

# **EUCAST EDef 7.2 SON DOKÜMAN, Gözden Geçirilmiş Haliyle**

## **Mayalar İçin Antifungal İlaçların Sıvı Dilüsyonla**

### **Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarını Belirleme Yöntemi**

**Yayın Tarihi:** Mart 2014

**Çeviri Tarihi:** Aralık 2014

*M. C. Arendrup<sup>1</sup>, M. Cuenca-Estrella<sup>2</sup>, C. Lass-Flörl<sup>3</sup>, W. Hope<sup>4</sup> and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)\**

\*EUCAST-AFST: MC Arendrup<sup>1</sup> (Chairman, Denmark), WW Hope<sup>4</sup> (Secretary), C Lass-Flörl<sup>3</sup> (Steering Committee, Austria), M Cuenca-Estrella<sup>2</sup> (Steering Committee, Spain), S Arıkan-Akdagli<sup>5</sup> (Turkey), F Barchiesi<sup>6</sup> (Italy), J Bille<sup>7</sup> (Switzerland), E Chryssanthou<sup>8</sup> (Sweden), P Gaustad<sup>9</sup> (Norway), A Groll<sup>10</sup> (Germany), P Hamal<sup>11</sup> (Czech Republic), H Järv<sup>12</sup> (Estonia), N Klimko<sup>13</sup> (Russia), K. Lagrou<sup>14</sup>, O. Lortholary<sup>15</sup> (France), CB Moore<sup>4</sup> (UK), A Velegraki<sup>16</sup> (Greece), P Verweij<sup>17</sup> (The Netherlands).

<sup>1</sup>Unit of Mycology, Dept Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark,

<sup>2</sup>Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain,

<sup>3</sup>Division of Hygiene and Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria,

<sup>4</sup>The University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, NIHR, Translational Research Facility in Respiratory Medicine, University Hospital of South Manchester NHS Foundation Trust, Manchester, UK

<sup>5</sup>Hacettepe University Medical School, Department of Medical Microbiology, Mycology Laboratory, Ankara, Turkey

<sup>6</sup>Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy,

<sup>7</sup>University Hospital, Lausanne, Switzerland,

<sup>8</sup>Dept Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden,

<sup>9</sup>Dept. Clinical Microbiology, Rikshospitalet, Oslo, Norway,

<sup>10</sup>Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and Department of Pediatric Hematology/Oncology, University Children's Hospital Muenster, Germany

<sup>11</sup>Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc & University Hospital Olomouc, Czech Republic

<sup>12</sup>Tartu University Hospital, Tartu, Estonia

<sup>13</sup>Dept. of Clinical Mycology, Nord-West Medical University 1/28 Santiago de Cuba str. Saint Petersburg, Russia

<sup>14</sup>Dept. of Medical Diagnostic Sciences, UZ Leuven, Leuven, Belgium

<sup>15</sup>Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques, Unité de Mycologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France,

<sup>16</sup>Mycology Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

<sup>17</sup>Radboud University Nijmegen Medical Centre & Nijmegen University Centre for Infectious Diseases, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands,

Corresponding author and reprint requests: M.C. Arendrup, Unit of Mycology building 43/117, Dept Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institute, Ørestads Boulevard 5, DK-2300 Copenhagen, Denmark. Email [maca@ssi.dk](mailto:maca@ssi.dk)

**Çeviri: Prof. Dr. Şinasi Taner Yıldırım (Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı)**

## GİRİŞ

Antifungal duyarlılık testleri; özellikle enfeksiyon ciddi seyirliyse, tedaviye inatçıysa, daha öncesinde antifungal ilaçlarla karşılaşmış bir hastada ortaya çıkmışsa ya da nadir gözlenen bir tür tarafından oluşturulmuşsa, bu hastalığa neden olan mantarlara uygulanır. Antifungal duyarlılık testi direnç gözetimi, epidemiyolojik çalışmalar, yeni ve mevcut ilaçların in vitro etkinliğini karşılaştırma açısından da önemlidir.

Antimikrobiyal ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK'ler) ortaya konmasında seyreltme (dilüsyon) yöntemleri kullanılır. Seyreltme yöntemleri antimikrobiyal duyarlılık testi için referans yöntemlerdir ve esas olarak yeni bir antifungal ilacın etkinliğini ortaya koymak, rutin testlerde çelişkili sonuçlar veren organizmaların duyarlılığını doğrulamak ve rutin testlerin güvenilir olmadığı durumda mantarların duyarlılığını saptamak için kullanılır. Sıvı kültür besiyeri ve antimikrobiyal ilaçların seri sulandırılmalarını içeren mikrodilüsyon plak kuyucuklarında mantarların üreme yeteneği araştırılır (sıvı besiyeriyle mikrodilüsyon). MİK, antifungal ilacın mantarın üremesini engelleyen (inhibe eden) en düşük konsantrasyonu (mg/L olarak) olarak tanımlanır. MİK organizmanın antifungal ilaca karşı duyarlılığı veya direncine ilişkin bilgi verir ve doğru tedavi kararlarının alınmasında yardımcı olabilir.

Bu dokümanda tanımlanan yöntem tıbbi önemi olan mayaların (esas olarak *Candida* ve *Cryptococcus* türleri) duyarlılığını test etmeyi amaçlamaktadır.

## KAPSAM

Burada tanımlanan standart yöntem, mayaların antifungal ilaçlara duyarlılığının MİK saptanarak araştırılması için geçerliliği onaylanmış bir yöntem sunmaktadır. MİK'ler söz konusu bir antifungal ilacın tanımlanmış test koşullarındaki etkinliğini gösterir ve farmakokinetikler, farmakodinamikler ve direnç mekanizmaları gibi diğer faktörler göz önüne alındıktan sonra hastaya yaklaşımla ilgili karar verme aşamasında kullanılabilirler. MİK aynı zamanda eğer klinik eşik değerler oluşturulmuşsa mantarların bir ilaca karşı "duyarlı" (S), "orta duyarlı" (I) ya da "dirençli" olarak bir kategoriye ayrılmasına olanak sağlar. Buna ek olarak, MİK dağılımları sokak türü (wild-type) veya sokak türü olmayan (non-wild-type) mantar popülasyonlarını tanımlamak ve böylece epidemiyolojik eşik değer üzerindeki MİK'lere sahip olan ve büyük olasılıkla direnç mekanizmalarını barındıran izolatları ortaya çıkarmak için kullanılabilir.

Bu yöntem esas olarak, mayaların antifungal ilaçlara karşı duyarlılığının ölçülmesinde kabul edilebilir bir uyumluluk düzeyi, yani belirlenmiş aralıklarda laboratuvarlar arası fikir birliği sağlamak için oluşturulmuştur. Yöntem uygulanması kolay, hızlı, ekonomik ve verilerin mikrodilüsyon plak okuyucuları tarafından doğrudan aktarımı, saklanması ve değiştirilmesine olanak sağlayacak biçimde okunmasına uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu yöntemin

ABD'deki Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)]'nin mayaların antifungal duyarlılığı hakkındaki M27 dokümanından [(1)] farklılıkları vardır. Bu farklılıklar besiyerinde daha yüksek bir glikoz konsantrasyonu (üremeyi daha iyi hale getirmek için), daha yüksek bir inokulum (türlerin çoğu için 24 saatten sonra okumayı sağlamak) ve görsel değerlendirmeden çok spektrofotometrik değerlendirmeye olanak sağlayan düz tabanlı kuyucuklara sahip plaklar önerilmiş olmasından kaynaklanır. Bu standardın ilk sürümü 2003 [(2)] yılında bir tartışma dokümanı (7.1), 2008'de [(3)] ise son doküman olarak yayınlandı. Şimdiki doküman ilk sürümün bir güncellemesidir ve kaspofungin, mikafungin ve flukonazolün çözücülerini, ekinokandinleri içeren plakların yarı ömrü, *Cryptococcus* türlerinin testi ve kalite kontrol kökenlerinde anidulafungin ile elde edilen referans MİK aralıkları konularına ilişkin yeni bilgiler içermektedir.

## **TERİMLER VE TANIMLAR**

### **Antifungal etkili madde**

Antifungal etkili bir madde mantarların üremesini engelleyen ya da onlara karşı öldürücü etki gösteren biyolojik, yarı sentetik veya sentetik kökenli bir maddedir. Dezenfektanlar, antiseptikler ve koruyucu maddeler bu tanım içinde yer almazlar.

### **Etki gücü (potens)**

Etki gücü, test edilen bir maddenin biyolojik olarak aktif fraksiyonudur ve aynı maddenin referans olarak alınan toz halindeki şekline karşı yapılan bir testle saptanır. Etki gücü gram başına miligram (mg/g) şeklinde kütle fraksiyonu olarak veya gram başına Uluslararası Ünite (IU) olarak ya da yüzde şeklinde hacim veya kütle fraksiyonu olarak veya test maddesindeki içeriklerin litresi başına mol şeklinde madde konsantrasyonunun miktarı (kütle fraksiyonu) olarak ifade edilir.

### **Konsantrasyon**

Konsantrasyon antimikrobiyal bir etkenin belirli bir sıvı hacmindeki miktarıdır. Konsantrasyon mg/L olarak SI üniteleri biçiminde ifade edilir. Bu bağlamda mg/L ifadesinin µg/mL ifadesine eşit olmasına karşın, son bahsedilen ifadenin kullanımı önerilmemektedir.

### **Stok solüsyonu**

Stok solüsyonu sonradan yapılacak seyreltmeler için kullanılan başlangıçtaki solüsyondur.

### **MİK**

MİK belirli bir zaman süresi içerisinde mantarların üremesini engelleyen en düşük antifungal konsantrasyonudur. MİK mg/L olarak ifade edilir.

### **Sınır değer ("breakpoint")**

Sınır değerler mantarların "duyarlı", "orta duyarlı" ve "dirençli" biçiminde kategorilere ayrılmasına olanak sağlayan özel MİK değerleridir. Sınır değerler koşullardaki değişimlere (örn., yaygın olarak kullanılan ilaç dozlarındaki değişimler) bağlı olarak değişebilir.

*Duyarlı (S).* Antifungal etkili bir maddeye ait bir konsantrasyonla *in vitro* olarak üremesi engellenen ve tedavi başarı şansının oldukça yüksek olduğu düşünölen bir mantar kökenidir. Belirlenmiş bir fenotipik test sistemindeki uygun sınır değerler uygulanarak mantarlar duyarlı olarak kategorize edilirler.

*Orta duyarlı (I).* Antifungal etkili bir maddeye ait bir konsantrasyonla *in vitro* olarak üremesi engellenen ve tedavi edici etkinliğin kuşku lu olduğu düşünölen bir mantar kökenidir. Belirlenmiş bir fenotipik test sistemindeki uygun sınır değerler uygulanarak mantarlar orta duyarlı olarak kategorize edilirler. Orta duyarlılık, izolat tarafından oluşturulan enfeksiyonun antifungal ilacın fizyolojik olarak yoğun bir biçimde bulunduğu vücut bölgelerinde veya ilacın yüksek bir dozunun kullanılabileceği durumlarda etkin bir şekilde tedavi edilebileceğini gösterir. Orta duyarlılık sınıflandırması aynı zamanda, değerlendirmeler sırasında ufak, kontrol edilemeyen teknik faktörlerin büyük tutarsızlıklar oluşturmasını önleyen bir "tampon bölge" görevi görür.

*Dirençli (R).* Antifungal etkili bir maddeye ait bir konsantrasyonla *in vitro* olarak üremesi engellenen ve tedavi başarısızlık oranının oldukça yüksek olduğu düşünölen bir mantar kökenidir. Belirlenmiş bir fenotipik test sistemindeki uygun sınır değerler uygulanarak mantarlar dirençli olarak kategorize edilirler.

### **Sokak tipi ("Wild type")**

"Sokak tipi" terimi ile antifungal etkili maddeye karşı kazanılmış direnç mekanizmaları bulunmayan bir izolattan bahsedilir.

### **Kontrol kökeni**

"Kontrol kökeni" terimi ile katalog içinde yer alan ve belirlenmiş antifungal duyarlılık fenotiplerini ve/veya genotiplerini kalıcı olarak sergileme özelliğine sahip bir kökenden bahsedilir. Bu tür kökenler sertifikalandırılmış Kültür Koleksiyonları'ndan temin edilebilir ve kalite kontrol için kullanılabilirler.

### **Sıvı besiyeriyle seyreltme**

Sıvı besiyeriyle seyreltme, antifungalın bir sıvı besiyerinde seri sulandırımalarının yapıldığı, standart bir sayıdaki organizmanın buraya ekiminin yapıldığı ve öngörölen bir süreyle inkübasyona bırakıldığı bir duyarlılık test tekniğidir. Bu yöntemin amacı MİK'in saptanmasıdır.

### **Mikrodilüsyon**

Sıvı besiyeriyle seyreltme uygulamasının, kuyucukları yaklaşık olarak 300 µL/kuyucuk nominal kapasiteye sahip mikrodilüsyon plaklarında yapılması "sıvı besiyeriyle mikrodilüsyon" olarak anılır.

### **Sıvı besiyeri ("broth")**

Mantarların in-vitro olarak üretilmeleri için kullanılan sıvı nitelikte besiyeridir.

## **İnokulum**

Maya mantarlarının belirli bir hacim içindeki koloni oluşturan birimlerinin (KOB) sayısıdır. İnokulum KOB/mL olarak ifade edilir.

## **TEST YÖNTEMLERİ**

Test mikrodilüsyon plaklarında uygulanır. Yöntem antifungal çalışma solüsyonlarının kuyucuk başına 100 µL (aynı zamanda inokulumun da 100 µL olacak şekilde ilave edilmesiyle) olacak şekilde hazırlanması esasına dayanır.

## **Besiyeri**

Tamamen sentetik bir besiyeri olan glutaminli RPMI-1640 besiyeri (Tablo 1) kullanılır ve son konsantrasyonda 20 g/L (%2) olacak şekilde glikoz ilavesi yapılır. Bikarbonat içermeyen bir pH indikatörü önerilir [(4-6)]. Zwitterion tamponları Tris ve fosfat tamponlara tercih edilir. Tris tamponları flusitozinin aktivitesini antagonize eder. Fosfat tamponlar ise antifungal etkenlerle umulmadık etkileşimler sergileyebilirler. Son konsantrasyonda 0,165 mol/L ve pH'sı 7,0 olacak şekilde 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (MOPS) tamponu kullanılması RPMI 1640 besiyeri için tatminkâr sonuç verir. Önerilen besiyeri olan %2 glikozlu RPMI (RPMI %2 G) aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanır:

1. Tablo 2'de listelenmiş olan içerikleri 900 mL hacmindeki distile suya ilave ediniz.
2. İçerikler tamamen çözününceye kadar karıştırınız.
3. Bir yandan karıştırmaya devam ederek pH'yı 1 M sodyum hidroksit ile 25°C'de 7,0'a ayarlayınız.
4. Son hacim 1 L olacak şekilde su ilave ediniz.
5. Filtreden geçiriniz (0,22 µm'lik bir filtre kullanınız).
6. Besiyerini 4°C'de saklayınız.
7. Kalite kontrol amacıyla; steril edilen besiyerinden bir miktar alarak sterilit kontroleri yapmak, pH'yı yeniden test etmek (6,9-7,1 kabul edilebilir değerlerdir) ve referans bir kökenle üreme kontrolü yapmak için kullanınız.

## **Amfoterisin B'yi test etme besiyeri**

Şimdilik, RPMI %2 G besiyerinin aynı zamanda amfoterisin B için de kullanılması önerilmektedir. Sentetik olmayan ve son konsantrasyonda %2'lik glikoz katılmış sıvı bir besiyeri olan Antibiotic Medium 3 (AM3)'ün amfoterisin B direncini saptamaya yönelik değerlendirmeleri süregelmektedir [(7-10)]. Ancak bu besiyeriyile ilgili olarak üretimden kaynaklanan farklılıkların yanı sıra farklı üreticilere ait besiyerlerinde performans farklılıkları da bulunmaktadır. Elde edilen ilk sonuçlar, 0,5-2,5 x 10<sup>5</sup> kob/mL'lik bir inokulumun amfoterisin B'nin AM3 içinde test edilmesi için çok yüksek olduğunu da göstermektedir.

## **ANTİFUNGAL ETKİLİ MADDELER**

Tüm antifungal ilaç solüsyonları İyi Üretim Uygulamalarına (Good Manufacturing Practice) uygun bir biçimde hazırlanmış olmalıdır. Antifungal tozlar direkt olarak ilaç üreticisinden veya güvenilir ticari kaynaklardan temin edilmelidir. Klinik kullanım için üretilmiş ilaçlar, duyarlılık testini olumsuz yönde etkileyecek yardımcı maddeleri sıkça içerdiklerinden kullanılmamalıdır. Tozlar ilacın jenerik ismi, üretim parti ("lot") numarası, etki gücü, son kullanma tarihi ve önerilen saklama koşullarıyla birlikte temin edilmelidir. Üreticiler tarafından başka bir şekilde önerilmediyse tozları ağız kapalı kaplarda -20°C veya daha düşük derecelerde saklayınız. İdeal olarak tozlar belirli miktarlara bölünmeli, içlerine nem çekici maddeler yerleştirilmeli ve her seferinde birisi kullanılmalıdır. Kapların açılmadan önce toz üzerinde su yoğunlaşmasını engellemek için oda ısısına kadar ısınmaları beklenmelidir.

### **Stok solüsyonların hazırlanması**

Antifungal ilaç solüsyonları antifungal ilaç tozunun üretim parti numarasına ait etki gücü göz önüne alınarak hazırlanmalıdır. Standart bir solüsyon hazırlamak için gerekli olan toz veya sulandırıcı miktarı aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$\text{Ağırlık (g)} = \frac{\text{Hacim (L)} \times \text{Konsantrasyon}}{\text{Etki gücü}} \\ \text{(mg/L)} \quad \text{(mg/g)}$$

$$\text{Hacim (L)} = \frac{\text{Ağırlık (g)} \times \text{Etki gücü (mg/g)}}{\text{Konsantrasyon}} \\ \text{(mg/L)}$$

Antifungal ilaç tozunu 100 mg olarak tartarken, virgülden sonraki iki basamağı gösterecek şekilde ayarlanmış bir analitik terazi kullanınız. Tozdan en az 25 mg tartılması önerilmektedir. Antifungal bileşiklerin çözünürlüğü ile ilgili bilgi de tedarikçi tarafından sağlanmalıdır. Bazı antifungal ilaçları çözdürmek için su dışındaki çözücülere gereksinim vardır (Tablo 3). Stok solüsyonların sterilizasyonuna normalde gerek yoktur, fakat gerekiyorsa membran filtrasyonu kullanılmalıdır. Önemli miktarda ilacı yüzeylerine çektiklerinden diğer filtre materyallerinden kaçınılması iyi olur. Filtrasyon kullanıldığı zaman, filtrasyon öncesi ve sonrasına ait örnekler alınmalı ve ilacın filtre yüzeyine çekilmediğinden emin olmak için bu örneklerden test yapılmalıdır. İlaç üreticisi tarafından aksi belirtilmediği sürece, ilaç solüsyonlarını steril polipropilen veya polietilen viyalere küçük hacimler şeklinde koyarak -70°C ya da daha düşük ısıda saklayınız. İlaçlar -70°C'de önemli bir aktivite kaybına uğramaksızın en az altı ay süreyle saklanabilirler [(11;12)]. Viyalleri -70°C'den çıkarınız ve çözündükleri aynı gün içerisinde kullanınız. O gün kullanılmayan herhangi bir ilacı atınız. Kalite kontrol kökenlerinin duyarlılık

test sonuçlarında, antifungal etkili bir maddedeki önemli düzeyde bozulma kendini gösterecektir (Tablo 6). Gerekirse ilaç etki gücünün saptanması amacıyla teste tutulabilir.

### **Çalışma solüsyonlarının hazırlanması**

Test edilecek konsantrasyonların aralığı organizmaya ve test edilecek antifungal ilaca bağlı olacaktır. Konsantrasyonların aralığı, eğer varsa sınır değerini ve bunun yanı sıra kalite kontrol kökenleri için beklenen sonuçları da kapsamalıdır. Tablo 3'deki ilaç konsantrasyon aralıkları önerilmektedir. İki katlık sulandırım serileri 1 mg/L baz alınarak iki kat güçlü konsantrasyondaki RPMI %2 G içinde hazırlanır. Plaklarda kullanılan RPMI %2 G besiyeri son konsantrasyonda olması gerekenden iki kat fazla güçte hazırlanır ve bu durum, distile su içinde hazırlanan inokülumun ilave edilmesinden sonra %50'lik bir seyrelmeye olanak tanır.

Sulandırım ISO'nun önerileri doğrultusunda hazırlanmalıdır [(13)]. Referans yöntem kadar performans sergilediği gösterilmiş ise alternatif sulandırım şemaları kullanılabilir [(14)]. Örneğin, son konsantrasyonu 0,125-64 mg/L olacak şekilde bir sulandırım serisi hazırlamak için daha küçük hacimler kullanan alternatif bir şema Tablo 4'te gösterilmiştir (her bir antifungal etkili madde için gerekli olan çözücülerini kontrol etmek için Tablo 3'e bakınız). Bu alternatif şemada çalışma solüsyonları hazırlamak için gerekli olan basamakların özeti aşağıdaki gibidir:

1. Antifungal ilaca ait bir stok tüpünü -70°C'lik dondurucudan çıkarınız.
2. Çözücüden (çözücüler için Tablo 3'e, çözücülerin hacmi için Tablo 4'e başvurunuz) uygun hacimler alarak sonraki dokuz tüpe dağıtınız.
3. Son konsantrasyonun 200 katı olacak biçimde sulandırım serileri hazırlamak için Tablo 4'te anlatılan basamakları takip ediniz. Sulandırım serilerini 0,03-16 mg/L ve 0,015-8 mg/L olarak hazırlamak için sırasıyla Tablo 4'ün birinci basamağındaki 3200 mg/L veya 1600 mg/L'lik bir stok konsantrasyonla yapılan benzer sulandırım serilerine ihtiyaç vardır.
4. İki kat güçlü RPMI %2 G besiyerinden on tüpe 9,9 ml dağıtınız.
5. Çözücüsü içinde 200x'lik son konsantrasyonda bulunan antifungal ilaç tüplerinin her birinden 100 µl alınız ve içlerinde kültür besiyerinden 9,9 mL bulunan on tüpe aktarınız (1:100 sulandırım). Kültür besiyeri tüplerindeki çözücünün konsantrasyonu %1 ve antifungal etkili maddelerin konsantrasyonu son konsantrasyonun iki katıdır (2x).

### **Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması**

Steril plastikten üretilmiş, tek kullanımlık, düz tabanlı kuyucukları olan ve yaklaşık olarak 300 µl'lik nominal bir kapasiteye sahip 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakları kullanınız. Mikrodilüsyon plağının her bir sütunundaki 1'den 10'a kadar olan kuyucuklara, antifungal etkili maddenin karşılık gelen konsantrasyonunu (son konsantrasyonun 2 katı) içeren her bir tüpten 100 µl dağıtınız. Örneğin, itrakonazol, vorikonazol veya posakonazol ile çalışırken 1. sütuna ilaçtan 16 mg/L içeren besiyerinden, 2. sütuna 8 mg/L içeren besiyerinden ve böyle devam ederek sonrasında da 10. sütuna 0,03 mg/L içeren besiyerinden dağıtınız. Buradaki 11 ve 12. sütun kuyucuklarının her birine iki kat güçte hazırlanmış RPMI %2 G besiyerinden 100 µl dağıtınız. Böylece, 1'den 10'a kadar olan sütunlardaki her bir kuyucuk, antifungal ilacın son



konsantrasyonlarının iki katını, iki kat güçte hazırlanmış RPMI %2 G besiyeri içinde ve %1'lik çözücüsüyle içermiş olacaktır.

### **Mikrodilüsyon plaklarının saklanması**

Plaklar plastik torbalara veya alüminyum folyoya sarılabilir ve -70°C ya da altında 6 aya kadar veya -20°C'de 1 aydan fazla olmamak koşuluyla ilacın etki gücünde kayıp olmaksızın dondurulmuş olarak saklanabilir [(12)]. Plaklar bir kez buzdan çözdürüldükten sonra yeniden dondurulmamalıdır.

### **İNOKÜLUMUN HAZIRLANMASI**

İnokülumun standart olması antifungal duyarlılık testlerinin doğru ve tekrarlanabilir olması açısından bir gerekliliktir. Besleyici agar besiyerinde 18-24 saatlik bir kültürden alınan beş tipik koloninin distile su içerisinde süspansiyonu yapılarak inokülum hazırlanmalıdır. Son inokülum  $0,5 \times 10^5$  ve  $2,5 \times 10^5$  KOB/mL arasında olmalıdır.

### **Koloni süspansiyon yöntemi**

1. Testten önce seçici olmayan besleyici agar besiyeri (Sabouraud dekstroz agar veya patatesli dekstroz agar) ve ortam havası kullanarak tüm mayaların  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 18-48 saat süreyle kültürünü yapınız.
2. İnokülum hazırlamak için 24 saatlik kültürlerden çapı  $\geq 1$  mm olan beş ayrı koloni alınız ve en az 3 mL steril distile suda süspansiyonunu yapınız.
3. İnokülümü bir vorteks karıştırıcıda 15 saniye süreyle güçlü bir şekilde karıştırarak süspansiyonun eşit bir şekilde dağılmasını sağlayınız. Hücre yoğunluğunu 530 nm dalga boyundaki bir spektrometrede absorbanı ölçerek ve gerektiğinde steril distile su ilave ederek 0,5 McFarland bulanıklık standardına (Tablo 5) ayarlayınız. Bunun sonucunda  $1-5 \times 10^6$  KOB/mL'lik bir maya süspansiyonu elde edilmiş olacaktır. Bu standart süspansiyonun steril distile suda  $1-5 \times 10^5$  KOB/mL olacak şekilde 1/10'luk bir sulandırımını yaparak bir çalışma süspansiyonu hazırlayınız.

### ***Cryptococcus* türleri**

*Cryptococcus* türleri fermentasyon oluşturmeyen mayalardır. Fermentasyonun olmaması hem CLSI hem de EUCAST tarafından tanımlanan protokollere göre hazırlanan mikrodilüsyon plaklarındaki üremeyi riske sokar. Son zamanlarda yapılan kapsamlı bir çalışmayla, *Candida* türleri için olan standart yöntemle kıyasla EUCAST duyarlılık test yöntemindeki değişikliklerin etkileri araştırılmıştır [(15)]. Yapılan değişiklikler şunları içermektedir; 1) üreme besiyeri (RPMI besiyerine karşın yeast nitrogen base [YNB]), 2) glikoz konsantrasyonu (%0,2'ye karşın %2), 3) nitrojen kaynağı (amonyum sülfat), 4) ısı ( $30^\circ\text{C}$ 'ye karşın  $35^\circ\text{C}$ ), 5) çalkalama ve 6) inokülum büyüklüğü ( $10^3$ ,  $10^4$  ve  $10^5$  hücre). Üreme oranları ve MİK'ler karşılaştırılmıştır. YNB besiyerinin kullanılması, inkübasyon ısısının  $30^\circ\text{C}$ 'ye düşürülmesi ve inkübasyon süresince plakların çalkalanmasının tümünün üreme oranını arttırmasına rağmen, farklı yöntemlerle elde edilen MİK'ler arasında anlamlı farklılıklar olmamıştır. MİK değerleri arasındaki uyum değerlendirilirken, iki katlık iki sulandırmadan daha az farklılık gösteren MİK değerlerinin anlamlı şekilde farklı olmadığı kabul edilmiştir. Bu nedenle hali hazırda EUCAST

yönteminin *Cryptococcus* türlerinin test edilmesi için kabul görmesi ve OD değerinin 0,2'nin üzerinde olduğu zaman plakların okunması önerilmiş durumdadır. Üremenin yetersiz olduğu durumlarda testin tekrarlanması, fakat plakların 30°C'de inkübasyona alınması önerilmektedir.

## **MİKRODİLÜSYON PLAKLARININ İNOKÜLASYONU**

İnokulum süspansiyonu içindeki canlı hücre konsantrasyonunu sürdürebilmek için, inokulum hazırlandıktan sonra 30 dakika içinde mikrodilüsyon plaklarına inokülasyon yapılmalıdır.

Bir mikrodilüsyon plağının her bir kuyucuğuna,  $1-5 \times 10^5$  KOB/mL'lik maya süspansiyonundan 100 µl alarak inokülasyon yapınız. Bu işlem gerekli olan son ilaç konsantrasyonunu ve inokulum yoğunluğunu (son inokulum =  $0,5-2,5 \times 10^5$  KOB/mL) verecektir. Aynı zamanda, ilaç içermeyen ve steril besiyerinden 100 µl içeren üreme kontrol kuyucuklarına da aynı inokulum süspansiyonundan 100 µl alarak inokülasyon yapınız. Mikrodilüsyon plağının 12. sütununu, inokulum hazırlarken kullanılan distile suyun ait olduğu partiden 100 µl alarak doldurunuz ve bunu besiyeri ve distile su (sadece ilaçsız besiyeri) için sterilite kontrol amacıyla kullanınız. Kalite kontrol kökenlerini her seferinde aynen bir izolatın test edildiği gibi aynı yöntemle test ediniz.

## **MİKRODİLÜSYON PLAKLARININ İNKÜBASYONU**

Mikrodilüsyon plaklarını  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'deki ortam havasında çalkalamadan  $24 \pm 2$  saat süreyle inkübasyona bırakınız. Bir absorbands değerinin  $\leq 0,2$  olması zayıf üremeyi gösterir ve en sık *Candida parapsilosis* ve *Candida guilliermondii* kökenleri arasında görülür. Bu şekildeki plaklar bir 12-24 saat daha yeniden inkübasyona tutulmalı ve sonrasında yeniden okunmalıdır. Kırk sekiz saat sonrasında 0,2'lik bir absorbandsa ulaşılamaması testi geçersiz kılar. Yukarıda bahsedildiği gibi, *Cryptococcus* türleri için 48 saat sonrasında absorbandsın  $\leq 0,2$  olması, testin  $30^\circ\text{C}$ 'lik inkübasyon kullanılarak tekrarlanmasına yöneltilmelidir [(15)].

## **SONUÇLARI OKUMA**

Mikrodilüsyon plakları bir mikrodilüsyon plak okuyucusu ile okunmalıdır. Plağın absorbandsını ölçmek için 405 nm veya 450 nm gibi diğer dalga boyları da kullanılabilirse de, önerilen dalga boyu 530 nm'dir. Kör (zemin) okuma değeri, geri kalan diğer kuyucukların okuma değerlerinden çıkarılmalıdır.

### **Amfoterisin B**

Amfoterisin B'nin MİK değeri, ilaç içermeyen kontrolünkine göre üremede  $\geq 90\%$  inhibisyona yol açan en düşük konsantrasyondur.

### **Flusitozin, azol grubu etkin maddeler ve ekinokandinler**

Flusitozin (5-flusitozin), azol grubu antifungal ilaçlar ve ekinokandinlerin MİK değeri, ilaç içermeyen kontrolünkine göre üremede  $\geq 50\%$  inhibisyona yol açan en düşük ilaç konsantrasyonudur.

## **SONUÇLARIN YORUMLANMASI**

EUCAST amfoterisin B, anidulafungin, flukonazol, posakonazol, vorikonazol ve *Candida* türleri için sınır değerler önermiş durumdadır (<http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>).

## **KALİTE KONTROL**

Kontrol yöntemleri sonuçların kalitesinin güvence altına alındığı yaklaşımlardır ve CLSI tarafından detaylı bir şekilde tanımlanmıştır [(1)]. Test sonuçlarının rutin olarak kalitesi kontrol kökenlerinin kullanılmasıyla takip edilir.

### **Kontrol kökenleri**

İdeal olarak kontrol kökenlerinin MİK'leri, test edilen iki katlık seri aralığının ortasına yakın olmalı ve antifungal ilaç duyarlılık tarzları kararlılık göstermelidir. Önerilen kontrol kökenleri Tablo 6'da gösterilmiş ve bu kriterlere göre seçilmiştir [(16;17)]. Son zamanlarda yapılan bir çalışma göstermiştir ki, en sık kullanılan iki kontrol kökeni olan *C. parapsilosis* ATCC22019 ve *C. krusei* ATCC6258 kaspofunginin etki gücündeki değişimi saptamada yeterince duyarlı değildir ve bu amaç için *C. albicans* ATCC64548 veya *C. albicans* 64550 daha üstündür [(12)]. Kontrol kökenleri American Type Culture Collection (ATCC), National Collection for Pathogenic Fungi (NCPF) ve Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) gibi güvenilir bir kaynaktan ya da benzer kalite güvencelerini sunan ticari tedarikçilerden temin edilmelidir.

### **Kontrol kökenlerinin saklanması**

Mayalar liyofilize bir halde ya da  $-60^{\circ}\text{C}$  veya altında dondurulmuş olarak saklanabilirler [(18)]. Kültürler kısa süreliğine Sabouraud dekstroz agar veya patatesli dekstroz agar içeren yatık besiyerlerinde  $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklanabilirler. Yeni kültürler dondurulmuş stoklardan iki haftada bir hazırlanıyor olmalıdır.

### **Genel öneriler ve kontrol kökenlerinin rutin kullanımı**

Kontrol kökenlerinin rutin kullanımı için, besleyici agar besiyerine (örn., Sabouraud dekstroz agar veya patatesli dekstroz agar) yatık agarlardan ya da dondurulmuş veya liyofilize kültürlerden taze kültürler hazırlanmalıdır.

1. Testin yapılacağı her bir günde teste en az iki kontrol kökeni dahil edilmeli ve MİK'ler Tablo 6'da verilen kontrol aralıklarının içerisinde olmalıdır. Eğer yapılan 20 testte, belirlenen aralığın dışında bulunanların sayısı birden fazlaysa hatanın kaynağı araştırılmalıdır.

2. Test edilen organizmanın üremesini göstermek ve sınır değerlerin okunmasında bulanıklık kontrolü görevi görmesi için her bir teste antifungal içermeyen bir besiyeri kuyucuğu dahil edilmelidir.
3. Saflığından emin olmak ve testin tekrarı gerekirse taze koloniler elde bulundurmak için inokülumlardan uygun bir agar besiyerine (tercihen kromojenik bir besiyeri) pasaj yapınız.
4. Besiyerinin, mikrodilüsyon plaklarının ve RPMI %2 G besiyerinin her bir yeni partisini Tablo 6'da listelenen kalite kontrol kökenlerinden en az ikisiyle test ediniz ve MİK'lerin beklenen aralıkta olduğundan emin olunuz.

### **KAYNAKLAR**

- (1) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document M27-A3[28]. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.
- (2) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9(8):i-viii.
- (3) Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(4):398-405.
- (4) Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993 Jan;37(1):39-45.
- (5) Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 Sep;34(9):1648-54.
- (6) Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 Jan;38(1):45-8.
- (7) Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Jul;45(7):2070-4.
- (8) Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1997 Jan;35(1):270-2.
- (9) Rex JH, Cooper CR, Jr., Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Apr;39(4):906-9.
- (10) Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National

Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Nov;39(11):2520-2.

- (11) Anhalt JP, Washington JA. Preparation and storage of antimicrobials. In: Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy H, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 1199-200.
- (12) Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. using the EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: Analysis of the influence of Bovine Serum Albumin Supplementation, Storage Time and Drug Lots. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 Jan 18;55(4):1580-7.
- (13) Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - part 1: reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: ISO; 2006.
- (14) Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Lass-Floerl C, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Multicenter Comparison of the ISO Standard 20776-1 and the Serial 2-Fold Dilution Procedures to Dilute Hydrophilic and Hydrophobic Antifungal Agents for Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol* 2010 Mar 10.
- (15) Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gomez-Lopez A, Bernal-Martinez L, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Nonfermentative Yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011 Apr 1;55(4):1563-70.
- (16) Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006 Mar;44(3):819-26.
- (17) Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995 May;33(5):1104-7.
- (18) Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmstrom A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards--recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996 Apr;34(4):816-7.

**Tablo 1.** RPMI 1640 besiyerinin bileşimi

<b>İçerik</b>	<b>g/L</b>
L-arginin (serbest baz)	0,200
L-aspargin (susuz)	0,050
L-aspartik asit	0,020
L-sistin 2HCl	0,0652
L-glutamik asit	0,020
L-glutamin	0,300
Glisin	0,010
L-histidin (serbest baz)	0,015
L-hidroksiprolin	0,020
L-izolösin	0,050
L-lösin	0,050
L-lizin HCl	0,040
L-metiyonin	0,015
L-fenilalanin	0,015
L-prolin	0,020
L-serin	0,030
L-treonin	0,020
L-triptofan	0,005
L-tirozin 2Na	0,02883
L-valin	0,020
Biyotin	0,0002
D-pantotenik asit	0,00025
Kolin klorür	0,003
Folik asit	0,001
Miyo-inositol	0,035
Niasinamid	0,001
PABA	0,001
Pridoksin HCl	0,001
Riboflavin	0,0002
Tiamin HCl	0,001
Vitamin B12	0,000005
Kalsiyum nitrat H2O	0,100
Potasyum klorür	0,400
Magnezyum sülfat (susuz)	0,04884
Sodyum klorür	6,000
Sodyum fosfat, çift bazlı (susuz)	0,800
D-glikoz <sup>a</sup>	2,000
Glutatyon, indirgenmiş	0,001
Fenol kırmızısı, Na	0,0053

<sup>a</sup>Bu besiyerinin %2 glikoz içerdiğine dikkat ediniz.

**Tablo 2.** RPMI %2 G besiyerinin içerikleri

<b>İçerik</b>	<b>1 x konsantrasyon</b>	<b>2 x konsantrasyon</b>
Distile su	900 mL	900 mL
RPMI 1640 (Tablo 1)	10,4 g	20,8 g
MOPS	34,53 g	69,06 g
Glikoz	18 g	36 g

**Tablo 3.** Antifungal etkili maddelerin stok solüsyonlarının hazırlanması için gerekli çözücüler, antifungal maddelerin özellikleri ve uygun konsantrasyon aralıkları

<b>Antifungal madde</b>	<b>Çözücü</b>	<b>Özellikler</b>	<b>Test aralığı (mg/L)</b>
Amfoterisin B	DMSO <sup>a</sup>	Hidrofobik	0,03 - 16
Flukonazol	DMSO/Su <sup>b</sup>	Hidrofilik/hidrofobik	0,12 - 64
İtrakonazol	DMSO	Hidrofobik	0,016 - 8
Vorikonazol	DMSO	Hidrofobik	0,016 – 8
Posakonazol	DMSO	Hidrofobik	0,016 – 8
Flusitozin	Su	Hidrofilik	0,12 – 64
Kaspofungin	DMSO	Hidrofobik	0,016 – 8
Mikafungin	DMSO	Hidrofobik	0,016 – 8
Anidulafungin	DMSO	Hidrofobik	0,016 - 8

<sup>a</sup>DMSO, Dimetil sülfoksit

<sup>b</sup>Üreticilerin talimatlarına göre. Pfizer tarafından verilen orijinal saf madde suda kolayca çözünebilir durumdaydı. Ancak, Sigma-Aldrich'ten satın alınan toz oldukça hidrofobiktir, suda oldukça zayıf bir biçimde çözünmektedir ve bu nedenle üreticinin önerisi doğrultusunda DMSO içerisinde çözdürülmelidir ([http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8929|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8929|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)).



**Tablo 4.** Son konsantrasyonu 0,12-64 mg/L olan antifungal dilüsyon serileri hazırlama şeması

Basamak	Konsantrasyon (mg/L)	Kaynak	Antifungalın hacmi (µL)	Çözücünün <sup>a</sup> hacmi (µL)	Ara konsantrasyon	İki kat güçteki RPMI %2 G ile 1:100 sulandırım sonrası konsantrasyon (mg/L) <sup>b</sup>
1	12 800 <sup>c</sup>	Stok	200	0	12 800	128
2	12 800	Stok	100	100	6 400	64
3	12 800	Stok	50	150	3 200	32
4	12 800	Stok	50	350	1 600	16
5	1600	Basamak 4	100	100	800	8
6	1600	Basamak 4	50	150	400	4
7	1600	Basamak 4	50	350	200	2
8	200	Basamak 7	100	100	100	1
9	200	Basamak 7	50	150	50	0,5
10	200	Basamak 7	25	175	25	0,25

<sup>a</sup>Antifungallerin sulandırılmalarını yapmak için gereken çözücüler için Tablo 3'e başvurunuz.

<sup>b</sup>İnokulum süspansiyonu ile 1:1 seyreltme yapılması sonucunda gösterilen konsantrasyonların yarısı olan son konsantrasyonlar oluşur.

<sup>c</sup>En yüksek son konsantrasyonları 16 mg/L veya 8 mg/L olan sulandırım serileri için sırasıyla 3200 mg/L ve 1600 mg/L'lik stok konsantrasyonlar ile başlayınız.

**Tablo 5.** McFarland 0,5 bulanıklık standardının hazırlanması

Basamak	Yöntem
1	BaCl <sub>2</sub> 'nin 0,048 mol/L (%1,175 ağırlık/hacim BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O) olacak şekilde hazırlanmış çözeltilisinden 0,5 mL alarak, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 'ün 0,18 mol/L (0,36 N) (%1 hacim/hacim) olarak hazırlanmış çözeltilisinin 99,5 mL'sine ekleyiniz ve iyice karıştırınız.
2	Yoğunluğunu 1 cm'lik bir ışık yolu ve uygun küveti olan bir spektrometre ile kontrol ediniz. Ölçülecek 530 nm'deki absorbans 0,12 ila 0,15 olmalıdır.
3	Test inokulumu ayarlaması için kullanılan aynı ölçülerdeki burgu kapaklı tüplere dağıtınız.
4	Ağız kapatılmış standartları oda ısısında ve karanlıkta saklayınız.
5	Standardı kullanmadan hemen önce bir vorteks karıştırıcıyla iyice karıştırınız.
6	Üç aylık saklamadan sonra standartları yenileyiniz ya da absorbansını kontrol ediniz.

**Tablo 6.** Antifungal etkili maddelerin kalite kontrol kökenleri için kabul edilebilir MİK aralıkları (mg/L)

<b>Antifungal madde</b>	<b><i>Candida krusei</i> ATCC<sup>1</sup> 6258</b>	<b><i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019</b>	<b><i>Candida albicans</i> CL-CNM<sup>2</sup> 8555</b>	<b><i>Candida krusei</i> CL-CNM CL3403</b>
Amfoterisin B	0,12–1,0	0,12–1,0	0,06–0,5	0,25–1,0
Flusitozin	1,0–4,0	0,12–0,5	0,06–0,25	2,0–8,0
Flukonazol	16,0–64,0	0,5–2,0	32,0–128,0	16,0–64,0
İtrakonazol	0,03–0,12	0,03–0,12	0,25–1,0	0,12–0,5
Vorikonazol	0,03–0,25	0,015–0,06	0,5–0,20	0,12–0,5
Posakonazol	0,015–0,06	0,015–0,06	0,12–0,5	0,06–0,25
Kaspofungin	BD	BD	BD	BD
Anidulafungin	≤0,06	0,125–1,0	BD	BD
Mikafungin	BD	BD	BD	BD

<sup>1</sup>ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)

<sup>2</sup>CL-CNM: İspanya Ulusal Mikrobiyoloji Merkezi maya koleksiyonu

BD: Belli değil.