

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

FARNESOLÜN TEK BAŞINA VE ANTİFUNGAL  
İLAÇLARLA KOMBİNE OLARAK ASPERGİLLUS KLİNİK  
İZOLATLARINA İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Şükran ÖNDER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2019



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

FARNESOLÜN TEK BAŞINA VE ANTİFUNGAL  
İLAÇLARLA KOMBİNE OLARAK ASPERGİLLUS KLİNİK  
İZOLATLARINA İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Şükran ÖNDER

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI  
Prof. Dr. Yasemin ÖZ

ESKİŞEHİR

2019

**TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Şükran ÖNDER' e ait "Farnesolün tek başına ve antifungal ilaçlarla kombine olarak *Aspergillus* klinik izolatlarına in vitro etkisinin araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:04/09/2019

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Gül DURMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Yasemin ÖZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Aynur GÜLCAN

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniv. Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulunun

.....Tarih ve.....Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali ARSLANTAŞ

Dekan

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı planlarken ve hazırlarken her daim yanımda olan, tezin hiçbir aşamasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle en önemli destekçilerimden olan tez danışmanım Prof. Dr. Yasemin ÖZ' e ve uzmanlık eğitimim boyunca yardım ve bilgileriyle beni aydınlatan Prof. Dr. Gül DURMAZ' a, Prof. Dr. Tercan US' a, Prof. Dr. Nihal DOĞAN' a, Prof. Dr. Nilgün KAŐİFOĖLU' na; bölümümüzde birlikte çalıőtıęım arkadaşlarım Dr. Türkan ERSHEN' e, Dr. Ahsen ÇİFCİ' ye, Dr. Zuhale ZEYBEK SİVAS' a, Dr. Ahmet KAYER' e, Mehdi MESKİNİ' ye, Dr. Ekin ALPASLAN' a, Dr. Alperen CEYLAN' a ve tüm laboratuvar çalıőanlarına yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

**Önder, Ş. Farnesolün tek başına ve antifungal ilaçlarla kombine olarak *Aspergillus* klinik izolatlarına in vitro etkisinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2019.** Fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş sınırlı sayıda ve sınırlı etkinliğe sahip birkaç grup antifungal mevcuttur ve bunların klinik kullanımlarını olumsuz etkileyen toksik yan etkileri ve yüksek maliyetleri bulunmaktadır. Sınırlı sayıdaki antifungal ilaçların yoğun kullanımı nedeniyle antifungal ilaçlara direnç gelişmesi ya da dirençli suşların sıklığının artması ile fungal enfeksiyonların tedavilerinin güçleşmesi, daha geniş spektrumlu, farklı hedefleri etkileyen yeni ilaçlara ya da tedavi rejimlerine ihtiyaç doğurmuştur. Son yıllarda doğal ürünlerin tedavide kullanımına yönelik çalışmalara eğilim artmıştır. Farnesol, birçok bitkisel yağda bulunan doğal kaynaklı bir sesquiterpen alkoldür ve *C. albicans* tarafından quorum sensing molekülü olarak sentezlendiği bildirilmektedir. Çalışmamızda klinik *Aspergillus* izolatlarına (*A. fumigatus*, *A. flavus*) vorikonazol, anidulafungin ve amfoterisin B' nin antifungal etkinliği üzerine farnesolün katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kırk beş klinik izolata referans sıvı mikrodilüsyon testi ve üç antifungal (VOR, AMB ve AND) ile farnesolün (FAR) kombinasyon testi çalışıldı. Tüm izolatların FAR duyarlılık aralığı 1500->6000µM, VOR duyarlılık aralığı 0.125-1 µg/mL, AMB duyarlılık aralığı 0.125-2 µg/mL, AND duyarlılıkları ise ≤0.0035 olarak saptandı. İzolatların hiçbirinde sinerji saptanmazken, tüm izolatların %38' inde FAR-VOR, %24' ünde de FAR-AMB kombinasyonu için antagonistik etkileşme saptandı. Sonuç olarak, *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatlarına karşı farnesolün bu çalışmada test edilen antifungallere (VOR, AMB) herhangi bir katkısı saptanamamış hatta antagonistik etkileşme sonuçları elde edilmiştir. Bu durum *Aspergillus* enfeksiyonlarının tedavisinde farnesolün antifungallere olumlu katkısı olabileceği öngörüsünü zayıflatmıştır.

Anahtar kelimeler: Farnesol, Anidulafungin, Vorikonazol, Amfoterisin B

## ABSTRACT

**Önder, Ş. Evaluation of the in vitro effects of farnesol alone and in combination with antifungal drugs on *Aspergillus* clinical isolates. Eskisehir Osmangazi University School of Medicine, Department of Clinical Microbiology, Eskisehir, 2019.** There are a few grup of antifungals at limited number and limited effectiveness for treatment of fungal infections and there are toxic side effects and high costs limiting the clinical usage of them. The difficulty in treatment of fungal infections with increased resistance to antifungal drugs or the increased frequency of resistant strains due to the intensive use of limited antifungal drugs have necessitated new drugs affecting different targets with broader spectrum or new treatment regimens. In recent years, there has been an increase in the tendency to studies regarding therapeutic use of natural products. Farnesol is a natural sesquiterpen alcohol found in many vegetable oils and reported to be synthesized as a quorum sensing molecule by *C. albicans*. Therefore, the evaluation of farnesol's contribution on antifungal activity of voriconazole, anidulafungin and amphotericin B against clinical *Aspergillus* isolates has been aimed in our study. Liquid microdilution test and combination of three antifungals (VOR, AMB and AND) and farnesol were studied in 45 clinical isolates. FAR sensitivity range of all isolates 1500->6000 µM, VOR sensitivity range 0.125-1 µg/mL, the sensitivity range of the AMB 0125-2 µg/mL, AND sensitivity was determined as the ≤0.0035 µg/mL. Synergies were not detected in any of the isolates, whereas 38% of all isolates had antagonistic interaction for FAR-VOR and 24% for FAR-AMB combination. As a result, no contribution of farnesol to *A. fumigatus* and *A.flavus* isolates to the antifungals (VOR, AMB) tested in this study, even antagonistic interaction results were obtained. This situation weakened the prediction that farnesol may have a positive effect on antifungals in the treatment of *Aspergillus* infections.

Key Words: Farnesol, Voriconazole, Anidulafungin, Amphotericin B

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe, Tanımı ve Sınıflandırma	3
2.2. <i>Aspergillus</i> Türleri ve Genel özellikleri	4
2.2.1. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Mikolojik Özellikleri	4
2.2.2. Tıbbi Önemi Olan <i>Aspergillus</i> Türleri	5
2.2.3. Patojenite	5
2.2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş	7
2.3. Klinik <i>Aspergillus</i> Enfeksiyonları ve Risk Faktörleri	8
2.4. <i>Aspergillus</i> Enfeksiyonlarının Tanısı	9
2.4.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması	10
2.4.2. Mikroskopik İnceleme	10
2.4.3. Kültür	11
2.4.4. İdentifikasyon	12
2.4.5. Serolojik Yöntemler	14
2.4.6. Moleküler Yöntemler	18
2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri	19
2.5.1. Sıvı Dilüsyon testleri	20
2.5.2. Gradient Test	21
2.5.3. Disk Difüzyon Testi	22
2.5.4. Otomatize Antifungal Duyarlılık Testleri	22



	Sayfa
2.6. Antifungal Ajanlar	22
2.6.2. Ekinokandinler	24
2.6.3. Polyenler	25
2.6.4. Farnesol	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. İzolatların Tanımlanması	28
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	28
3.2.1. RPMI 1640 Besiyeri (L-Glutaminli)	28
3.2.2. SDA Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı	29
3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Testi	29
3.4. Checkerboard (Dama Tahtası) Yöntemi	30
3.5. İzolatların İnokülasyonu ve Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ABPA	Allerjik Bronkopulmoner Aspergilloz
AIDS	Acquired Immune Deficiency
AMB	Amfoterisin B
AML	Akut Myeloid Lösemi
AND	Anidulafungin
ATCC	American Type Culture Collection
BG	1,3- $\beta$ -D-glukan
CAS	Kaspofungin
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Enzim Linked Immun Assay
E test	Epsilometer Test
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
5-FC	5-Flusitozin
FDA	US Food and Drug Administration
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
FLU	Flukonazol
GM	Galaktomannan
GVHD	Graft versus host disease
İA	İnvaziv Aspergilloz
Ig	İmmünglobulin
IL	İnterlökin

IFN	İnterferon
ITR/ITC	İtrakonazol
ISA	İsavukonazol
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	Potasyum Hidroksit
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MDS	Myelodisplastik Sendrom
MEK	Minimum Efektif Konsantrasyon
MH	Mueller – Hinton
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonik asit
NK	Natural killer hücre
PAMPS	Patojen İlişkili Moleküler Paternler
POS	Posokonazol
PCR	Polymerase chain reaction
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDA	Saboraud dekstroz agar
Th	T helper
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TLR	Toll Like Receptor
VOR	Vorikonazol

**ŞEKİLLER**

Sayfa

Şekil 1. *Aspergillus*' ların anamorfik yapısı

14



**TABLULAR**

	Sayfa
2.1. Sık karşılaşılan <i>Aspergillus</i> türlerinde epidemiyolojik eşik değer ve klinik sınır değer	26
3.1. Antifungal ajanların mikrodilüsyon test konsantrasyonları	30
3.2. Dama tahtası yönteminin şematik gösterimi	31
4.1. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları	34
4.2. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları	35
4.3. <i>A. flavus</i> izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları	36
4.4. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında farnesol ile vorikonazolün kombinasyon sonuçları	37
4.5. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında farnesol ile vorikonazolün kombinasyon sonuçları	38
4.6. <i>A. flavus</i> izolatlarında farnesol ile vorikonazol kombinasyon sonuçları	39
4.7. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları	40
4.8. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları	41
4.9. <i>A. flavus</i> izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları	42

## 1.GİRİŞ

İnsanda enfeksiyon etkeni olan mantarların çoğunluğu, doğada yaygın bulunan, maya ya da küf formundaki saprofit canlılar olmakla birlikte, konak savunma sistemini olumsuz etkileyen durumların varlığında, morbidite ve mortalitesi yüksek invaziv enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Günümüzde hematolojik ya da solid organ kanserli hastalar ile bu hastalara uygulanan agresif tedavi yaklaşımları, cerrahi –özellikle abdominal cerrahi- uygulanmış hastalar, immünsupresif tedavi alan hastalar, organ nakil hastaları gibi immün sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışla birlikte, mantarların neden olduğu invaziv enfeksiyonların sayısı da her geçen gün artış göstermektedir. Dünyada 100.000’ den fazla tanımlanmış mantar türü bulunmakla birlikte, henüz keşfedilmemiş milyonlarca türün olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde, isimlendirilmiş mantar türlerinden yaklaşık 200’ ü insan ya da hayvanlardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. Bunların az bir kısmı sağlıklı bireylerde enfeksiyona neden olabilmekteyken, sayıları gün geçtikçe artan önemli bir kısmı ise immün düşkün bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilen “fırsatçı patojenler” olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

İnsanda enfeksiyon etkeni olan bu mantar türlerinin neredeyse %80’ ini *Candida* ve *Aspergillus* türleri oluşturmaktadır (2). *Aspergillus* genusu içinde, enfeksiyonlardan sorumlu olan başlıca tür *A. fumigatus* olup, bunu *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* izlemektedir (3,4). *Aspergillus* türleri immün sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyon etkenleri olarak değerlendirilmektedir. Özellikle hematoloji kanserli ya da kemik iliği nakli uygulanmış hastalar gibi aspergilloz açısından yüksek riskli hastalarda yeterli antikor cevabı oluşamadığından hayatta kalımı olumsuz yönde etkiler (5-7). Erken tanı ile tedavi başarısı belirgin olarak arttığından tanı koyulur koyulmaz tedaviye başlanmalıdır.

Ökaryotik hücre yapısı nedeniyle, invaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş sınırlı sayıda antifungal ilaç bulunmaktadır. Bunlar polienler, triazololler ve ekinokandinlerdir. Ancak bu ilaçların sınırlı etki spektrumları ya da ciddi toksik yan etkileri nedeniyle, invaziv fungal enfeksiyonların tedavisi hala zordur ve sıklıkla yüksek maliyet ve yüksek

mortalite oranları ile birlikte. Ayrıca, mevcut antifungal ilaçların yoğun kullanımı nedeniyle bu ilaçlara direnç gelişimi ya da dirençli suşların sıklığının artması ve fungal infeksiyonların önemli bir sağlık sorunu haline gelmesi, daha geniş spektrumlu, farklı hedefleri etkileyen yeni ilaçlara ya da tedavi rejimlerine ihtiyaç doğurmuştur. Bu nedenle son yıllarda yeni antifungal ilaç geliştirme çabaları yeni hedef arayışlarına yönelmiş ve doğal ürünlerin tedavide kullanımına yönelik çalışmalara eğilim artmıştır.

Farnesol, birçok bitkisel yağda bulunan doğal kaynaklı bir sesquiterpen alkoldür ve *C. albicans* tarafından quorum sensing molekülü olarak sentezlendiği bilinmektedir. Bununla birlikte dışarıdan uygulanan farnesolün değişik düzeylerde antibakteriyel ve antikandidal etkinliği de gösterilmiş ve antifungal ilaçlarla kombinasyonunun *Aspergillus* türlerine de etkili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada invaziv mantar enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen iki *Aspergillus* türüne (*A.fumigatus* ve *A.flavus*) karşı farnesol ile yaygın kullanılan antifungallerden vorikonazol (VOR), anidulafungin (AND) ve amfoterisin B (AMB)' nin kombinasyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Duyarlılık testleri için CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) rehberleri kullanılmış, kombinasyon testleri checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile uygulanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe, Tanımı ve Sınıflandırma

*Aspergillus* cinsi küfler ilk kez İtalyan papaz biyolog Pier Antonia Michell tarafından 1729' da tanımlanmıştır (8). *Aspergillus* adını ise bazı Hristiyan ayinlerinde su serpmek için kullanılan nesneye benzerliğinden dolayı almıştır. 1863' de genusun en patojen türü olan *Aspergillus fumigatus* Fresenius tarafından tanımlandı. Ancak insan enfeksiyonlarında rolü olabileceği ilk kez 1856' da Virchow tarafından ortaya atıldı. İnvaziv aspergilloz ilk kez aplastik anemili bir hastada 1953' de Rankin tarafından tanımlandı (9).

Thom ve Church 1926' da *Aspergillus* ile ilgili tüm bilgileri bir monografda toplamıştı. Raper ve Fennel 1965' te *Aspergillus* türlerine spesifik konidyum, konidyofor ve vezikül yapısını tanımlamıştır. Raper ve Fennel aynı yıl Thom ve Church'ün yaptığı bu çalışmayı genişletmiş ve *Aspergillus*' ları 18 farklı gruba ayırmıştır. 1985' te Gams ve arkadaşları bu 18 farklı grubu yeniden düzenlemiş ve bu sınıflamaya resmiyet kazandırmıştır. Şu anda Aspergillaceae ailesi içinde yaklaşık 250 tür ve 17 bölüm bulunmaktadır. Yeni türlerin tanımlanmasıyla bu sayı her geçen gün artmaktadır (9).

*Aspergillus* cinsi Ascomycota bölümünde, Eurotiomycetes sınıfında Eurotiales takımında, Trichocomaceae ailesinde yer alır. *Aspergillus* taksonomisi son yıllarda değişime uğrayarak, günümüzde cins, alt-cins ve bölümlere ayrılmıştır. *Aspergillus* cinsi yedi alt-cins içermektedir: *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Warcupi*, ve *Ornati*. İnsanda hastalıklara neden olduğu bilinen esas türler beş *Aspergillus* bölümünde bulunmaktadır: *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* ve *Nidulantes*. Bununla birlikte günümüzde "species complex" teriminin kullanımı da giderek artmaktadır. Örneğin; "*Aspergillus viridinutans species complex*", "*Aspergillus section Fumigati*" de yer alır. "*Aspergillus section Fumigati*" içinde birbiriyle yakından ilişkili, hayvan ve insan patojenlerinin de olduğu *A. udagawae*, *A. felis*, *A. pseudofelis*, *A. parafelis*, *A. pseudoviridinutans*, *A. wyomingensis* gibi fungal patojenler içerir.



## 2.2. *Aspergillus* Türleri ve Genel Özellikleri

Yaklaşık 200 tür içeren *Aspergillus* genusu mantarlar insan, hayvan ve bitki patojeni olmasının yanı sıra gıda ve ilaç endüstrisinde de önemli yer tutmaktadır (10)

### 2.2.1. Mikolojik Özellikleri

*Aspergillus* cinsi hem eşeyli hem eşeysiz olarak üreyebilirler. *Aspergillus* türlerinin identifikasyonu için hem makroskopik hem mikroskopik özellikler dikkatle incelenmelidir. Olgun *Aspergillus* kolonileri ortalama 3-5 günde oluşur. Makroskopik inceleme yapılırken koloni çapları, koloninin ön ve arka yüzdeki rengi, pigment varlığı incelenir (11-13). Kullanılan besiyerine göre değişmekle birlikte yeşil, sarı-yeşil, mavi, deve tüyü rengi, siyah renkte koloniler oluşturabilirler. Koloni rengi, ilk günlerde beyaz ve renksizken, yaşlandıkça renklenir ve kadifemsi, bazen granüler bir görüntü oluşur (14). Standart tanımlamalar 7 günden sonraki üremeye göre yapılmalıdır.

Mikroskopik olarak septalı hiyalen hifler, konidyofor, vezikül, fiyalit ve bu fiyalitten doğan tek hücreli sporlar (konidya) *Aspergillus* genusunun karakteristik özelliğidir. Mikroskopik özellikleri incelenirken veziküllerin şekil ve büyüklüğü, fiyalit ve metula düzeni dikkatle incelenmelidir. Dikine çıkan uzantı konidyofor olarak isimlendirilir. Konidyofor ya direkt vejetatif hiften ya da ayak hücresi denilen özelleşmiş bir hif hücrelerinden çıkar. Konidyofor vezikül denilen bir şişlikle sonlanır. Bu vezikül yuvarlak, armut şeklinde veya lobut şeklinde olabilir. Vezikülün ya her tarafı ya da bir kısmı fiyalitlerle kaplıdır. Fiyalitlerden tek bir sütun halinde ya da konidyofora dik açıyla çıkan yapılar konidyum olarak isimlendirilir. Konidyumlar tipik olarak elips ya da yuvarlak olabilir. Türe bağlı olarak rengi ve duvar şekilleri farklılık gösterebilir (15). *Aspergillus* konidyumları son derece hidrofobik özellikte olup, çevreye yayılmada büyük önem taşırlar.

### 2.2.2 Tıbbi Önemi Olan *Aspergillus* Türleri

İnsan hastalıklarında primer etken *A. fumigatus* olup bunu *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* takip etmektedir. Enfeksiyon etkeni olabilen diğer *Aspergillus* türleri *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. lentulus*, *A. versicolor*, *A. sydowi*, *A. candidus*, *A. restrictus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. amstelodami* olarak sayılabilir (16).

### 2.2.3. Patojenite

*Aspergillus* türlerinin konakta hastalık yapması, tüm patojenlerde olduğu gibi konağın immün durumuna ve patojenin virülans faktörlerine bağlıdır. *Aspergillus* cinsine ait türlerin oluşturduğu enfeksiyonlar aspergilloz olarak isimlendirilir. *Aspergillus* türleri fırsatçı patojenler olup; immün sistemi sağlam bireylerde enfeksiyon oluşturmazken, bağışıklık sistemi yetersiz bireylerde (transplant hastaları, hematolojik maligniteli hastalar) hızlı ve mortal seyirli enfeksiyonlar yapabilirler. Her fırsatçı enfeksiyonda olduğu gibi aspergilloz enfeksiyonlarında da konak savunması kilit role sahiptir (17).

### Konak Savunma Mekanizmaları

İnvaziv akciğer aspergillozu esas olarak havadaki konidyumların solunmasıyla meydana gelmektedir (18). Konidyumlar inhale edildikten sonra esas olarak solunum yolu epitelinin mukosilyer aktivitesi ile hava yollarında tutulmaya çalışılır ve alveollere girişi engellenir (19). Üst hava yollarını aşan, alveollere ulaşmayı başaran konidyalar alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir. Konidya ve hiflerin kompleman sistemini aktive etmesiyle; C3b, C4b ve Ig (İmmünglobulin) ile konidyaların kaplanması fagositozu güçlendirir. Makrofajlar, mantar hücre duvarındaki beta D glukon gibi hücre duvar komponentlerini tanıdıktan sonra inflamatuvar mediatörleri ortama salarlar. Makrofaj ve mikroorganizma arasındaki bu etkileşim toll like reseptör (TLR-4) ve patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPS) sayesinde gerçekleşir. TLR ve PAMPS' ların etkileşmesiyle proinflamatuvar sitokinler salınmaya başlar (19). Bu salınan sitokinler invaziv hifal formların öldürülmesinde önemli olan

hücrel immüneyi aktifler. Aynı zamanda nötrofilleri inflamasyon bölgesine çeker (20).

Aspergillozun patogenezi tam olarak anlaşılammış olmakla beraber Th1 (T helper 1) ve Th2 (T helper 2) yolaklarının dengesi enfeksiyonun oluşmasında etkilidir. Dendritik hücrelerin salgıladığı sitokin tipi ve antijene göre farklılaşan T helper hücreleri konidyalarla ya da hifal yapılarla karşılaşıncı Th1 yönünde farklılaşır. Th1 hücreleri, IL-12 ve IFN- $\gamma$  uyarımı ile aktive olurlar ve IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  salınımı yaparlar. Th 1 grubu sitokinler (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, IL-6) mantara etkili olan hücreleri indüklerken; Th 2 grubu sitokinler (IL-4, IL-10) bu hücrelerin etkisini baskılar. Th2 grubu ne kadar baskınsa hastalık o oranda şiddetli görülür (19).

### **Mantara Ait Faktörler**

*Aspergillus* konidyaları elips, yuvarlak yapıda olabilir ve türe bağlı olarak büyüklük, renk ve duvar şekilleri farklılık gösterebilir (21). Konidyumların germinasyonuyla miçel oluşumu başlar. İmmün sistemin uzaklaştıramadığı konidyumlar miçel oluşumunun yanı sıra biyofilm oluşumunda da önemlidir. İnhale edilen konidyum yükü oluşan biyofim kütesinin direnciyle doğrudan ilişkilidir (22). Konidyumların 5 mikrometrenin altında (2-3  $\mu$ m) olması alveollere ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Konidya yüzeyindeki çıkıntılar ise konidyumların çevresel yayılımını kolaylaştırmaktadır (23,24). Konidya yüzeyinde bulunan siyalik asit ve diğer proteinler, konak fibrinojen, laminin ve fibronektinine bağlanmaya aracılık etmektedir. Ayrıca yüzeydeki bu siyalik asit kalıntıları, konidyaların yayılmasında ve akciğerlerde birikmesinde de büyük önem taşımaktadır. Hif duvarında bulunan  $\beta$ -(1-3)-D-glukan ise makrofaj yüzeyindeki reseptörlere bağlanır (25).

Enfeksiyonlardaki rolleri kesin olmamakla birlikte, *Aspergillus* türleri tarafından fosfolipaz, proteaz gibi enzimlerle, mikotoksin adı verilen sekonder metabolitler üretilmektedir. Özellikle fosfolipazlar konak dokuya invazyon ve konak hücreye penetrasyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir (26). Gliotoksin en çok ilgi çeken toksin olup aspergillozlu hastaların serumlarından kolaylıkla elde edilebilmiştir. Gliotoksinin nötrofil apoptozisini indüklediği ve nötrofillerde

gerçekleşen NADPH oksidazın aracılık ettiği doğal bağışıklık savunma hattını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (27).

Ferrik demiri bağlayan ve demir alımını ve depolanmasını kolaylaştıran negatif yüklü moleküller olan sideroforların, *A. fumigatus*' un konaktan demir alımına aracılık ettiği ve *Aspergillus* türlerinin serumun fungisidal etkisinden korunmasını sağladığı bildirilmektedir (28,29).

#### 2.2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş

Fırsatçı mantar enfeksiyonlarının en sık karşılaşılan etkenleri olan *Candida* türlerinden sonra, ikinci sırada *Aspergillus* türleri yer almaktadır (30). *Aspergillus* türlerinin doğal yaşam ortamları, gübre ve çürüyen organik maddelerdir. Tüm dünyada, doğada toprakta, havada ve suda yaygın olarak bulduklarından, *Aspergillus* türleri ile insanların karşılaşması kaçınılmazdır.

Enfeksiyonların kaynağı doğadaki mantar sporlarıdır ve etkenin konağa girişi sıklıkla havadaki sporların inhalasyonu ile gerçekleşir. Bulaşmada suyun da önemli bir kaynak olabileceğine dair kanıtlar bulunmuştur. Hastaneden izole edilen *Aspergillus* kökenleri ile duş başlıklarından elde edilen kökenler arasında yüksek oranda benzerlik bulunmuştur (31). İmmün sistemi sağlam bireylerde, solunan konidyumlar doğal savunma mekanizmaları tarafından uzaklaştırıldığı halde, immün düşkün hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilirler (32). Konidyumların küçük olması ve immün sistemdeki defektler akciğerlere yerleşmesini ve enfeksiyonun gelişmesini kolaylaştırır. Kapalı ortamlar, dış ortam havasından daha fazla spor içermektedir (33). Hastanelerde ya da çevresinde devam eden inşaat ve tadilat işleri, havadaki mantar sporlarının sayısının artışına ve buna paralel olarak immün düşkün hastalarda *Aspergillus* enfeksiyonlarının sıklığında artışa neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, hasta odalarında canlı ya da kuru çiçek bulunması da havadaki mantar sporu oranını arttırmaktadır. Enfeksiyonun oluşmasında en önemli faktör hastaların immün durumu olup, hastadan hastaya bulaş söz konusu değildir (34).

### 2.3.Klinik *Aspergillus* Enfeksiyonları ve Risk Faktörleri

Mantar enfeksiyonların klinik belirtileri karmaşık ve atipik, tanısı güçtür. *Aspergillus* enfeksiyonlarında ciddi ve uzamış nötropeni, yüksek doz glukokortikoid alımı, hücresel immüniteyi baskılayan ilaçlar klasik risk faktörlerinden sayılabilir. Klasik risk faktörlerinin yanı sıra ciddi immün düşkün bireyler özellikle allojenik hematopoetik hücre transplantasyonu yapılan hastalar, solid organ alıcıları ve ailesel immün yetmezlikli hastalar (kronik granümatöz hastalık vb.) pulmoner aspergilloz için yüksek risk grubundaki bireylerdir (35).

**İnvaziv aspergilloz:** İnvaziv aspergilloz konidyumların inhalasyonundan sonra sıklıkla akciğer ve sinüsleri tutar. Hastalarda ateş, göğüs ağrısı, öksürük, solunum güçlüğü ve hemoptizi görülebilir. Nötropenik hastada invaziv aspergilloz için klasik triad ateş, plörotik göğüs ağrısı ve hemoptizi olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonun başlangıcında göğüs grafisi yol gösterici olmamaktadır. Bilgisayarlı tomografi göğüs grafisine nazaran daha ayrıntılı bilgi vermektedir. Aspergilloz akciğerden farklı organlara yayılabilir. Deri, beyin, karaciğer, böbrek yayılımı sonucu enfeksiyon mortal seyrederek.

**Trakeabronşit:** Sıklıkla akciğer transplantasyonu yapılan bireyleri etkilemekle birlikte diğer immün düşkün hastalarda da görülmektedir. Hastalarda belirgin dispne, wheezing ve trakeayı tıkayan mukus plakları saptanır (36).

**Paranasal sinüs enfeksiyonları:** *Aspergillus* türlerinin neden olduğu paranasal sinüs enfeksiyonları klinik olarak mukormikoz ile benzerlik gösterir. Bununla birlikte rinoserebral aspergilloz sıklıkla hematolojik maligniteli nötropenik hastalarda görülürken, mukormikozis diabetik hastalarda ve yine hematolojik maligniteli hastalarda görülür. Klinik olarak yüz ağrısı, hiperemi, ateş ve nazal akıntı ile seyrederek. Nötropenili hastalarda immün cevap oluşmadığından enfeksiyon orbital invazyon, kavernoöz sinüs trombozu yaparak beyne yayılabilir.

Santral sinir sistemi tutulumu, yaygın aspergillozda ya da paranazal sinüs enfeksiyonlarının yayılımı sonucu gerçekleşir. Santral sinir sistemi tutulumu fokal nörolojik semptomlara, subaraknoid kanamaya, serebrovasküler hastalıklara yol açabilmektedir ve kötü prognozla ilişkilidir (37).

*Aspergillus* türleri enfeksiyon dışında bazı klinik tablolara da neden olabilmektedir; allerjik bronkopulmoner aspergilloz, aspergilloma ve mikotoksikozlar.

**Allerjik bronkopulmoner aspergilloz:** *Aspergillus* konidia ve miçelyumuna karşı gelişen bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Astım semptomlarıyla karakterizedir. Nonproduktif öksürük, hışıltı, çekilme ve epizodik bronkospazmlarla karakterizedir. Serum IgE ve IgG artışı söz konusudur. Balgamın direkt incelemesinde Charcot-Leyden kristalleri, eozinofiller ve septalı hifler görülebilir, ancak doku invazyonu söz konusu değildir. Kültüründe *Aspergillus fumigatus* üretilir (38).

**Aspergilloma:** Eski tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi, pnömokonyoz, malignite sonrası oluşan kavitelerin içinde oluşan aspergillus kolonizasyonudur. Kavite duvarına invazyon yapmaz ya da çok az invazyon yapabilir. Genellikle herhangi bir klinik bulguya neden olmazken, nadiren hemoptizi, kilo kaybı ve ateş görülebilmektedir. Tanıda, balgamın direkt incelemesinde hiflerin görülmesi, kültürde üretilmesi ya da hasta serumunda anti- *Aspergillus* IgG titresinde artış kullanılabilir (39).

#### **2.4. *Aspergillus* Enfeksiyonlarının Tanısı**

İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonlarında prognozun erken tanı ve tedavi ile direkt ilişkili olduğu bilinmekle birlikte, enfeksiyona özgül klinik belirti ve bulguların olmaması ve rutin tanıda kullanılan laboratuvar testlerinin yetersizlikleri nedeniyle, genellikle mümkün olamamaktadır. İnvaziv aspergillozun kesin tanısında altın standart yöntem steril vücut sıvıları ya da doku örneklerinde mikroskopik olarak mantar elemanlarının gösterilmesi ve aynı örneklerde etkenin üretilmesidir. Ancak bu hasta grubunda sıklıkla ortaya çıkan trombositopeni ve genel durum bozukluğu gibi nedenlerle bu testler için uygun

örneklerin elde edilmesi genellikle mümkün olamamaktadır. Kan kültürleri sıklıkla negatif, diğer klinik örnekler hastalığın ilerlemiş aşamalarında pozitifleşmektedir. Doku örneklerinin zor elde edilmesi, balgam, lavaj, kan gibi diğer klinik örneklerin duyarlılık ve özgüllüklerinin yetersizliği, yeni tanı yöntemleri arayışına yol açmıştır. Yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (HRCT) gibi radyolojik yöntemlerle tanıyı destekleyen bulgular (halo, nodül, kavitasyon gibi) sağlansa da bunlar invaziv aspergilloza özgül değildir (33).

*Aspergillus* enfeksiyonları açısından yüksek riskli hasta grubunda klinik bulgular, radyoloji bulguları ve mikrobiyoloji sonuçlarıyla birlikte değerlendirme yapmak esastır. Bu nedenle bağışıklığı baskılanmış hastalardaki invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında EORTC\IFICG (European Organization for Research and Treatment of Cancer\Invasive Fungal Infections Cooperative Group) kriterleri kullanılmaktadır (40).

#### **2.4.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması**

Doğru örnek seçimi ve uygun şartlarda laboratuvara gönderilmesi tanıda büyük önem taşır. Mantar kültürü için balgam, bronkoalveolar lavaj, steril olmayan diğer alt solunum yolu örnekleri alınabilir. Fakat bu örneklerden izole edilen *Aspergillus*' ların kontaminasyon veya kolonizasyon olabileceği de unutulmamalıdır (41). Solunum yolu örneklerinin dışında doku biyopsisi ve hasta serumu da tanı testlerinde kullanılacak diğer örneklerdir. Serum sarı kapaklı jelli tüple gönderilirken diğer numuneler steril, kapaklı, sızdırmaz kaplar ile 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (42).

#### **2.4.2. Mikroskopik İnceleme**

Mikroskopik inceleme, kültürde üreyen etkenin doğrulanması ve hızlı sonuç elde edilmesi açısından kıymetlidir. Bu amaçla mikrobiyoloji laboratuvarlarında gram boyama ve kalkoflor beyazı yanısıra, histopatolojik incelemelerde periyodik asit-Schiff (PAS) ve Gomori metenamin gümüş boyası kullanılmaktadır (43). Potasyum hidroksit (KOH) dokudaki mantar elemanlarını saptanmasında kalkoflor beyazı ile birlikte kullanılabilir (44). *Aspergillus* hifleri, direkt mikroskopik incelemede 3-6 mikron boyutlarında, septalı, dar açıyla

dallanan (45°) yapılar olarak gözlenir (45). İnvaziv aspergillozda, hifler doku içinde baştan başa üreme gösterirler ve sıklıkla paralel ya da ışınsal dizilirler. Akciğerde kaviteli lezyonlarda kolonize olan *Aspergillus*' lar yumak gibi dolaşık hif yığınları yaparak septumsuz, atipik hif yapıları oluşturabilirler. Bu sebeple direkt mikroskopik incelemeyle invaziv fungal enfeksiyon tanısı koyulabilir. Ancak *Scedosporium* ve *Fusarium* gibi filamentöz mantarlar da aynı görünümü sergilediğinden, direkt mikroskopik incelemeyle birbirinden ayırd etmek mümkün değildir (46). Bu nedenle etyolojik tanı için etkenini kültürle izolasyonu ve identifikasyonu zorunludur.

Direkt mikroskopik inceleme hızlı sonuç vermesi, teknik donanım gerektirmemesi, ekonomik olması gibi avantajlarının yanı sıra değerlendiricinin bilgi ve deneyimine bağlı olması ve genus ve/veya tür düzeyinde tanımlama yapılamaması gibi dezavantajlara da sahiptir.

### 2.4.3. Kültür

Tüm mantar enfeksiyonlarında olduğu gibi, klinik örnekten *Aspergillus* türlerinin izolasyonunun değerlendirilmesi de güçtür (47). Kültür sonuçları direkt mikroskobik sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Kültürde *Aspergillus* üremesi durumunda direkt mikroskobide *Aspergillus* ile uyumlu hif yapılarının görülmesi invaziv enfeksiyon lehine en önemli bulgudur. Ayrıca tek bir örnekte ve birden fazla besiyerinde yoğun üremenin görülmesi veya tekrarlayan örneklerde aynı türün üretilmesi önemli bulgulardır (48).

Steril vücut sıvılarından ya da cerrahi doku örneklerinden izole edilen mantar kültürlerine, pozitif histopatolojinin eşlik etmesi her zaman anlamlıdır. Ancak her zaman hiflerin direkt mikroskopik inceleme ile görülememesi ve/veya kültürde üretilmemesi invaziv aspergilloz enfeksiyonunu dışlamaz (49). Örneğin çok merkezli bir çalışmada galaktomannan antijen sonuçlarına göre invaziv aspergilloz düşünülen hematopoetik kök hücre alıcılarının ancak %25 ile %50' sinde pozitif kültür sonuçları elde edilmiştir (50, 51).

Aspergillozun etyolojik etkenlerinin çoğu, sikloheksimid içermeyen rutin mikolojik besiyerlerinde kolayca ürer. İnsanlardaki enfeksiyon etkenlerinin tür düzeyinde tanımlaması genellikle Sabouraud's dekstroza (SDA) üretilen



mantarın makroskopik ve mikroskopik özelliklerinin incelenmesine dayanır. SDA yanı sıra patates dekstroz agar (PDA), inhibitör mold agar (IMA), beyin-kalp infüzyonlu SDA (SABHI), V8 agar ve Czepak's agar da bazı durumlarda tercih edilebilir. Birden fazla besiyeri seçimi etkenin izolasyon şansını artırır. SDA besiyeri ile birlikte antibiyotikli besiyeri kullanılması örneğin alındığı bölgedeki bakterilerin üremesini inhibe eder. Fungal kontaminantların üremesini engellemek için besiyerine siklohegzimit (0.5 mg/mL) eklenebilir. Ancak fırsatçı patojen olan *Aspergillus* ve *Cryptococcus neoformans* için siklohegzimitli besiyeri kullanmak etkeni üretme şansını azaltabilir (52). *Aspergillus* şüpheli kültürler 30°C de bir hafta inkübe edilmelidir.

İnvaziv aspergilloziste etkenin kültürde üretilmesi altın standart tanı yöntemi olmasına rağmen, bu grup hastalardan uygun örnek alınamaması, kültürün duyarlılığının düşük olması ve sonuçların elde edilmesi için uzun süre gerektirmesi testin olumsuz yönleridir. Bununla birlikte kesin etiyolojik tanının yapılabilmesi, antifungal duyarlılık testlerinin çalışılabilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için kültür zorunludur.

#### 2.4.4. İdentifikasyon

*Aspergillus* türleri 1-3 günlük inkübasyon sonucunda gözle görülür koloniler oluşturmaktadır. Ancak tür düzeyinde identifikasyon için mikroskopik olarak incelendiğinde spor üreten yapıların görülmesi gerekmektedir. Geçmişte yavaş sporlanan türler etken kabul edilmezken, günümüzde *A. lentulus* gibi küf mantarları invaziv enfeksiyonlarda etken kabul edilmektedir. Bu sebeple yavaş sporlanan fenotipler hemen kontaminant olarak değerlendirilmemelidir (53). *Aspergillus* kolonileri başlangıçta beyaz, yaşlandıkça türe göre sarı, mavi-yeşil, kahverengi veya siyah renkte olabilir. Koloni rengi identifikasyon için yol göstericidir. *A. fumigatus*'un 45°C'de üreyebilme özelliği, bu türün olumsuz çevresel koşullara daha dayanıklı olmasını sağladığı gibi diğer türlerden ayırımında önemlidir. Atipik koloni tipi ya da önemli bir izolatin tiplendirmesi yapılamamışsa Czepak's agara *Aspergillus* pasajları yapılmalıdır.

Mikroskopik identifikasyon için 3 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar lam kültürü, selofan bant yöntemi ve koparma yöntemidir.

**Lam kültürü:** Steril lam üzerine yerleştirilmiş 1 cm<sup>2</sup> boyutlarındaki SDA'nın inokülasyonu ve 26°C' de 2-3 hafta inkübasyonu ile gerçekleştirilir (54,55).

**Selofan bant yöntemi:** Selofan bant koloni üzerine nazikçe bastırılır ve laktofenol pamuk mavisi damlatılmış lama gergin olarak yapıştırılır. Pratikte en çok tercih edilen yöntemdir.

**Koparma yöntemi:** Spatül yardımıyla koloniden dikkatlice kopartılarak laktofenol pamuk mavisi damlatılmış lama bırakılır. Üzerine lamel kapatılıp incelenir.

10X' luk objektifte küfün genel yapısı değerlendirilmekte, daha sonra ise 40X' lık ve 100X' lük objektifte konidyum, konidyofor, vezikül, fiyalit yapıları incelenir (56). Mantara ait mikroskopik özelliklerin elde edildiği en iyi yöntem lam kültürü olmakla birlikte uzun inkübasyon süresi ve kontaminasyon riski nedeniyle, koparma yönteminde ise işlem sırasında mantar yapıları bozulabildiğinden rutin laboratuvarlarda tercih edilmez.

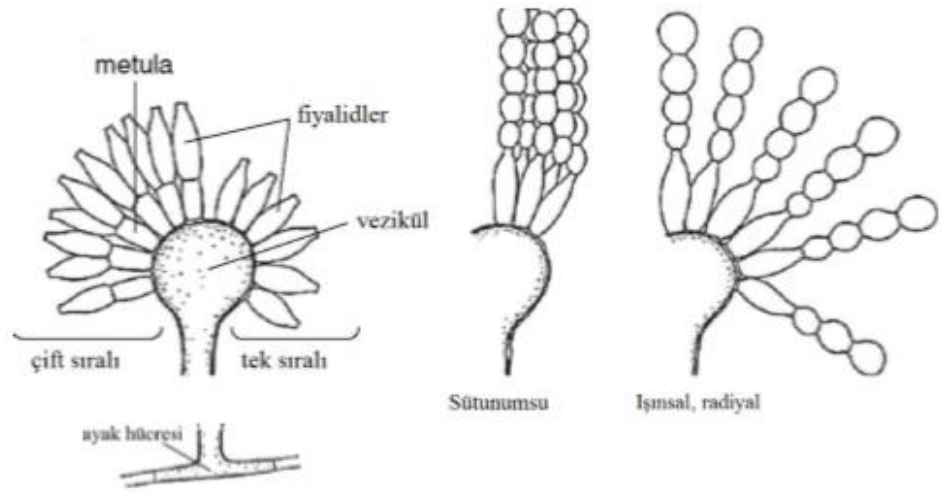
#### 2.4.4.1. Mikroskopik Yapının incelenmesi

*Aspergillus fumigatus* kolonileri besiyerinde mavi ya da mavi yeşil renkte, kadifemsi koloniler oluştururlar. Mikroskopik olarak incelendiğinde küresel olmayan, çomak benzeri veziküllere sahiptir ve vezikülün üst yarısı ya da üçte ikilik kısmında tek sıra uzanan fiyalit yapıları görülür. Konidyumlar ise küresel, sıklıkla düz duvarlı ve kolumnar dizilim gösterir. Konidyoforun uzunluğu yaklaşık olarak 300 -500 mikrometre kadardır (57).

*Aspergillus flavus* kolonileri besiyerinde sarı, sarı -yeşil, yeşil renkte granüler-yünsü şekilde ürer. Mikroskopik değerlendirmede fiyalitler vezikülün tamamını kaplamış ve konidyumlar fiyalitlerin etrafında papatya gibi görünür. Konidyofor veziküle doğru çıkıntılara sahiptir ve uzunluğu 500- 800 mikrometre arasındadır (56).

Aynı kompleks içerisinde yer alan türlerin morfolojik özellikleri aynı olduğundan kesin identifikasyon için moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Örneğin, *A. lentulus* *A. fumigatus* kompleksinde yer alan geç

sporlanan, atipik antifungal duyarlılık paterni gösteren ve invaziv enfeksiyon yapabilen bir tür olup kesin identifikasyon için moleküler yöntemlere ihtiyaç vardır (58). Fenotipik yöntemlerin yetersiz olduğu durumlarda rRNA (ribozomal RNA), ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) ve ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) gen bölgelerinin dizi analizleri ve ribozomal RNA'nın büyük alt birimleri olan D1-D2 domainlerinin ya da  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -tub) / kalmodulin gibi protein kodlayan gen bölgelerinin dizi analizleri yapılarak tür düzeyinde identifikasyon sağlanabilmektedir.



Şekil 2.1. Aspergillus'un anamorfik yapısı (11)

#### 2.4.5. Serolojik Yöntemler

Kültür duyarlılığının düşük olması, kültürün geç sonuç vermesi ve kültür için gerekli örneklerin alınması girişimsel işlemler gerektiğinden araştırmacılar kültür dışı tanı testlerine yönelmiştir.

Özgül antikorların gösterilmesi günümüzde kullanılmamakla birlikte ABPA (Allerjik bronkopulmoner aspergilloz) hastalarının %70-100' ünde, aspergillomalı hastaların %98-100' ünde antikorlar saptanmıştır. Serolojik yöntemler içinde en çok tercih edilen ELISA (Enzim Linked Immun Assay) yöntemidir. ELISA çok duyarlı ve özgül bir yöntem olmakla birlikte sağlıklı bireylerde de *Aspergillus'* a karşı gelişen antikorların saptanması önemli bir problemdir (59). Bununla birlikte aspergillozlu bireyler immün düşkün

olduğundan yeterli antikor cevabı oluşamaz. Bu nedenle bu hasta grubunda özgül antikor aranmasına yönelik testler tanıda kullanılamamaktadır.

### **Galaktomannan Antijen Testi**

Özellikle invaziv aspergilloz tanısında serum galaktomannan antijeninin saptanması çok değerlidir. *Aspergillus* türlerinde bulunan hücre duvar polisakariti olan galaktomannan (GM) immunojeniktir. Mantarın dokuda çoğalması sırasında GM kana salınır. ELISA yöntemiyle GM kanda 0.5-1 ng/ml olduğunda tespit edilebilir (60).

Günümüzde FDA (US Food and Drug Administration) onayı bulunan GM antijen testi (Platelia) için serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısı örnekleri uygundur. Erken tanı için hematolojik maligniteli hastalarda ve organ nakil hastalarında haftada iki kez çalışılması önerilmektedir. ELISA' nın duyarlılığı %85 iken; özgüllüğü %30 ile %100 arasında değişmektedir. GM antijen testinde eşik değer 0.5' tir ve 0.5' in üzerinde okunan optik dansite indeksi pozitif olarak değerlendirilmelidir (61,62). Klinik olarak invaziv aspergilloz belirti ve bulguları ortaya çıkmadan önce GM antijeni tespit edilebilmesine rağmen testin bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Eş zamanlı antifungal tedavi alan hastalarda testin duyarlılığı azalmaktadır (63,64,65).

Geçmişte piperasilin-tazobaktom alan hastalarda antibiyotiğin formülasyonu gereği galaktomannan ile antibiyotik çapraz reaksiyon vermekteydi (66,67). Piperasilin-tazobaktam profilaksisi alan hastalarda ilaç kesilse dahi 5 gün serumda GM antijeni tespit edilmekteydi (68). Ancak günümüzde bu durum nadiren ortaya çıkmaktadır (69,70). Aynı durum amoksisilin klavulanik asitin bazı formülasyonlarında hala söz konusudur (71). GM pek çok mantar hücre duvarında bulunduğundan *Fusarium türleri*, *Penicillium türleri* ve *Histoplasma capsulatum* ile enfekte bireylerde de GM antijen pozitifliği saptanabilmektedir (72-74). Hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda nakilden sonraki ilk 100 gün içinde, kemoterapiye bağlı gastrointestinal mukozit ve GVHD (Graft versus host disease) gelişen hastalarda yanlış pozitif sonuçlar gözlenmektedir. Bu durum gıdalarla alınan galaktomannana ve barsak florasından kana geçen bakterilere bağlı

görülmektedir (75,76). Kan ürünü veya intravenöz Ig alan bireylerde de yanlış pozitifliklere rastlanmıştır (77,78). Testin daha az çalışıldığı çocuk hastalarda da yanlış pozitiflik saptansa da sonraki çalışmalarda nispeten daha az yanlış pozitiflik saptanmıştır (79).

Yalancı pozitiflikleri dışlamak için ard arda iki kez GM antijen varlığı araştırılmalıdır. İki serum örneğinde pozitiflik saptanması İA (İnvaziv Aspergilloz) için doğrulayıcı bir sonuçtur (80).

Lokalize enfeksiyon varlığında kana galaktomannan geçmez. Bu durumda bronkoalveolar lavaj sıvısında GM antijeni araştırılabilir (81,82). Bronkoalveolar lavaj sıvısında optik dansite ile ilgili tartışma hala devam etmektedir. İnvaziv aspergilloz hastalarında yüksek özgüllüğü olmasına rağmen düşük duyarlılığa sahiptir. İmmün düşkün hastalarda çalışılmış bronkoalveolar lavaj GM antijen test sonuçlarını değerlendiren bir meta analizde optik dansite indeksi 0.5 kabul edildiğinde duyarlılık %88, özgüllük %81; optik dansite indeksi 1 kabul edildiğinde duyarlılık %78, özgüllük %93 olarak bulunmuştur (83). FDA önerisi ise hem serum hem de lavaj sıvısında 0.5 üzerindeki optik dansite indekslerini pozitif kabul etmek yönündedir.

FDA sadece serum ve lavaj sıvısında GM antijeni araştırılmasını önerse de klinik bulgulara bağlı olarak beyin omurilik sıvısı ve plevral sıvıda da GM antijeni araştırılabilir (84).

Özellikle hematolojik maligniteleri olan hastalarda GM antijen tespiti invaziv aspergilloz tanısında EORTC kriterleri içinde yer aldığından haftada iki kez çalışılması önerilir. GM antijen tespiti kültürden ortalama 10 gün önce; klinik belirtilerden ortalama 7 gün önce; radyolojik bulgulardan ortalama 9 gün önce tespit edilebilir olması bu hasta grubu için hayati öneme sahiptir (85).

### **Beta Glukan Testi**

1,3 -beta -D- glukan (BG) antijeni *Zigomiçetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki tüm mantarların hücre duvarında bulunur. Kanda BG tespiti at nalı yengeçlerinden elde edilen faktör G' yi, BG' nın aktive etmesiyle birlikte koagülasyon kaskadını başlatması ve bu reaksiyonların turbidometrik veya kalorimetrik bir yöntemle tespitine dayanmaktadır (86,87).

BG için FDA onayı bulunan test Fungitell' dir. Test serum, BAL (Bronkoalveolar Lavaj) ve plazmadan çalışılabilmektedir. 80 pg/ml' nin üstü pozitif; 60-79 pg/ml ara değer; 60 pg/ml' nin altı negatiftir (88). Testin en büyük avantajı 1 saat gibi kısa sürede sonuç vermesi, antifungal profilaksisinden etkilenmemesidir (89). Galaktomannan testinde olduğu hemodiyaliz hastalarında kullanılan gazlı bezler, i.v. (intravenöz) albümin, gama globülin kullanımı, bakteriyemi yanlış pozitifliklere neden olmaktadır. Hücrel beta glukon içeren *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriyel enfeksiyonlarda ve intravenöz amoksisilin klavulanat kullanımında kanda BG tespit edilebilmektedir (90-92). Bir çalışmada kemoterapi almakta olan 95 hastadan ateş yokluğunda haftada iki kez ve ateş varlığında günlük BG taraması yapılmıştır. Bu tarama sayesinde klinik bulgular ortaya çıkmadan erken tanı koyulabilmiş ancak bu çalışma GM testinde olduğu gibi randomize çalışmalarla desteklenmemiştir (93). BG pahalı bir test olması ve panfungal olması nedeniyle etkene yönelik direkt tespit yapamaması testin olumsuz yönlerindedir. İnvaziv aspergillozu tespit etme oranı %80' leredir. Galaktomannan testinde olduğu gibi kültürden ortalama 10 gün önce pozitif olmaktadır (94).

Son zamanlarda yayınlarda aspergillozun tespitine yönelik iki çalışmaya odaklanılmıştır. Bunlar lateral flow (LFD) ve termal desorpsiyon-gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi kullanılarak insan nefesindeki sekonder metabolitlerin tayini. Lateral flow' da JF5 monoklonal antikoru sayesinde aktif olarak büyüyen *Aspergillus* türlerinden salınan mannoptein tespit edilmektedir. Bu testin hematolojik maligniteli hastalarda ve solid organ nakli yapılan hastalarda hatırı sayılır bir performans sergilediği görülmüştür. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ve GM ile LFD' nin karşılaştırıldığı çalışmada PCR, GM ve LFD' nin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %95.5 -%96.6, %77.3-%91.5, %81.8-%98 bulunmuştur. PCR ve LFD' nin birlikte değerlendirilmesi %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (95). Başka çalışmalarda lavaj sıvısında GM, BG ve LFD karşılaştırılmış ve ümit veren sonuçlar elde edilmiştir (96,97). LFD' nin pahalı olmaması, özel ekipman gerektirmemesi ve hasta başı uygulanabilir olması testin avantajlarından biridir.

Başka bir teknoloji, termal desorpsiyon-gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi kullanılarak insan nefesinde sekonder metabolitlerin saptanmasına dayanır. Kanıtlanmış veya olası invaziv aspergilloz tanısı alan hastaları kaydeden prospektif bir çalışmanın sonuçları yüksek duyarlılık (% 94) ve özgüllüğü (% 95) bildirmiştir (98).

#### **2.4.6. Moleküler yöntemler**

Yaygın aspergillozlu hastalarda yüksek mortalite, serolojik testlerdeki sınırlılık, antifungal tedavinin kültür ve serolojik testlerde negatifiklere yol açması nedeniyle araştırmalar PCR üzerine yoğunlaşmış durumdadır. DNA varlığını saptayan yöntemler (PCR gibi) çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. Bazı çalışmalarda antijen testlerine göre üstün performans gösterse de diğerlerinde tam tersi sonuçlar elde edilmiştir (99,100). 25 çalışmanın değerlendirildiği bir meta analizde invaziv aspergillozu tespit etmede PCR' ın duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %84 ve %76 olarak bulunmuştur (101). En azından iki PCR sonucu pozitif olduğunda duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %64 ve %95 olarak tespit edilmiştir. Başka bir meta analizde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (102). Bu sonuçlara göre en az iki pozitif PCR sonucu invaziv aspergillozu öngörebilir.

Düzenli olarak PCR ile hastaların taranması erken tanı için kıymetli olmakla birlikte henüz hiçbir moleküler test, EORTC/MSG invaziv fungal enfeksiyon tanı kriterleri arasında yer alamamıştır. Bunun en önemli nedeni standardize bir yöntemin bulunmamasıdır. Özellikle in-house geliştirilen testler arasında hem yöntemsel hem de performans olarak belirgin değişiklikler görülmektedir. Moleküler testlerin standardizasyonu ve rutin kullanımı için hala cevaplandırılması gereken sorular bulunmaktadır. Preanalitik dönemde hasta grubu, immünsüpresyonun derinliği, antifungal profilaksi varlığı, uygun örnek seçimi, miktarı ve örnekleme sıklığı; analitik dönemde ise DNA ekstraksiyon ve pürifikasyon yöntemi PCR formatı, hedef genler test performansını etkileyen değişkenlerdendir. Kullanılan PCR yöntemlerinde bu değişkenlerdeki farklılıklar nedeniyle, bu testlerin gerçek performansı ve klinikte kullanılabilirliği

tam olarak değerlendirilememektedir. Bu nedenle moleküler testlerin ve klinik kullanımlarının değerlendirilebilmesi için standardizasyon zorunludur.

İnvaziv aspergilloz için BAL ile çalışılan örnekler kandan çalışılan örneklerden daha iyi sonuç vermiştir (103). Havada ve sinüslerde *Aspergillus* kolonizasyonunun olması yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği gibi tek bir pozitif PCR sonucu fungal enfeksiyon varlığını göstermez. İki pozitif PCR sonucu ya da klinik, serolojik ve mikrobiyolojik pozitifliklerle desteklenmesi invaziv aspergilloz tanısını kuvvetle koydurur (104).

## 2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son yıllarda immün sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artış alışılmadık etkenlerin sıklığında artışa neden olduğu gibi farklı direnç paternlerini de karşımıza çıkarmıştır. Mantar enfeksiyonlarının tanısında kilit role sahip mikoloji laboratuvarları, hastaların tedavisinin doğru yönetimi ve aynı zamanda epidemiyolojik verilerin sağlanması açısından antifungal duyarlılık testlerini de uygulamak zorundadır.

Antifungal duyarlılık testleri belli standartlar çerçevesinde yapılmalıdır. Tüm laboratuvarlar Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) ya da Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) tarafından maya ve küfler için geliştirilen standartlara uygun olarak antifungal duyarlılık testlerini çalışmakta ve raporlamaktadır. Günümüzde maya mantarları için CLSI M27 -A3 (sıvı mikrodilüsyon), CLSI M44-A2 (disk difüzyon) ve EUCAST E.Def 7.3.1 (sıvı mikrodilüsyon) kılavuzları kullanılmakta; küf mantarları içinse CLSI M38-A2 (sıvı mikrodilüsyon), EUCAST E.Def 9.3.1 (sıvı mikrodilüsyon), CLSI M51-A (disk difüzyon) kılavuzları kullanılmaktadır.

Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon olmakla birlikte ortalama iki gün sonra sonuç vermesi ve hem uygulama hem de değerlendirme aşamasında deneyimli teknik personel gerektirmesi nedeniyle emek yoğun testlerdir (105,106).



Agar bazlı yöntemler klinik kullanım için uygun ve ekonomik olmasına rağmen inhibisyon zonları değerlendirilirken bazı çelişkiler ortaya çıkmıştır. Bu durum uygun besiyeri seçimiyle ilişkili olabileceğinden araştırmacılar glukoz eklenmiş RPMI 1640 besiyeri ya da metilen mavisi eklenmiş MH kullanmayı tercih etmişlerdir (107). Disk difüzyon yöntemi görece 24 saatte sonuç vermesi ve emek yoğun olmaması nedeniyle rutinde kullanılmaktadır.

Ticari olarak Sensititre YeastOne kolorimetrik panel de rutinde kullanıma girmiş durumdadır. Sensititre YeastOne *Aspergillus* türlerinde amfoterisin B, itrakonozol, vorikonozol ve posakonozol antifungalleri için CLSI ile uyumlu bulunmuştur (107).

Ticari olarak temin edilebilen gradiyent testler antifungal duyarlılık sonucunu MİK olarak verdiği için tercih edilmesine rağmen tüm antifungaller için uyumlu sonuçlar elde edilememektedir (108,109). Amfoterisin B ve itrakonozol için uyumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen Meletiadis ve ark. yaptığı çalışmada E-test ve Sensititre kolorimetrik metodu CLSI M38-A ile karşılaştırıldı. Ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda düşük düzeyde uyum saptamışlardır (110). Rutin çalışmalarda gradiyent test kullanılacaksa besiyeri olarak RPMI agar kullanılmalıdır (111).

### 2.5.1. Sıvı Dilüsyon Testleri

Sıvı dilüsyon testleri makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olmak üzere ikiye ayrılabilir. Makrodilüsyon testleri için hastadan izole edilen mikroorganizma ilacın iki kat sulandırımını içeren bir dizi tüpe inoküle edilir. Sonuçlar görsel olarak değerlendirilir; üremenin görülmediği ilk tüp minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilir. Aynı zamanda, MİK olarak belirlenen tüp ile takip eden tüplerden agar plaklara ekim yapılarak minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) da elde edilebilir. Çok sayıda antifungal duyarlılık testi yapılan merkezlerde, daha pratik ve sarf malzeme tüketiminin daha az olduğu, 96 kuyucuklu mikropaklarda uygulanan sıvı mikrodilüsyon testi tercih edilmektedir.

CLSI, küf mantarları için M38-A2 kılavuzlarını önerirken; EUCAST E.Def 9.2 kılavuzunu önermektedir. Her iki rehberde de, referans antifungal

duyarlılık testi olarak sıvı dilüsyon testleri önerilmekle birlikte, yöntemler arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır; CLSI U tabanlı, EUCAST düz tabanlı mikropalak kullanımını önermektedir; sıvı besiyeri olarak CLSI RPMI 1640 besiyerini önerirken, EUCAST' te bu besiyerine %2' lik glukoz ilavesi dikkat çekmektedir; inokulum miktarını CLSI 0.4-5 x10<sup>4</sup> hücre\mL, EUCAST 1-2.5x 10<sup>5</sup> hücre\mL önermektedir; inkübasyon süresi için, CLSI 48 saatte, EUCAST 24-48 saatte değerlendirmeyi önermektedir.

Tüm bu farklılıklara rağmen CLSI ve EUCAST mikrodilüsyon testlerinde hem *Candida* türleri hem de *Aspergillus* türleri için uyum oranları sırasıyla %90-99, %98-100' dür. Önemli olan tüm laboratuvarların yapılan antifungal duyarlılık testlerini belli standartlara uyarak çalışması ve bu standartlar doğrultusunda raporlamasıdır (112).

Sıvı mikrodilüsyon testlerinde de sonuçlar görsel olarak değerlendirilmekte olup, CLSI-M38-A2 rehberine göre amfoterisin B ve azol grubu antifungaller için üremenin tamamen inhibe edildiği ilk kuyucuk, 5-florositozin için ise üremenin belirgin (%50' den fazla) azaldığı ilk kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmektedir. Hem CLSI hem de EUCAST ekinokandin grubu antifungaller için 21-26 saat inkübasyonunun yeterli olduğunu benimsemiştir. Ekinokandinler için hiflerin kısalıp kalınlaştığı, dallanmaların arttığı ilk kuyucuk "minimum efektif konsantrasyon (MEK)" olarak belirlenmiştir.

Sensititre YeastOne kolorimetrik panel *Aspergillus* türleri için antifungal duyarlılık testlerinde kullanılabilir. Sensititre YeastOne paneli, 96 kuyucuklu bir sıvı mikrodilüsyon testi olup sonuçlar kuyucuklardaki renk değişikliğine göre değerlendirilir.

### 2.5.2. Gradient Test

Azalan dilüsyonlarda antifungal ajan emdirilmiş kâğıt ya da plastik striplerin, test edilecek mikroorganizma besiyerine yayıldıktan sonra agar üzerine yerleştirilmesi esasına dayanan bir testtir. Sonuçlar genellikle 24-48 saat sonra değerlendirilir. Üreme inhibisyon zonu ile antifungal emdirilmiş kâğıdın kesişim noktasındaki değer MİK olarak kabul edilir.

### 2.5.3. Disk Difüzyon Testi

*Aspergillus* türleri için disk difüzyon kullanılacaksa Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine benzer şekilde metilen mavisi eklenmiş Mueller -Hinton ya da RPMI agar besiyerine 0.5 McFarland bulanıklıkta ayarlanan mikroorganizma inoküle edilir. 24 saat sonra AMB (Amfoterisin B) için tam inhibisyon çapı zon çapı olarak belirlenirken; diğer antifungallerde zon içi üremeler göz ardı edilir (113).

### 2.5.4. Otomatize Antifungal Duyarlılık Testleri

Bakteri tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri için geliştirilmiş bazı ticari otomatize sistemlerde, maya mantarlarına yönelik identifikasyon ve duyarlılık panelleri bulunmakla birlikte, henüz *Aspergillus* ya da diğer küf mantarları için böyle sistemler bulunmamaktadır.

## 2.6. Antifungal İlaçlar

### 2.6.1. Azoller

Azol grubu antifungaller, kimyasal formülünde azol halkası içeren bileşiklerdir. Azoller genel anlamda fungistatik etki gösterirler. Ancak bazı triazoller bazı mantarlara karşı fungisidal etki göstermektedir. Bunun en güzel örneği vorikonazolün *Aspergillus' a* olan fungisidal etkisidir (114). Azoller halkasındaki nitrojen sayılarına göre imidazoller ve triazoller olarak iki gruba ayrılırlar. Ketokonazol, mikonazol ve klotrimazol gibi imidazoller iki nitrojen, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, isavukonazol ve ravukonazol gibi triazoller üç nitrojene sahiptir. Azoller sitokrom p450 bağımlı 14 $\alpha$  demetilaz enzimini inhibe ederler. Böylece ergosterolden lanestrol sentezi engellenmiş olur ve hücre membranı sentezlenemez.

Flukonazol, günümüzde *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Ayrıca transplant olguları, kriptokok menenjitini geçirmiş AIDS olgularında profilaksi amacıyla tercih edilmektedir. Bununla birlikte, *C.krusei* flukonazole doğal dirençlidir ve *Aspergillus*, *Mucorales* gibi küf

mantarlarına karşı da flukonazolün etkinliği yoktur (115,116). Flukonazol tedavisine bağlı yan etkiler nadir olarak gözlenir. Flukonazol tedavisi sırasında alerjik reaksiyonlar, anjiyoödem, trombositopeni ve alopesi gelişebilir (117).

İtrakonazol *Candida* türleri, *Aspergillus* türleri ve endemik mikroorganizmalara karşı etkilidir. İtrakonazolün flukonazole üstünlüğü *Aspergillus* türlerine karşı etkinliğinin olmasıdır. İtrakonazole karşı gelişen yan etkiler flukonazole karşı gelişen yan etkiler ile benzerdir. Ancak itrakonazole bağlı gelişen gastrointestinal yan etkiler daha sıktır (118). Yüksek doz kullanımında hipokalemi, ödem ve hipertansiyon gelişebilir (119).

Vorikonazol yapısal olarak flukonazole benzeyen bir triazoldür. In vitro olarak *Candida* türleri, *Aspergillus* türleri, *Fusarium* ve dermatofitlere karşı etkinliği mevcuttur. Zigomiçetlere karşı etkinliği yoktur. Klinik olarak öncelikli kullanım yeri invaziv aspergillozudur. İnvaziv aspergilloz tedavisinde sağ kalım üzerine etkisi amfoterisin B' den üstündür. Vorikonazol kullanımı sırasında en sık gözlenen yan etkiler geçici görme bozuklukları ve karaciğer enzimlerinde artmadır (120). QT uzaması, ventriküler taşikardi, periferik nöropati, döküntü, fotosensitivite diğer yan etkilerdendir. Yüksek doz vorikonazol konsantrasyonlarına bağlı olarak hipoglisemi, elektrolit bozuklukları ve pnömoni de bildirmiştir (121).

Posakonazol yapısal olarak florlanmış itrakonazol türevidir. İmmün düşkün bireylerde *Aspergillus* ve *Candida* enfeksiyonlarının profilaksisinde ve flukonazol- itrakonazol dirençli orofarengeal kandidiyazis tedavisinde FDA onayı mevcuttur (122). Posakonazolün *Mucorales* türlerine karşı etkinliği diğer triazolere kıyasla oldukça üstündür.

Ketakonazol günümüzde sistemik olarak kullanılan tek imidazol türevidir. *Trichopyton rubrum* ve *Malassezia* türlerinin tedavisinde kullanılır. *Aspergillus* türleri, *Fusarium* türleri ve zigomiçetler ketokonazole dirençlidir (123).

Azol antifungallere direnç, doğal ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılabilir. Doğal direnç, bir tür ya da kökenin kalıtımla gelen özelliğidir. Kazanılmış direnç ise sıklıkla uzun süre antifungal tedavi alan bireylerde duyarlı bir izolatın dirençli hale gelmesidir. Örneğin, *Candida krusei* azollere

doğal olarak dirençlidir. Kazanılmış azol direnci ise 1990' lı yıllarda HIV ile enfekte hastalardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde ortaya çıkmıştır (124). Kazanılmış azol direnci için bildirilen bazı mekanizmalar gen mutasyonları, genin ekspresyonunda artış, atım pompalarının aktivasyonunda artış ve membran geçirgenliğinde azalma olarak sayılabilir (125).

### 2.6.2. Ekinokandinler

Ekinokandinler, geniş bir etki spektrumuna sahip lipopeptit yapılı bileşiklerdir. Diğer antifungallerden farklı olarak mantar hücre duvarında bulunan 1,3 -beta-d-glukan sentezini inhibe etmesi ve memeli hücrelerine zarar vermemesi nedeniyle tercih edilmektedir (126). Ekinokandinler hücre duvar sentezini bozduklarından *Candida* ve *Saccharomyces* türlerine fungisidal etkilidir. Ancak *Aspergillus* türlerinde fungustatik etki göstermektedir. Bu durum mantar hücre duvarında değişen oranlarda glukan bulunmasına bağlanmıştır (127).

Klinik kullanımı olan üç antifungal vardır. Bunlar; anidulafungin, kaspofungin ve mikafungindir (128,129). Kaspofungin ilk FDA onayı alan ekinokandin olup sonrasında mikafungin 2005' te, anidulafungin 2006' da FDA onayı almıştır (130).

Kaspofungin; invaziv *Candida* enfeksiyonlarında, lipozomal amfoterisin B ve vorikanozole dirençli invaziv aspergilloz tedavisinde kullanılmaktadır. Anidulafungin; invaziv kandidiyazis ve kandida özefajit tedavisinde kullanılmaktadır. Mikafungin de invaziv kandidiyaziste kullanılmakla birlikte allojenik kemik iliği yapılan hastalarda profilaksi için tercih edilmektedir.

Ekinokandinler nefrotoksik ya da hepatotoksik değildir. Alerjik tipte yan etkiler sık görölmekle birlikte diğer yan etkiler nadirdir (131).

Ekinokandin direnci tüm mantarlarda aydınlatılmamış olmakla birlikte glukan sentaz enziminin FKS subunitiyle ilişkilendirilmiştir (132). *Aspergillus* türlerinde ise kaspofungin direnciyle ilgili çalışmalarda direncin AfFKS1 genindeki mutasyonla ilişkili olabileceği düşünölmüştür (133).

### 2.6.3. Polyenler

Amfoterisin B ve nistatin bu grupta yer alır. Nistatinin topikal kullanımı mevcutken, amfoterisin B sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılır (134).

AMB mantar hücre duvarında bulunan ergosterol gibi sterollere bağlanarak delikler oluşturarak hücre zarı geçirgenliğini artırır. Ardından intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin hücre dışına kaçışıyla mantar hücresinin ölümü gerçekleşir (135).

Amfoterisin B *Candida* türlerine, *Aspergillus* türlerine, *Mucorales* takımına, çeşitli fırsatçı mikoz ve endemik mikozlara karşı etkinliği olan etki spektrumu geniş, fungisidal bir antifungaldir (106). *Aspergillus* türleri genellikle polyenlere duyarlı olmasına rağmen *Aspergillus lentulus* ve *Aspergillus fumigati* gibi bazı türlerde artmış MİK değerleri rapor edilmektedir. Ayrıca amfoterisin B 'nin *Aspergillus terreus* 'a karşı etkinliği sınırlıdır.

Amfoterisin B 'nin başlıca kullanım endikasyonları invaziv kandidoz, kriptokokkoz, blastomikoz, histoplazmoz, koksidyoidomikoz, sporotrikoz, parakoksidyoidomikoz ve antibakteriyel ilaçlara cevap vermeyen febril nötropenik hastaların ampirik tedavisidir (136). Geçmişte AMB aspergillozis tedavisinin köşe taşıydı. Ancak günümüzde ilk seçenek ilaç vorikonazoldür (137).

Amfoterisin B 'ye bağlı gelişen yan etki nefrotoksisitedir. Bunun dışında ateş, titreme, miyalji, hipotansiyon, bronkospazm ve tromboflebit gelişebilir. Amfoterisin B 'nin üçü lipozomal olmak üzere dört farklı formülasyonu bulunmaktadır. Lipozomal AMB bileşiklerinin yan etkisi daha az olduğundan günümüzde daha çok tercih edilmektedir (138).

Fungisidal etkili AMB' ye karşı kazanılmış direnç oluşumu nadirdir. Sıklıkla inatçı ve tekrarlayan sistemik mantar enfeksiyonları için AMB almış kanser hastalarından izole edilen mayalarda ortaya çıkar.

*Aspergillus* türlerinin tamamında klinik sınır değerler bulunmamakla birlikte EUCAST ve CLSI rehberlerinden ECOFF (epidemiolojik eşik değeri) ve bazı türler için klinik sınır değerlere ulaşılabilir.

Tablo 2.1. Sık karşılaşılan *Aspergillus* türlerinde epidemiyolojik eşik değer ve klinik sınır değer

Aspergillus türleri		Epidemiyolojik eşik değer (ECOFF µg/mL)				Klinik sınır değer (µg/mL)						
		AMB	ITR	VOR	POS	AMB ≤S >R >R	ITR ≤S >R	VOR ≤S >R	POS ≤S >R	ISA ≤S		
<i>A. fumigatus</i>	CLSI	2	1	1	0.25							
	EUCAST	1	1	1	0.25	1 2 1	1 2	1 2	0.12 0.25	1		
<i>A. flavus</i>	CLSI	2	1	1	0.25							
	EUCAST	4	1	2	0.50	1 2						
<i>A. terreus</i>	CLSI	4	0.5	1	0.50							
	EUCAST	4	0.5	2	0.25	1 2			1 1			
<i>A. niger</i>	CLSI	2	2	2	0.50							
	EUCAST	1	4	2	0.50	1 2						

*Aspergillus* türleri içinde antifungal direnç sorunu ilk olarak 1990' lı yılların sonunda *Aspergillus fumigatus* izolatlarında görülen azol direnciyle ortaya çıkmıştır (139). Azoller, özellikle *Aspergillus* enfeksiyonlarında oral kullanılabilmesi ve etkinliği, tolere edilebilirliği, nispeten düşük toksik etkileri nedeniyle tercih edilmektedir. Azol direncinin oluşmasıyla ilgili iki ihtimal düşünülmektedir. Birincisi tarımda fungusit olarak azollerin tercih edilmesi; ikincisi ise kliniklerde yaygın olarak azol kullanımının tercih edilmesidir (140).

#### 2.6.4.Farnesol

Yüksek yapılı canlılar gibi mikroorganizmaların da birbiriyle iletişime geçtiği ilk kez Fuqua ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır. *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* normalde deniz suyunun mililitresinde 100' den az sayıda bulunan ve ışık yapmayan iki deniz bakterisidir. Ancak bakteriler bazı deniz balıklarının ışık organellerinde yerleştiğinde ve yüksek yoğunluğa ulaştıklarında çevreye ışık saçabilmektedirler. Bakterilerin, bu özelliği ortama salgıladıkları bazı moleküllerin ortamdaki yüksek yoğunluğunu hissederek kazandıkları öne sürülmektedir (141). Bu sonuçlardan yola çıkılarak, bakterilerin bazı moleküller yardımı ile ortamdaki bakteri yoğunluğunu hissetmesine "quorum sensing" (QS) denilmektedir (142,143).

Quorum sensing molekülleri hücrenin dışına salgılanarak hücre dışında birikirler. Sinyal molekülleri pasif difüzyon, atım pompaları ya da özgün taşıyıcılar aracılığı ile zardan geçiş göstermektedir. Yeterli miktarda sinyal biriktiğinde ilgili genlerin ekspresyonu uyarılmaktadır (144).

Bakteriler gibi mantarlarda da QS düzenlemelerinin bulunduğu ve biyofilm oluşumu, patogenez gibi mantarların topluluk temelli davranışlarını etkilediği bildirilmektedir. Bu konuda en yoğun çalışma *C. albicans* üzerinedir (144).

Farnesol, farnesil pirofosfatın defosforilasyonu ile üretilen izoprenoid türevi doğal bir bileşiktir. Ökaryotik canlılarda bulunan ilk quorum sensing molekülüdür. Farnesol 2001 yılında birbirinden bağımsız iki grubun çalışması sonucu keşfedilmiştir. *C. albicans* izolatlarının supernatanlarından elde edilmiş ve hifal gelişimi önlediği fark edilmiştir (145,146).

*C. albicans* ekstraktlarının farnesol üreten bir enzime sahip olduğu gösterilmiştir. Ergosterol biyosentezinde görevli olan squalen sentaz enziminin inhibisyonu ile farnesol üretimi artmaktadır. Azollerin ergosterol sentezini bozması sonucunda belki de farnesil pirofosfat öncüllerinin birikmesi nedeni ile farnesol miktarında artış olmaktadır (147).

Farnesolün *Saccharomyces cerevisiae*'de reaktif oksijen metabolitlerini arttırarak büyümeyi engellediği gösterilmiştir (148). Farnesolün *Aspergillus nidulans*'in hifal yapısına etkisi olmadığı ancak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (149). Bir sesquiterpen alkol olan farnesol birçok bitkisel yağda bulunmaktadır. Papatya, yasemin, gül gibi ılıman iklimlerde yetişen bitkilerden elde edilebilmektedir. Farnesolün antibakteriyel, antikandidal ve hatta antitümoral etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (150). Son yıllarda doğal ürünlerin antifungal etkileri araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Çalışmamızda farnesolün antifungallerle sinerjik etkileri gösterilirse mantar hücrelerinin ölüm hızını arttırarak tedavi süresi kısalsabilir, ilaca direnç gelişimi önlenabilir ve etki spektrumu genişleyebilir. Ayrıca bu sayede ilaçların dozları azaltılacağından, muhtemel yan etkiler de azalacaktır. Ancak bu yaklaşımla, antagonistik ilaç etkileşimi ve toksisite ortaya çıkabileceğinden, herhangi bir kombinasyonun etkinliğini, klinik kullanımı öncesinde in vitro ortamda dikkatlice değerlendirmek önemlidir.



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı' na gönderilen solunum yolu örneklerinden izole edilmiş 31 *Aspergillus fumigatus* ve 14 *Aspergillus flavus* izolatu çalışmaya alındı.

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 11.09.2018 tarih ve 02 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

#### 3.1.İzolatların Tanımlanması

Enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen suşlar SDA besiyerine pasajlandı ve koloni morfolojileri, sıcaklık toleransı ve mikroskopik özelliklerine göre tanımlandı. Tanımlanan izolatlar çalışmaya alınana kadar  $-70^{\circ}\text{C}$ ' de, %20 gliserol içeren stok besiyerinde ve oda sıcaklığında steril distile suda saklandı. Çalışma öncesinde tüm izolatların iki kez SDA besiyerine alt kültürleri yapıldı. Pasajlar  $30^{\circ}\text{C}$ ' de, kültürlerde yeterli sporlanma oluşana sporlanana kadar ortalama 4-7 gün inkübe edildi.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

##### 3.2.1 RPMI 1640 Besiyeri (L-Glutaminli Besiyerinin İçeriği ve Hazırlanışı

RPMI 1640 medium 10,4 g/L (Sigma- Aldrich,Steinheim , Germany)

MOPS 34,50 g/L (Merck, Darmstadt,Germany)

D-glukoz 20 g/L (Merck, Darmstadt,Germany)

NaOH

900 ml distile suda 10.4 gr RPMI 1640 medium çözdürüldü. Bu çözeltiye 34,50 g/L MOPS eklendi ve tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Bu sırada 1 mol/L NaOH eklenerek Ph 7.0 olarak ayarlandı. Besiyerinin son hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri filtrasyon yöntemiyle steril edilerek kullanılıncaya kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

### 3.2.2 SDA Besiyeri İçeriği ve Hazırlanışı

Pepton 10 g/L

D Glukoz 40 g/L

Agar 15 g/L

Toz besiyeri 1 litre için 65 gram tartıldı ve 1 litre distile suda homojen olarak çözdürüldü. Otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edildikten sonra petri kaplarına döküldü. Kullanılincaya kadar +4°C' de saklandı.

### 3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Çalışmaya alınacak tüm izolatların vorikonazol, anidulafungin, amfoterisin B ve farnesole duyarlılıklarını değerlendirmek için CLSI M38-A2 rehberi doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon antifungal duyarlılık testi uygulandı. Çalışmada kullanılacak farnesol MİK ve anidulafungin MEK aralıklarını belirlemek üzere rastgele seçilen 7 izolat ön çalışmaya alındı. Bu çalışmada kaspofungin MEK aralıkları 0.015-0.03 µg/mL, farnesol MİK aralıkları 375-6000 µM olarak bulundu.

AMB, VOR, AND için 3200 µg/mL, FAR (farnesol) için 37000 µM konsantrasyonlarında stok solüsyonlar DMSO ile hazırlandı (FAR için %30' luk DMSO kullanıldı). Stok solüsyonlarından hazırlanan AMB, VOR, AND ve FAR dilüsyonları Tablo 3.1.' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Antifungal ajanların mikrodilüsyon test konsantrasyonları

Antifungal ajanlar	Mikrodilüsyon test konsantrasyonları (µg/ml)
AMB	0.0075 0.015 0.03 0.06 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8
VOR	0.0075 0.015 0.03 0.06 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8
AND	0.0035 0.007 0.015 0.03 0.06 0.125 0.25 0.5 1 2 4
FAR (µM)	94 187 375 750 1500 3000 6000 12000

AND stok solüsyonundan (3200 µg/ml) 200 mikrolitre alınıp 1800 mikrolitre DMSO eklendi. 320 µg/ml olan antifungal karışımından RPMI 1640 besiyeri ile dilüe ederek 40 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml olan dilüsyonlar elde edildi. Mikroplaklarda kullanılacak dilüsyonlar bu dilüsyonlardan elde edildi. AMB, VOR ve FAR için de aynı işlemler uygulandı. Hazırlanan bu dilüsyonlar U tabanlı, 96 kuyucuklu mikroplaklara 100' er µL dağıtıldı. Tüm mikroplaklar kullanılabana dek -70 °C' de saklandı.

### **3.4. Checkerboard (dama tahtası) Yöntemi**

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmış olan MİK/MEK değerleri dikkate alınarak, RPMI 1640 broth ile amfoterisin B için 0.0075-8 µg/ml, anidulafungin için 0.0035-4 µg/ml, vorikonazol için 0.0075-8 µg/ml ve farnesol için 6000-94 µM arasındaki iki kat azalan dilüsyonlarda ve mikroplaktaki son konsantrasyonun 4 katı olacak şekilde antifungal solüsyonlar hazırlandı. Her bir suş ve her bir kombinasyon testi için bir tane kullanılmak üzere U tabanlı, 96 kuyucuklu mikroplaklara 50' şer µL dağıtıldı.  $1-5 \times 10^3$  CFU/ml (plaktaki inokülümün iki katı) olacak şekilde mantar süspansiyonu hazırlandı ve mikroplaktaki tüm kuyucuklara 100' er µL dağıtıldı. Bu şekilde inokülüm konsantrasyonu  $\frac{1}{2}$  ve ilaç konsantrasyonları  $\frac{1}{4}$  oranında seyreltilerek test konsantrasyonlarına ulaşılmış oldu (50 µL ilaç A + 50 µL ilaç B + 100 µL mantar süspansiyonu). İlk sütuna sadece farnesol, son satıra sadece antifungal dilüsyonları koyuldu. H1 kuyucuğu üreme kontrol, A12 kuyucuğu sterilite kontrol olarak kullanıldı. Hazırlanan mikroplaklar kullanılabana dek -70 °C' de saklandı.

Tablo 3.2. Dama tahtası yönteminin şematik gösterimi

6000 $\mu$ M FAR	6000 FAR+ 0.0075 AMB	6000 FAR+ 0.015 AMB	6000 FAR+ 0.03 AMB	6000 FAR+ 0.06 AMB	6000 FAR+ 0.125 AMB	6000 FAR+ 0.25 AMB	6000 FAR+ 0.5 AMB	6000 FAR+ 1 AMB	6000 FAR+ 2 AMB	6000 FAR+ 4 AMB	H1 STERİLİTE KONTROL
3000 $\mu$ M FAR	3000 FAR+ 0.0075 AMB	3000 FAR+ 0.015 AMB	3000 FAR+ 0.03 AMB	3000 FAR+ 0.06 AMB	3000 FAR+ 0.125 AMB	3000 FAR+ 0.25 AMB	3000 FAR+ 0.5 AMB	3000 FAR+ 1 AMB	3000 FAR+ 2 AMB	3000 FAR+ 4 AMB	3000 FAR+ 8 AMB
1500 $\mu$ M FAR	1500 FAR+ 0.0075 AMB	1500 FAR+ 0.015 AMB	1500 FAR+ 0.03 AMB	1500 FAR+ 0.06 AMB	1500 FAR+ 0.125 AMB	1500 FAR+ 0.25 AMB	1500 FAR+ 0.5 AMB	1500 FAR+ 1 AMB	1500 FAR+ 2 AMB	1500 FAR+ 4 AMB	1500 FAR+ 8 AMB
750 $\mu$ M FAR	750 FAR+ 0.0075 AMB	750 FAR+ 0.015 AMB	750 FAR+ 0.03 AMB	750 FAR+ 0.06 AMB	750 FAR+ 0.125 AMB	750 FAR+ 0.25 AMB	750 FAR+ 0.5 AMB	750 FAR+ 1 AMB	750 FAR+ 2 AMB	750 FAR+ 4 AMB	750 FAR+ 8 AMB
375 $\mu$ M FAR	375 FAR+ 0.0075 AMB	375 FAR+ 0.015 AMB	375 FAR+ 0.03 AMB	375 FAR+ 0.06 AMB	375 FAR+ 0.125 AMB	375 FAR+ 0.25 AMB	375 FAR+ 0.5 AMB	375 FAR+ 1 AMB	375 FAR+ 2 AMB	375 FAR+ 4 AMB	375 FAR+ 8 AMB
187 $\mu$ M FAR	187 FAR+ 0.0075 AMB	187 FAR+ 0.015 AMB	187 FAR+ 0.03 AMB	187 FAR+ 0.06 AMB	187 FAR+ 0.125 AMB	187 FAR+ 0.25 AMB	187 FAR+ 0.5 AMB	187 FAR+ 1 AMB	187 FAR+ 2 AMB	187 FAR+ 4 AMB	187 FAR+ 8 AMB
94 $\mu$ M FAR	94 FAR+ 0.0075 AMB	94 FAR+ 0.015 AMB	94 FAR+ 0.03 AMB	94 FAR+ 0.06 AMB	94 FAR+ 0.125 AMB	94 FAR+ 0.25 AMB	94 FAR+ 0.5 AMB	94 FAR+ 1 AMB	94 FAR+ 2 AMB	94 FAR+ 4 AMB	94 FAR+ 8 AMB
A12 ÜREME KONTROL	0.0075 $\mu$ g/mL	0.015 $\mu$ g/mL	0.03 $\mu$ g/mL	0.06 $\mu$ g/mL	0.125 $\mu$ g/mL	0.25 $\mu$ g/mL	0.5 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/mL	4 $\mu$ g/mL	8 $\mu$ g/mL

### 3.5. İzolatların İnokülasyonu ve Değerlendirilmesi

Çalışılacak izolatlar SDA plaklarına pasajlanıp 30 °C' de 4-5 gün inkübe edildi. Sporlanan izolatlardan 0.5 McFarland bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı. Homojen süspansiyon elde etmek için süspansiyonlara 50 mikrolitre kadar tween 20 damlatıldı. Her bir izolat RPMI besiyerinde 1/50 oranında dilüe edilip mikroplaklara 100  $\mu$ l olacak şekilde dağıtıldı. Mikroplakların üzerine izolat numaraları yazılıp 35°C' de 48 saat inkübe edildi. AMB ve VOR için üremenin tam inhibe olduğu kuyucuklar MİK değerleri olarak kabul edildi. FAR için üreme kontrol kuyucuğuna göre belirgin (%50) azalmanın olduğu kuyucuk MİK olarak kabul edildi. AMB+FAR ve VOR+FAR

kombinasyon mikroplakları görsel olarak değerlendirildi. Tek başına AND ve AND+FAR kombinasyonu stereomikroskopta değerlendirilerek MEK sonuçları elde edildi.

Her bir izolat için 3 farklı kombinasyon değerlendirildi ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplanarak "sinerjistik", "etkisiz", "antagonistik " olarak tanımlandı. FİK indeksi, ilacın kombinasyondaki MİK değerinin tek başına test edildiğinde saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilen her bir ilacın fraksiyonel inhibitör konsantrasyonlarının toplanması ile elde edildi.



#### 4.BULGULAR

Çalışma kapsamında 31 *A. fumigatus* ve 14 *A. flavus* izolatının tümü sıvı mikrodilüsyon testine ve farnesol ile kombinasyon testine alındı. Her bir izolat için çalışma iki kez tekrarlandı. *A. fumigatus* izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.' de verilmiştir. *A. flavus* izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları ise Tablo 4.3.' te verilmiştir. Antifungallerin farnesol ile kombinasyon sonuçları ise Tablo 4.4., Tablo 4.5., Tablo 4.6., Tablo 4.7., Tablo 4.8., Tablo 4.9.' da özetlenmiştir.

*A. fumigatus* izolatlarında FAR duyarlılık aralığı 1500-6000  $\mu\text{M}$  olarak, VOR, AMB MİK ve AND MEK aralıkları sırasıyla 0.125-1  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\leq 0.0035$   $\mu\text{g/mL}$ ; 0.125-0.5  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlendi. Hesaplanan FİK indeksine göre *A. fumigatus* izolatlarının VOR ile kombinasyonunda 13 izolatta, AMB ile kombinasyonunda 7 izolatta antagonizma saptandı. AMB-FAR kombinasyonunda antagonizma saptanan 7 izolatın tamamında VOR-FAR kombinasyonu için de antagonizma saptandı.

*A. flavus* izolatlarında FAR duyarlılık aralığı ise 3000->6000  $\mu\text{M}$  olarak, VOR, AMB MİK ve AND MEK aralıkları sırasıyla 0.125-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\leq 0.0035$   $\mu\text{g/mL}$ ; 0.25-2  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlendi. *A. flavus* izolatları *A. fumigatus* izolatlarına göre FAR ve AMB için daha yüksek MİK değerlerine sahipti. Hesaplanan FİK indeksine göre *A. flavus* izolatlarının VOR ile kombinasyonunda 4 izolatta, AMB ile kombinasyonunda 4 izolatta antagonizma saptandı. AMB-FAR ve VOR-FAR kombinasyonlarında antagonizma saptanan izolatların tümü birbirinden farklıydı.

Farnesolün anidulafungin ile kombinasyonunda, çalışılan tüm izolatlar için mikropaktaki en düşük AND konsantrasyonundan ( $\leq 0.0035$   $\mu\text{g/mL}$ ) daha düşük MEK değerleri gözleendiğinden farnesol ile kombinasyonu değerlendirilemedi.

Tablo 4.1. *A. fumigatus* izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları

İzolat numarası	Farnesol ( $\mu\text{M}$ )	Vorikonazol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Anidulafungin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amfoterisin B ( $\mu\text{g/mL}$ )
8691422	3000	0.125	$=<0.0035$	0.125
729895	6000	0.5	$=<0.0035$	0.5
1663	3000	0.25	$=<0.0035$	0.125
1354	6000	0.5	$=<0.0035$	0.25
1689	6000	1	$=<0.0035$	0.25
2896513	3000	0.25	$=<0.0035$	0.5
1700	3000	0.5	$=<0.0035$	0.25
3783757	3000	0.5	$=<0.0035$	0.25
1370	6000	0.25	$=<0.0035$	0.5
61572127	6000	0.5	$=<0.0035$	0.5
1375	1500	0.25	$=<0.0035$	0.5
1340	6000	0.25	$=<0.0035$	0.25
1344	3000	0.5	$=<0.0035$	0.125
1369	3000	0.25	$=<0.0035$	0.125
1326	3000	0.25	$=<0.0035$	0.125

Tablo 4.2. *A. fumigatus* izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları

İzolat numarası	Farnesol ( $\mu\text{M}$ )	Vorikonazol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Anidulafungin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amfoterisin B ( $\mu\text{g/mL}$ )
1357	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1338	6000	0.25	=<0.0035	0.125
1342	3000	0.5	=<0.0035	0.5
1349	3000	0.5	=<0.0035	0.125
1347	3000	0.5	=<0.0035	0.5
1345	3000	0.25	=<0.0035	0.5
1367	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1377	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1817	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1666	3000	1	=<0.0035	0.25
1339	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1701	3000	0.5	=<0.0035	0.25
3305928	3000	0.5	=<0.0035	0.25
1331	6000	0.5	=<0.0035	0.125
6695832	6000	0.25	=<0.0035	0.25
1816	3000	0.5	=<0.0035	0.5



Tablo 4.3. *A. flavus* izolatlarında antifungal ve farnesol duyarlılık sonuçları

İzolat numarası	Farnesol ( $\mu\text{M}$ )	Vorikonazol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Anidulafungin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amfoterisin B ( $\mu\text{g/mL}$ )
1378	>6000	0.5	=<0.0035	1
6603730	6000	0.25	=<0.0035	0.5
16904	3000	0.25	=<0.0035	0.5
1352	6000	0.5	=<0.0035	0.5
1374	6000	0.5	=<0.0035	0.5
1702	6000	0.25	=<0.0035	1
1703	>6000	0.125	=<0.0035	1
3135874	3000	0.25	=<0.0035	0.5
1704	>6000	0.25	=<0.0035	0.5
4447756	6000	0.5	=<0.0035	2
1664	3000	0.25	=<0.0035	0.25
1705	3000	0.25	=<0.0035	0.5
1566	6000	0.25	=<0.0035	0.5
1706	3000	0.5	=<0.0035	0.5

Tablo 4.4. *A. fumigatus* izolatlarında farnesol ile vorikonazolün kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb. Vor ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK indeksi	Yorum
8691422	94	0.25	2.031	Etkisiz
729895	94	1	2.031	Etkisiz
1663	94	0.5	2.031	Etkisiz
1354	94	1	2.015	Etkisiz
1689	94	1	1.015	Etkisiz
2896513	6000	1	6	<b>Antagonizma</b>
1700	6000	0.5	3	Etkisiz
3783757	94	0.5	1.031	Etkisiz
1370	94	0.5	2.015	Etkisiz
61572127	94	0.5	1.015	Etkisiz
1375	94	0.5	2.06	Etkisiz
1340	94	1	4.01	<b>Antagonizma</b>
1344	94	2	4.031	<b>Antagonizma</b>
1369	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1326	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>

Tablo 4.5. *A. fumigatus* izolatlarında farnesol ile vorikonazolün kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb. Vor ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK İndeksi	Yorum
1357	750	2	8.25	<b>Antagonizma</b>
1338	94	1	4.015	<b>Antagonizma</b>
1342	94	2	4.031	<b>Antagonizma</b>
1349	94	2	4.031	<b>Antagonizma</b>
1347	94	0.5	1.031	Etkisiz
1345	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1367	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1377	94	0.5	2.031	Etkisiz
1817	94	0.5	2.031	Etkisiz
1666	94	2	2.031	Etkisiz
1339	94	0.5	2.031	Etkisiz
1701	94	1	2.031	Etkisiz
3305928	94	1	2.031	Etkisiz
1331	94	2	2.031	<b>Antagonizma</b>
6695832	3000	2	8.5	<b>Antagonizma</b>
1816	94	0.5	1.031	Etkisiz

Tablo 4.6. *A. flavus* izolatlarında farnesol ile vorikonazol kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb.Vor ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK İndeksi	Yorum
1378	94	0.5	1.078	Etkisiz
6603730	94	0.5	2.015	Etkisiz
16904	94	0.5	2.031	Etkisiz
1352	94	1	2.015	Etkisiz
1374	6000	2	5	<b>Antagonizma</b>
1702	375	0.5	2.06	Etkisiz
1703	94	0.5	4.078	<b>Antagonizma</b>
3135874	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1704	94	0.5	2.078	Etkisiz
4447756	175	1	2.02	Etkisiz
1664	94	0.5	2.031	Etkisiz
1705	94	0.5	2.031	Etkisiz
1566	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1706	94	0.5	2.25	Etkisiz

Tablo 4.7. *A. fumigatus* izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb. Amb ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK İndeksi	Yorum
8691422	94	0.25	2.031	Etkisiz
729895	94	1	2.031	Etkisiz
1663	94	0.25	2.031	Etkisiz
1354	94	0.5	2.015	Etkisiz
1689	94	0.5	2.015	Etkisiz
2896513	94	1	2.031	Etkisiz
1700	94	0.5	2.031	Etkisiz
3783757	94	0.5	2.031	Etkisiz
1370	94	1	2.015	Etkisiz
61572127	375	0.25	0.56	Etkisiz
1375	94	1	2.06	Etkisiz
1340	94	1	4.01	<b>Antagonizma</b>
1344	94	0.25	2.31	Etkisiz
1369	94	0.5	4.031	<b>Antagonizma</b>
1326	94	0.5	4.031	<b>Antagonizma</b>

Tablo 4.8. *A. fumigatus* izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb. Amb ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK İndeksi	Yorum
1357	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1338	175	1	8.029	<b>Antagonizma</b>
1342	94	1	2.031	Etkisiz
1349	94	0.5	4.031	<b>Antagonizma</b>
1347	94	0.5	1.031	Etkisiz
1345	94	0.5	1.031	Etkisiz
1367	94	1	4.031	<b>Antagonizma</b>
1377	94	0.5	2.031	Etkisiz
1817	94	0.5	2.031	Etkisiz
1666	94	0.25	1.031	Etkisiz
1339	94	0.5	2.031	Etkisiz
1701	94	0.5	2.031	Etkisiz
3305928	94	0.5	2.031	Etkisiz
1331	94	0.25	2.015	Etkisiz
6695832	94	0.5	2.015	Etkisiz
1816	94	1	2.031	Etkisiz

Tablo 4.9. *A. flavus* izolatlarında farnesol ile amfoterisin B kombinasyon sonuçları

İzolat numarası	Komb. Far ( $\mu\text{M}$ )	Komb. Amb ( $\mu\text{g/mL}$ )	FİK İndeksi	Yorum
1378	94	2	2.078	Etkisiz
6603730	3000	2	4.5	<b>Antagonizma</b>
16904	1500	1	2.5	Etkisiz
1352	94	0.5	1.015	Etkisiz
1374	94	1	2.015	Etkisiz
1702	375	2	2.06	Etkisiz
1703	375	1	1.31	Etkisiz
3135874	94	1	2.031	Etkisiz
1704	94	1	2.078	Etkisiz
4447756	3000	16	8.5	<b>Antagonizma</b>
1664	94	0.5	2.031	Etkisiz
1705	3000	4	9	<b>Antagonizma</b>
1566	94	1	2.031	Etkisiz
1706	6000	4	10	<b>Antagonizma</b>

## 5.TARTIŞMA

Mantar enfeksiyonlarının sıklığındaki artış, beraberinde tedavi ve direnç sorununu gündeme getirmiştir. Mantar hücresinin ökaryotik doğası nedeniyle, tedavide kullanılmak üzere, FDA tarafından farklı kimyasal sınıflardaki birkaç antifungal ilaç onaylanmış olmakla birlikte, tedavi genellikle yüksek toksisite, düşük tolere edilebilirlik veya dar etki spektrumu nedeniyle güçtür. Bu zorluklar, invaziv enfeksiyonların tedavisinde kombinasyon tedavilerine ya da ilaç dışı bazı maddelerin tedavide kullanımına yönelik çalışmaları gerekli kılmıştır. Bunun yanında antifungallerin etkinliğinin artırılması ya da etki spektrumunun genişletilmesini içeren bir yaklaşım da mevcuttur. Bitkisel kaynaklı birçok molekülün çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkinliğinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur (151). Bu çalışmada ise tüm dünyada bilinen ve kozmetik alanında yaygın olarak kullanılan bitkisel kaynaklı bir molekül olan farnesolün antifungal etkinliği yanısıra, bu molekülün antifungaller üzerine olumlu etkilerinin araştırılması amaçlanmış, ucuz, doğal, toksik olmayan ve kolay ulaşılabilir bu molekülün antifungallere anlamlı katkısı saptanırsa, invaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanacağı düşünülmüştür.

Hsueh ve ark. (152) çeşitli mantar türlerinin dört farklı antifungale karşı duyarlılık profillerini değerlendirmişlerdir. *A. fumigatus* (n=40) için MİK aralıklarını VOR ve AMB için sırasıyla 0.06-0.5 µg/ml ve 0.25-2 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. *A. flavus* (n=24) için VOR ve AMB MİK aralıklarını sırasıyla 0.12-0.5 µg/ml ve 0.25-1 µg/ml olarak saptamışlardır.

Messer ve ark. (153) yaptığı çalışmada *A. fumigatus* izolatlarında (n=52) VOR, AMB ve FLU için MİK aralıklarını 0.12-2 µg/ml, 116 µg/ml ve 64->256 µg/ml olarak tespit ettiler.

Günümüzde yeni antifungallere olan ihtiyaç hem doğal bileşiklere ilgiyi arttırdı hem de yeni ilaç denemelerine hız kazandırdı. Pfaller ve ark. (154) 2016 yılında CD101 isimli yeni ekinokandini *Aspergillus* ve *Candida* izolatlarında CLSI ve EUCAST önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon çalışarak rutin kullanımdaki antifungallerle karşılaştırmışlardır. Yirmi *A. fumigatus* izolatında AND duyarlılıklarını izolatların 15'inde  $\leq 0.008$  µg/ml; 4'ünde 0.015 µg/ml;



1'inde ise 0.03 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. On iki *A. flavus* izolatında AND duyarlılıklarını ise izolatların 11'inde  $\leq 0.008$  µg/ml; 1'inde 0.015 µg/ml olarak bulmuşlardır. CD101 isimli yeni antifungalın klinik kullanımındaki antifungallerle iyi bir uyum gösterdiği görülmüştür.

Pfaller ve ark. (155) AMB ve azol dirençli 78 klinik *Aspergillus* izolatını yeni bir antifungal olan E1210 ve AND, VOR, POS, CAS, ITR antifungallerine karşı CLSI ve EUCAST önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon testi uygulamışlardır. Yirmi iki *A. fumigatus* izolatının 14' ünün AND duyarlılığını  $\leq 0.008$  µg/ml, 8' inin duyarlılığını 0.015 µg/ml olarak değerlendirmişlerdir. VOR duyarlılıklarını ise 4'ünde 0.25 µg/ml, 10'unda 0.5 µg/ml, 3'ünde 1 µg/ml, 4' ünde 2 µg/ml, 1' inde  $\geq 8$  µg/ml olarak saptamışlardır. Yirmi *A. flavus* izolatında AND duyarlılığını tamamında  $\leq 0.008$  µg/ml; VOR duyarlılıklarını ise 4' ünde 0.5 µg/ml, 14' ünde 1 µg/ml, birinde 2 µg/ml, birinde 4 µg/ml olarak saptamışlardır.

Astvad ve ark. (156) 2015 yılında FDA ve EMA tarafından onay alan isavukanozol ve VOR antifungallerini kullanarak 958 *Aspergillus* izolatını EUCAST önerileri doğrultusunda test etmişlerdir. İki yüz on bir *A. fumigatus* izolatında VOR MİK aralıkları  $\leq 0.125$ ->16 µg/ml iken; 19 *A. flavus* izolatında VOR MİK aralıkları 0.5-2 µg/ml olarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda isavukanozol ve vorikonazolün in vitro duyarlılıkları benzer bulunmuştur.

Buil ve ark. (157) F901318 isimli pirimidin biyosentezinde görevli dihidrooratat dehidrojenaz enzimini hedef alan yeni bir antifungalı 213 *Aspergillus* izolatında EUCAST önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon testine almışlardır. Yeni antifungalı beraber VOR, AMB, ITR, ISA, POS ve AND duyarlılıklarını da test etmişlerdir. Azol dirençli *A. fumigatus* izolatlarında (n=133) VOR MİK aralıkları 0.125->16 µg/ml; sokak tipi *A. fumigatus* izolatlarında (n=10) VOR MİK aralıkları 0.25–1 µg/ml olarak değerlendirilmiştir. Aynı izolatlarda AMB MİK aralıkları sırasıyla azol dirençli izolatlar için 0.25-2 µg/ml; sokak tipi izolatlar için 0.5-1 µg/ml olarak değerlendirilmiştir. AND MEK aralıkları ise azol dirençli izolatlarda  $< 0.016$ -2 µg/ml sokak tipi izolatlarda 0.016 –0.031 µg/ml olarak bulunmuştur. *A. flavus* izolatlarında (n=10) ise VOR,

AMB MİK ve AND MEK aralıkları sırasıyla 1->16 µg/ml; 1->16 µg/ml; 0.016-0.031 µg/ml olarak saptanmıştır.

Buna göre, literatürde *Aspergillus* türlerinin antifungal duyarlılıklarının değerlendirildiği çalışmalarda MİK/MEK aralıkları VOR için *A. fumigatus*' ta 0.06->16 mg/mL, *A. flavus*' ta 0.12->16 mg/mL; AMB için *A. fumigatus*' ta 0.25-16 mg/mL, *A. flavus*' ta 0.25->16 mg/mL; AND için *A. fumigatus* ve *A. flavus*' ta ≤0.008-0.03 mg/mL olarak bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise *A. fumigatus* için VOR, AMB MİK ve AND MEK aralıkları sırasıyla 0.125-1 µg/ml; 0.125-0.5 µg/ml; ≤0.0035 µg/ml; *A. flavus* için ise sırasıyla 0.125-0.5 µg/ml; 0.25-2 µg/ml; ≤0.0035 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

İnvaziv aspergilloziste tedavisinde ilk seçenek antifungal ilaç vorikonazoldür (158). Bu hasta grubunda tedavi konağın immün durumuna bağlı olmakla birlikte vorikonazol monoterapisinden fayda görmeyen hasta grubunda lipozomal amfoterisin B tedaviye eklenmekte ya da tek başına tercih edilmektedir. Ekinokandin grubundan kaspofungin standart tedaviye dirençli ya da azoller ve amfoterisin B' yi tolere edemeyen bireylerde tercih edilmektedir (159). İnvaziv aspergilloziste mortalite tedaviye rağmen %60- 90 arasında değişmektedir. Günümüzde yüksek mortalite nedeniyle başlangıç tedavisinde ya da kurtarma tedavisinde kombinasyon tedavileri tercih edilebilmektedir (160). Sınırlı sayıda antifungal olması ve tedavi başarısızlığının yüksek olması klinik izolatlara antifungal duyarlılık testi yapılmasını gerekli kılmaktadır. Çalışmamızda elde edilen MİK/MEK aralıkları epidemiyolojik eşik değerinin altında bulunmuştur. Bu durum hastanemizde izole edilen izolatların hali hazırda dirençli izolatlar olmadığını göstermekle birlikte erken tanı ve tedavi ile mortalitenin azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Farnesol, kanserli hücre serilerinde apoptozisi indükleyen ve çoğalmayı inhibe eden farnesil pirofosfatın defosforilasyonu ile üretilen izoprenoid türevi doğal bir bileşiktir (161). Mantarlarda extrasellüler quorum-sensing molekülü olarak rol oynar. Farnesol mayalarda miçelyum oluşumunu önlemesine rağmen *C. albicans* izolatlarında tomurcuklanmayı arttırdığı görülmüştür (162).

*A. nidulans* izolatlarında farnesolün hifal gelişim üzerine bir etkisinin olmadığı ancak apoptozisi indüklediği görülmüştür (163). Lorek ve ark. (164) *A. niger* izolatlarında farnesolün değişen miktarlarıyla (0.1 mM, 1 mM, 10 mM) oluşan morfolojik değişiklikleri incelemişlerdir. Düşük farnesol varlığında zayıf sporlanma gösteren *A. niger* izolatlarının, farnesol miktarı arttıkça sporlanmadıklarını saptamışlardır.

Wang ve ark. (165) da farnesolün yeni bir antifungal ajan olarak kullanılabileceğini düşünerek farklı konsantrasyonlarda farnesol ile *A. flavus* izolatlarını muamele etmiş ve transmission elektron mikroskop ile (TEM) hücre içi değişiklikleri incelemişlerdir ve aynı zamanda farnesolün apoptozis mekanizmalarında hangi yolları indüklediğini göstermeye çalışmışlardır. Farnesolün *A. flavus*'un çimlenmesini ve büyümesini önlediğini, ayrıca nükleer yoğunlaşma, DNA fragmentasyonu, hücre içi reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi ve metakaspaz aktivasyonunu içeren yollarla programlı hücre ölümünü indüklediğini ortaya koymuşlardır. *A. flavus*'ta farnesolün indüklediği programlı hücre ölümünün geniş spektrumlu kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk ve kısmen L-prolin tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bu da farnesolün *A. flavus*'ta metakaspaz aktivasyonunu içeren bir mekanizmayla apoptozisi indüklediğini ortaya koymuştur.

Farnesol ilk izole edilen QSM molekülü olmakla birlikte farnesolün keşfinden sonra başka QSM de tanımlanmıştır. Bunlar tirozol, feniletanol ve triptofoldür (168). Benzer şekilde tirozol de antifungal ajanlarla kombine edilmiş, *C. krusei* ve *C. tropicalis* biyofilmlerine karşı sinerjik etkisi gösterilmiştir (169). Tirozolün tek başına olgun biyofilme etkisi varken azollerle kombine edildiğinde biyofilim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (170).

Literatürdeki mevcut çalışmalarda farnesolün antimikrobiyal etkinliği ile ilgili ümit verici sonuçlardan yola çıkarak *Aspergillus* türlerine karşı da olumlu katkısı olabileceği düşünüldü. Farnesolün *Candida* izolatlarına karşı etkisi araştırmacılar tarafından yıllardır çalışılmış ve pek çok veri bilim dünyasına kazandırılmıştır. Ancak, farnesolün tek başına ya da antifungallerle kombine edilerek *Aspergillus* izolatlarına karşı etkinliğini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma klinik *Aspergillus* izolatları kullanılarak

sıvı mikrodilüsyon ve checkerboard yöntemiyle farnesolün etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışmamızda farnesolün VOR ile kombinasyonunda 18 (%58) *A. fumigatus* ve 10 (%71) *A. flavus* izolatında etkileşme gözlenmezken; 13 (%42) *A. fumigatus* ve 4 (%29) *A. flavus* izolatında antagonizma saptandı. AMB ile kombinasyonunda ise 24 (%77) *A. fumigatus* ve 10 (%71) *A. flavus* izolatında etkileşme gözlenmezken; 7 (%23) *A. fumigatus* ve 4 (%29) *A. flavus* izolatında antagonizma saptandı. Hiçbir kombinasyonda ve hiçbir izolata karşı sinerjik etkileşme gözlenmedi. AND ile çalışılan kombinasyon testlerinde izolatların tümü mikropakta çalışılan en düşük ilaç konsantrasyonundan ( $\leq 0.0035 \mu\text{g/mL}$ ) daha düşük MEK değerlerine sahip olduğundan FİK indeksleri hesaplanamadı ve etkileşme olup olmadığı değerlendirilemedi.

Cordeiro ve ark. (166) farnesolü antifungallerle kombine ederek *Candida* türlerine karşı etkinliğini araştırmışlardır. *C. albicans* (n=24), *C. parapsilosis* (n=16), *C. tropicalis* (n=5) izolatları çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmada AMB, FLU, ITR, CAS ve FAR için ayrı ayrı sıvı mikrodilüsyon çalışılıp antifungal dirençli izolatlar, farnesolün değişen konsantrasyonlarıyla inkübe edilip tekrar antifungal duyarlılık testine alınmış ve farnesolün tüm dirençli izolatlarda antifungal ilaçlara katkısının belirgin olduğu gösterilmiştir.

Cordeiro ve ark. (166) farnesolü antifungallerle kombine ettiklerinde, azol dirençli *Candida* izolatlarına karşı farnesolün belirgin katkısını gözledikleri halde, çalışmamızda benzer olumlu bir sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeninin *Aspergillus* izolatlarının kandidalardan farklı olan üreme doğasından ya da bahsedilen çalışmada farnesolün antifungallerle kombine olarak değil çalışma öncesi izolatların farnesole maruz bırakılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Katragkou ve ark. (167) *C. albicans* biyofilmine karşı farnesol ve antifungalleri kombine etmiş ve sinerjik etkiyi göstermiştir. Biyofilm kitlesi oluştuktan sonra antifungallerin bu biyokitleye etkisi azalmaktadır. Bu durum enfeksiyonun tedavisinde başarısızlıklara yol açmaktadır. Bu çalışmada FLU, AMB ve mikafungin farnesol ile kombine edilmiş ve *C. albicans* biyofilmine karşı etkinliği araştırılmıştır. Üç antifungal ajanın her biri ve farnesol arasında

anlamli sinerji saptanmif, hicbir kombinasyonda antagonizma saptanmamifftir. En belirgin sinerjik etki farnesol ve mikafungin kombinasyonunda bulunmuftur. FİK indeksine göre farnesol-mikafungin ve farnesol-flukonazol arasında sinerji saptanirken; farnesol-amfoterisin B arasında etkilefme gözlenmemiftir. Çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada da kandida ve kandida biyofilminin duyarlılığı çalışılmif olup mikafungin ile belirgin sinerji saptamiflardır. Bizim çalışmamızda ise farnesol ile ekinokandinlerden anidulafungin kombinasyonunun değerlendirilmesi amaçlanmif ancak çalışmaya alınan izolatların tümü dama tahtası mikroplaklarındaki belirlenen en düşük anidulafungin konsantrasyonundan daha düşük MEK' lere sahip olduğundan değerlendirilememiftir.

Sonuç olarak, çalışmamızda herhangi bir sinerjik etkilefme saptanmamif olmakla birlikte, farnesolün kombinasyondaki antifungallerin (vorikonazol, anidulafungin ve amfoterisin B) MİK/MEK değerlerine katkısının olmadığı hatta bazı izolatlarda MİK değerlerinde artışlara neden olduğu gözlenmiftir. Ancak, bu çalışma sınırlı sayıda izolatla ve sadece iki *Aspergillus* türüyle gerçekteştirilmif in vitro bir çalışmadır. Bu sonuçların kanıtlanması için ileri çalışmaların gerekliliği aşıkardır. Bununla birlikte, bu çalışma daha sonra gerçekteştirilebilecek benzer çalışmaların planlanmasında yol gösterici olabilir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya genelinde her yıl 200.000 olgu invaziv aspergilloz olarak tanımlanmaktadır (171). İnvaziv aspergilloz olgularının %50' si hala hematolojik maligniteli (AML, ALL...) ve allojenik kök hücre alıcılarından oluşmaktadır (172). İnvaziv aspergilloz için kemoterapinin sonucu olan uzamış ve derin nütropeni (10 günden uzun süren-  $\text{mm}^3$  'te 500' den az lökosit) tek başına risk faktörüdür (173,174).

Filamentöz mantarların neden olduğu enfeksiyonlarda tanı koymak oldukça güçtür. İnvaziv aspergilloz tanısı koyabilmek için klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik sonuçların tümü birlikte irdelenmelidir.

İnvaziv aspergillozun kesin tanısı için etkeni izole etmek ve kültürde üretmek antifungal duyarlılık testlerinin temelini oluşturmaktadır. Çalışmamızda laboratuvarımızda tanımlanan *Aspergillus* klinik izolatlarına antifungal duyarlılık testi uygulandı. Tedavide kısıtlı sayıda ajanın kullanılması ve toksik etkilerinin fazlalığı nedeniyle farnesol isimli doğal bileşikle kombine edildi. Kırk beş klinik izolata sıvı mikrodilüsyon testi ve üç antifungal (VOR, AMB ve AND) ile farnesolün kombinasyon testi çalışıldı. İzolatların hiçbirinde sinerji saptanmazken, *A. fumigatus* izolatlarının VOR- FAR kombinasyonunda on üç, AMB-FAR kombinasyonunda yedi izolatta antagonizma saptandı. *A. flavus* izolatlarının VOR-FAR kombinasyonunda dört, AMB-FAR kombinasyonunda yine dört izolatta antagonizma saptandı.

Bu çalışmada amacımız farnesolün antifungal katkısını araştırmak ve mevcut antifungallerin yan etkisini azaltabilecek bu doğal ürünün ilaç sektörüne kazandırılmasına katkıda bulunabilmektir. Ancak kandidalar ile yapılan çalışmaların aksine, *A. fumigatus* ve *A. flavus* izolatlarına karşı farnesolün bu çalışmada test edilen antifungallere (VOR, AMB) herhangi bir katkısı saptanamamış hatta antagonistik etkileşme sonuçları elde edilmiştir. Bu durum *Aspergillus* enfeksiyonlarının tedavisinde farnesolün antifungallere olumlu katkısı olabileceği öngörüsünü zayıflatmıştır. Bununla birlikte çalışmamız in vitro bir çalışma olup sınırlı sayıda *Aspergillus* türü içerdiğinden, daha fazla sayıda küf mantarını içeren in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

## KAYNAKLAR

1. Murray, PR, Rosenthal, KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Elsevier Health Sciences;2015.
2. Wingard JR, Hiemenz JW, Jantz MA. How I manage pulmonary nodular lesions and nodular infiltrates in patients with hematologic malignancies or undergoing hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;120:1791-1800.
3. Richardson MD. Aspergillus and Penicillium species. In Collier L, Balows A, Susman M (eds). Topley Wilson Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology. New York: Arnold. 1998;4:281-312.
4. Verweij PE, Brandt ME (çev: Kiraz N). Aspergillus, Fusarium ve diğer fırsatçı hiyalen mantarlar. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Phaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology (Klinik Mikrobiyoloji). Atlas Kitapçılık. 2009;1802-1838.
5. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, et al. Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer /Invasive. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-1821.
6. Moreno A, Perez-Elias M, Casado J, Navas E, Pintado V, et al. Role of antiretroviral therapy in long-term survival of patients with AIDS-related pulmonary aspergillosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000;19(9):688-693.
7. Mylonakis E, Paliou M, Sax PE, Skolnik PR, Baron MJ, Rich JD. Central nervous system aspergillosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Report of 6 cases and review. *Medicine*. 2000; 79(4): 269-280.

8. Metin DY. Aspergillus Taksonomisinde Yenilikler İçinde Ener B (Ed.) Aspergillus. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2006;56:25-29.
9. Sugui JA, Kuwon-Chung KJ, Juvvadi RR, Latge JP, Steinbach WJ. Aspergillus fumigatus and related species. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;6:5(2):a019786.
10. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 2009;22(3):447-465.
11. Procop GW, Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 5th Edition;2014.
12. Klich MA, Pitt J. A laboratory guide to common Aspergillus species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing;1988.
13. Onions AHS, Smith G, Allsopp D. Introduction to industrial mycology. Edward Arnold;1981.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997;253-320.
15. Medically important fungi a guide to identification. 5 th ed. 2011.p.38-40.
16. Verweij PE, Brandt ME (çev: Kiraz N). Aspergillus ,Fusarium ve diğer fırsatçı hiyalen mantarlar. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Phaller MA (eds).Manual of Clinical Microbiology (Klinik Mikrobiyoloji). Atlas Kitapçılık, 2009.p.1802-1838.
17. Hogan LH, Klein BS, Lewitz SM, Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev. 1996;(4):469-488
18. Warris A, Gaustad P, Meis JFGM, Voss A, Verweij PE, Abrahamsen TG. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone



- marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*. 2001;47(2):143-148.
19. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology e-book. Elsevier Health Sciences;2017.
  20. Sherif R, Segal BH, Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2010;16(3):242.
  21. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E. McGraw-Hill Education;2015.
  22. Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56:1205–1212.
  23. Kaur S, Singh S. Biofilm Formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*. 2014;52:2-9.
  24. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22(1):1-23.
  25. Hogan LH, Klein BS, Lewitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996;4:469-488.
  26. Li X, Gao M, Han X, Tao S, Zheng D, et al. Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. 2012;80(1):429-440.
  27. Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infection and Immunity*. 2004;72:3373–3382.
  28. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón, J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(1):1-23.

29. Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(11):1953-1963.
30. Ellis M, Richardson M, de Pauw B. *Epidemiology. Hosp Med*. 2000;61: 605–609
31. Warris A, Weemaes CM, Verweij PE. Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347(26): 2173-2174.
32. Madan T, Kaur S, Saxena S, Singh M, Kishore U, et al. Role of collectins in innate immunity against *aspergillosis*. *Medical Mycology*. 2005;43(Supplement\_1);155-163.
33. Richardson MD. *Aspergillus* and *Penicillium* species. In Collier L, Balows A, Susman M (eds). *Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections*, Vol 4 *Medical Mycology*. New York : Arnold. 1998;281-312.
34. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe, *Mycoses*. 2009;52(3):197-205.
35. Almyroudis NG, Segal BH. Prevention and treatment of invasive fungal diseases in neutropenic patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2009;22(4):385-393.
36. Fernández-Ruiz M, Silva JT, San-Juan R, de Dios B, García-Luján R, López-Medrano F, et al. *Aspergillus* tracheobronchitis: report of 8 cases and review of the literature. *Medicine*. 2012; 91(5):261-273.
37. McCarthy M, Rosengart A, Schuetz AN, Kontoyiannis D P, Walsh TJ. Mold infections of the central nervous system. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(2):150-160.
38. Koneman EW, Allen S. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiologico diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana. 2008.

39. Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2003;273-296,309-324.
40. Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly JP. Fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21.
41. Perfect J, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, De Repentigny L, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(11):1824-1833.
42. Garcia LS(Ed.). *Clinical microbiology procedures handbook (Vol. 1)*. 3 th ed. American Society for Microbiology Press; 2010.
43. Chandler FW, Watts JC. *Pathologic diagnosis of fungal infections*. American Society of Clinical Pathologists; 1987.
41. Perfect J, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, De Repentigny L, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(11):1824-1833.
44. Procop GW, Hayden RT, Roberts GD. Filamentous fungi. In: *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host*, Hayden RT, Carroll KC, Tang YW, Wolk DM (Eds), ASM Press, Washington DC; 2009.p.195.
45. Verweij PE, Brandt ME. *Aspergillus, Fusarium, and Other Opportunistic Moniliaceous Fungi*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9 th ed, Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgenesen JH, et al (Eds), 2 th ed(Vol 2). ASM Press, Washington DC; 2007.p.1802.
46. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, Ylikoski J. Panfungal PCR and multiplex liquid

- hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000;38(11):4186-4192.
47. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *The American journal of medicine*. 1996;100(2):171-178.
  48. Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Piskorska K, Gołasz M, Netsvyetayeva I, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. In *Respiratory Treatment and Prevention*. Springer, Cham. 2016; 27-33.
  49. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Ráčil Z, Richardson M, Rogers TR . Detection and investigation of invasive mould disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(suppl\_1):i15-i24.
  50. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(3):265-273.
  51. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50(8):1091-1100.
  52. St-Germain, G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook. Star Publishing Company;1996.
  53. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(10):3138-3141.

54. Pasqualotto AC. Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention. Berlin: Springer; 2010.
55. Larone DH. Medically Important Fungi. 5th ed. ASM Press; 2011.
56. Chen SCA, Sorrell TC, Meyer W (2015). Aspergillus and Penicillium. In Manual of Clinical Microbiology, 11 th ed. American Society of Microbiology; 2015.p.2030-2056.
57. Richardson MD, Hope W. Aspergillus. In: Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA(eds). Clinical Mycology: Churchill Livingstone Elsevier 2009:271-296.
58. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser S.A, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of Aspergillus species collected for the transplant-associated infection surveillance network. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(10):3138-3141.
59. Richardson MD, Hope W. Aspergillus. In : Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA(eds). Clinical Mycology: Churchill Livingstone Elsevier 2009:271-296
60. Birinci A, Tanrıverdi Çaycı Y. Mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı. Türk Hij Den Biyol Derg. 2016; 73(2):175-182.
61. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. British Journal of Haematology. 2004;126(6): 852-860.
62. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. Journal of Infectious Diseases. 2004;190(3): 641-649.. 2004;190(3): 641-649.

63. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(12): 1762-1769.
64. Duarte RF, Sánchez-Ortega I, Cuesta I, Arnan M, Patiño B, et al. Serum galactomannan–based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(12):1696-1702.
65. Cornely OA. Editorial Commentary: Galactomannan Testing During Mold-Active Prophylaxis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59(12):1703.
66. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4(6):349-357.
67. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(10):4744-4748.
68. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with  $\beta$ -lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(2):389-394.
69. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola A M, Ratto S, Bacigalupo A, Viscoli C. Piperacillin/tazobactam (Tazocin<sup>TM</sup>) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7):1746-1748.

70. Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, Estes L, Caliendo AM, Baden LR, et al. Reduction in false-positive *Aspergillus* serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 52(6):2199-2201.
71. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, Cuda F, Nigro CL, Musso M, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5362-5363.
72. Tortorano AM, Esposito MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C, Cascio GL. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(3):1051-1053.
73. Huang YT, Hung CC, Hsueh PR. *Aspergillus* galactomannan antigenemia in penicilliosis marneffeii. *Aids*. 2007;21(14):1990-1991.
74. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, et al. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol*. 2007;14(5): 638-640.
75. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;61(2):411-416.
76. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4(6):349-357.
77. Martín-Rabadán P, Gijón P, Alonso Fernández R, Ballesteros M, Anguita J, Bouza E. False-positive *Aspergillus* antigenemia due to

- blood product conditioning fluids. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(4):e22-e27.
78. Ramsay I, Gorton RL, Patel M, Workman S, Symes A, et al. Transmission of hepatitis B core antibody and galactomannan enzyme immunoassay positivity via immunoglobulin products: a comprehensive analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(1):57-63.
  79. Steinbach WJ, Addison RM, McLaughlin L, Gerrald Q, Martin PL, et al. Prospective Aspergillus galactomannan antigen testing in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007; 26(7):558-564.
  80. Us A.Dürdal, Temel İmmünoloji ve Seroloji Bölüm 9;2016.s.286-287.
  81. Clancy CJ, Jaber RA, Leather HL, Wingard JR, Staley B, et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiolog*. 2007;45(6):1759-1765.
  82. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Racil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation invasive mold disease. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 15-24.
  83. de Heer K, Gerritsen, MG, Visser CE, Leeflang MM. Galactomannan detection in broncho-alveolar lavage fluid for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;5.
  84. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(10):1467-1474.
  85. Mennink-Kersten M, Donnelly JP, Verweij P. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet*. 2004;4(6):349-57.



86. Kozel TH, Wickes B. Fungal Diagnostics. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014; doi: 10.1101/ cshperspect.a019299.
87. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, et al. Plasma (1--> 3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. Journal of Clinical Microbiology, 1995; 33(12):3115-3118.
88. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, et al. Use and limits of (1-3)- $\beta$ -d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology. 2014; 52(7):2328-2333.
89. Ener B. İnvazif fungal infeksiyonlarda tanısal yaklaşım. Ankem Derg. 2013; 27(Ek2): 141-143.
90. Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1, 3- $\beta$ -d-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. New England Journal of Medicine. 2006;354(26):2834-2835.
91. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij, PE. Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1, 3- $\beta$ -d-glucan assay reactivity. Clinical Infectious Diseases. 2008;46(12):1930-1931.
92. Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. Infectious Disease Clinics. 2006; 20(3):711-727.
93. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1 $\rightarrow$  3)- $\beta$ -d-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(1):299-305.
94. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. J Antimicrob Chemother. 2002; 49:11-14.

95. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013;51(5):1510-1516.
96. Prattes J, Flick H, Prüller F, Koidl C, Raggam RB, Palfner M, et al. Novel tests for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014;190(8):922-929.
97. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(6):2039-2045.
98. Koo S, Thomas HR, Daniels SD, Lynch RC, Fortier SM, Shea MM, Marty, FM. A breath fungal secondary metabolite signature to diagnose invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;59(12):1733-1740.
99. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(12):1762-1769.
100. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)- $\beta$ -d-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(6): 2733-2741.
101. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(10): 3731-3742.

102. Cruciani M, Mengoli C, Loeffler J, Donnelly P, Barnes R, Jones BL, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015;10.
103. Aydoğan S, Kuştimur S, Kalkancı A. İnvazif aspergilloz oluşturulan sıçanlarda glukan ve galaktomannan testleri ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(3):441-452.
104. Richardson MD, Hope W. *Aspergillus*. In: Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA (eds). *Clinical Mycology: Churchill Livingstone Elsevier* 2009:271-296.
105. [www.CLSI.org](http://www.CLSI.org)
106. [www.eucast.org](http://www.eucast.org)
107. Cornelia Lass-Floörl and Susanne Perkhofer; *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species, *mycoses*; 2008.
108. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):643-658.
109. Pfaller M, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 3361.
110. Meletiadis J, Mouton J, Meis J, Bouman B, Verweij PE. Comparison of the Etest and the Sensititre Colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2876–2885.
111. Pfaller M, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference

- microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3361.
112. Doluca Dereli M. Antifungal duyarlılık testlerinde yenilikler: CLSI Dökümanları. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Konuşma Özetleri ve Bildirileri Kitabı. 2014;44-45.
  113. Johnson EM, Cavling-Arendrup M. Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. İçinde Jorgensen JH, Pfaller MA (Ed.). ASM Press 11th ed. *Manual of Clinical Microbiology*;2015.p.2255-2281.
  114. Ghannoum MA, Kuhn DM. Voriconazole--better chances for patients with invasive mycoses. *European Journal of Medical Research.* 2002;7(5):242-256.
  115. Arıkan S, Rex J. Antifungal Agents. In: Murray PR (ed). *Manual of Clinical Microbiology.* Washington DC: American Society of Microbiology Press; 2007.p.1859-1869.
  116. Rex J, Stevens D. Systemic Antifungal Agents. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infection Disease.* Philadelphia:Churchill Livingstone. 2010;549-565.
  117. Abbott M, Hughes DL, Patel R, Kinghorn GR. Angio-oedema after fluconazole. *The Lancet.* 1991;338(8767):633.
  118. Winston DJ, Maziarz RT, Chandrasekar PH, Lazarus HM, Goldman M, Blumer JL, et al. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous and oral fluconazole for long-term antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients: a multicenter, randomized trial. *Annals of Internal Medicine.* 2003;138(9):705-713.
  119. Sharkey PK, Rinaldi MG, Dunn JF, Hardin TC, Fetchick RJ, Graybill JR. High-dose itraconazole in the treatment of severe mycoses.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991;35(4):707-713.
120. Boucher HW, Groll AH, Chiou CC, Walsh TJ. Newer systemic antifungal agents. *Drugs*. 2004;64(18):1997-2020
  121. Boyd AE, Modi S, Howard SJ, Moore CB, Keevil BG, Denning DW. Adverse reactions to voriconazole. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(8):1241-1244.
  122. Clark NM, Grim SA, Lynch III JP. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015 Oct;36(5):767-85. doi: 10.1055/s-0035-1562902. Epub 2015 Sep 23. Review
  123. Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(4):263-272.
  124. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 50(1):25-32.
  125. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates*. 2009;12:141-147.
  126. Balkovec JM, Hughes DL, Masurekar PS, Sable CA, Schwartz RE, Singh SB. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®)—A case study. *Natural Product Reports*. 2014;31(1):15-34.
  127. Denning D. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother*. 2002;6:889–891.
  128. Arikan S, Rex J. Antifungal Agents. In: Murray PR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: American Society of Microbiology Press. 2007:1859-1869.
  129. Rex J, Stevens D. Systemic Antifungal Agents. In Mandell GL,

- Bennet JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infection Disease. Philadelphia:Churchill Livingstone. 2010:549-565.
130. Mycamine- Micafungin Sodium Injection (Drug Approval Package). Illinois, USA: Fujisawa Healthcare, Inc., 2005, Eraxis - Anidulafungin injection (Drug Approval Package). Pennsylvania: Vicuron Pharmaceuticals Inc; 2006.
  131. Stone EA, Fung, HB, Kirschenbaum HL. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent, Clin Ther. 2002;24(3):351-377.
  132. Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1, 3- $\beta$ -d-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53(9):3690-3699.
  133. Howard S, Arendrup M. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. Med Mycol. 2010; 49 S90-S95.
  134. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2009.
  135. Medoff G. The mechanism of action of amphotericin. In *Aspergillus and Aspergillosis*. Springer, Boston, MA;1988.p.161-164.
  136. Aoun, M. Standard antifungal therapy in neutropenic patients. International journal of antimicrobial agents. 2000;16(2):143-145.
  137. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. New England Journal of Medicine. 2002;347(6): 408-415.
  138. Martinez R. An update on the use of antifungal agents. J Bras Pneumol. 2006;32(5):449-460.

139. Arikan-Akdağlı S. Azole resistance in *Aspergillus*: global status in Europe and Asia. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1272:9-14.
140. Stensvold CR, Jorgensen LN, Arendrup MC. Azole-resistant invasive aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6:178191.
141. Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28:261–289.
142. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994;176: 269–275.
143. Keller L, Surette GM. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews/ Microbiology*. 2006;4:249-258.
144. Hogan DA. Talking to Themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*. 2006;5:613–619.
145. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(7):2982-2992.
146. Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2001;98:4664–4668.
147. Hornby JM, Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48: 2305–2307.
148. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus

- Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67: 2982–2992.
149. Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol.* 2006;59:753–764.
  150. Rioja A, Pizzey AR, Marson CM, Thomas NSB. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS Letters.* 2000;467(2-3):291-295.
  151. Žnidarčič D, Markovič D, Vidrih R, Bohinc T, Trdan S. Which biophysical and biochemical factors may contribute to higher resistance of cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata*) to attack of the most important pests. *Acta Agriculturae Slovenica.* 2011;97(2):151-158.
  152. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005;49(2):512-517.
  153. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR . International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of Clinical Microbiology.* 2006;44(5):1782-1787.
  154. Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN, Castanheira M. Activity of a long-acting echinocandin, CD101, determined using CLSI and EUCAST reference methods, against *Candida* and *Aspergillus* spp., including echinocandin- and azole-resistant isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2016;71(10): 2868-2873.



155. Pfaller MA, Duncanson F, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. In vitro activity of a novel broad-spectrum antifungal, E1210, tested against *Aspergillus* spp. determined by CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(11):5155-5158.
156. Astvad KMT, Hare RK, Arendrup MC. Evaluation of the in vitro activity of isavuconazole and comparator voriconazole against 2635 contemporary clinical *Candida* and *Aspergillus* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(11):882-887.
157. Buil JB, Rijs AJMM, Meis JF, Birch M, Law D, Melchers WJG, Verweij PE. In vitro activity of the novel antifungal compound F901318 against difficult-to-treat *Aspergillus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(9):2548-2552.
158. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2015;162(2):81-89.
159. McCormack PL, Perry CM. Caspofungin. *Drugs*. 2005;65(14):2049-2068.
160. Panackal AA. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis revisited. *Medical Mycology: Open Access*. 2016;2(2).
161. Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Letters*. 2010; 287(2):123-135.
162. Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiology*. 2009;4(10):1353-1362.
163. Savoldi M, Malavazi I, Soriani FM, Capellaro JL, Kitamoto K, et al. Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial

- oxidoreductase. *Molecular Microbiology*. 2008;70(1):44-59.
164. Lorek J, Pöggeler S, Weide MR, Breves R, Bockmühl DP. Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Journal of basic microbiology*. 2008;48(2):99-103.
  165. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Wei X. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *Mycologia*. 2014;106(5): 881-888.
  166. Cordeiro RA, Teixeira CE, Brilhante RS, Castelo-Branco DS, Paiva MA, Giffoni Leite JJ, et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Medical mycology*. 2013;51(1):53-59.
  167. Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadiis J, Jabra-Rizk MA, Petraitis V., Roilides E., Walsh TJ. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;70(2):470-478.
  168. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi—a review. *Medical Mycology*. 2012;50(4):337-345.
  169. Shanmughapriya S, Sornakumari H, Lency A, Kavitha S, Natarajaseenivasan K. Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. *Medical Mycology*. 2014;52(8):853-861.
  170. Cordeiro RDA, Teixeira CE, Brilhante RS, Castelo-Branco DS, Alencar LP, et al. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Research*. 2015; 15(4), fov012.

171. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165rv13.
172. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Fanci R., et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91(8):1068–1075.
173. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2007;356(4):335–347.
174. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med*. 2007;356(4):348–359.

