAYNAKLAR

- ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, (2019). Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.
- CLSI Document M38-A2. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition; Clinical and Laboratory Standards Institute: **Wayne, PA, USA.**

CLSI Document M51-A. (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.

WHO (2022). Fungal Priority Pathogens List To Guide Research, Development And Public Health Action.

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU MİKROBİYOLOJİ REFERANS LABORATUVARLARI DAİRE BAŞKANLIĞI MİKOLOJİ REFERANS LABORATUVARI. (2014). “Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi”, Ankara.

EKLER

- Ek.1:** İzin Yazışmaları
- Ek.2:** Etik Kurul Raporu

Ek.1: İzin Yazışmaları

İLGİLİ MAKAMA

Sorumlu yürütücüsü olduğum " Aspergilloz etkenlerinde azol direncinin gradient test ve agar plak yöntemleriyle araştırılması" isimli çalışma İstanbul Aydın Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulacaktır.

Bu araştırmanın Kurumunuzda yapılabilmesi için gereken iznin verilmesini arz ederim.

İmza
Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ
Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Laboratuvar sorumlusu

İmza
Adı ve Soyadı
Sorumlu Yürütücü
Doç. Dr. Reyhan ÇALIŞKAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

UYGUNDUR
10/02/2022

Prof. Dr. Zekayi KUTLUBAY
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa,
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Ek.4: Etik Kurul Raporu



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

Sayı : B.30.2.AYD.0.00.00-050.06.04/66
Konu : Karar hk.

04.04.2022

Sayın, Doç. Dr. Reyhan ÇALIŞKAN

İstanbul Aydın Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **04.04.2022** tarihinde yapılan olağan toplantısında danışmanlığını yürüttüğünüz "Zeynep Yazgan" isimli öğrencinize ait "**Aspergilloz Etkenlerinde Azol Direncinin Gradient Test ve Agar Plak Yöntemleriyle Araştırılması**" konulu doktora tez çalışmanız ile ilgili alınan **2022/66** no'lu karar gereği; başvuru dosyanız ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenerek etik yönden oy birliğiyle uygun bulunmuş olup tutanaklar ekte sunulmuştur. Bilgilerinize sunarım.

Prof. Dr. Enişen Çelikkaya
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Zeynep YAZGAN

ÖĞRENİM DURUMU

Lisans: 2000-2004, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 2016-2018, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora: 2022-Halen, İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM

Haziran 2010- 2022'de halen devam ediyor: İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Laboratuvarı, Biyolog.

