

## EUCAST TANIMLAYICI DÖKÜMANI EDef 9.2

### Konidia Oluşturan Küfler için Antifungal İlaçların Sıvı Dilüsyonla Minimum İnhibitor Konsantrasyonlarını Belirleme Yöntemi

**Yayın Tarihi:** Temmuz 2014

**Çeviri Tarihi:** Aralık 2014

*Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, Howard SJ 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), SJ Howard<sup>4</sup> (Scientific Secretary, UK), WW Hope<sup>4</sup> (Steering Committee, UK), C Lass-Flörl<sup>3</sup> (Steering Committee, Austria), M Cuenca-Estrella<sup>2</sup> (Steering Committee, Spain), S Arikian-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), AH Groll<sup>10</sup> (Germany), P Hamal<sup>11</sup> (Czech Republic), H Järv<sup>12</sup> (Estonia), N. Klimko<sup>13</sup> (Russia), P. Koukila-Kähkölä (Finland)<sup>14</sup>, K. Lagrou<sup>15</sup>, O. Lortholary<sup>16</sup> (France), T. Matos (Slovenia)<sup>17</sup>, CB Moore<sup>18</sup> (UK), A. Schmalreck <sup>19</sup>, A. Velegraki<sup>20</sup> (Greece), P Verweij<sup>21</sup> (The Netherlands).

1 Unit of Mycology building 43/117, Dept Microbiological Surveillance and Research, Statens Serum Institut, Ørestads Boulevard 5, DK-2300 Copenhagen, Denmark, Email maca@ssi.dk

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

3 Division of Hygiene and Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria,

4 Antimicrobial Pharmacodynamics and Therapeutics, Department of Molecular and Clinical Pharmacology, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom,

5 Hacettepe University Medical School, Department of Medical Microbiology, Mycology Laboratory, Ankara, Turkey,

6 Clinica Malattie Infettive, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy,

7 University Hospital, Lausanne, Switzerland,

8 Dept Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden,

9 Dept. Clinical Microbiology, Rikshospitalet, Oslo, Norway,

10 Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and Department of Pediatric Hematology/Oncology, University Children's Hospital Muenster, Germany, EUCAST E.DEF 9.2 July 2014 Antifungal MIC method for conidia forming moulds

Page 2 of 24

- 11 Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc & University Hospital Olomouc, Czech Republic,
- 12 Tartu University Hospital, Tartu, Estonia,
- 13 Dept. of Clinical Mycology, Nord-West Medical University 1/28 Santiago de Cuba str. Saint Petersburg, Russia,
- 14 Mycology Unit, HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland,
- 15 Dept. of Microbiology & Immunology, KU Leuven, Leuven and National Reference Center for Mycosis, UZ Leuven, Leuven, Belgium,
- 16 Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques, Unité de Mycologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France,
- 17 Institute of Microbiology and Immunology, Medical Mycology Department, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia,
- 18 The University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, NIHR Translational Research Facility in Respiratory Medicine and Mycology Reference Centre, University Hospital of South Manchester NHS Foundation Trust, Manchester, UK,
- 19 MBS—Microbiology, P.O. Box 101247, 80086 Munich, Germany,
- 20 Mycology Research Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece,
- 21 Radboud University Medical Centre Nijmegen, The Netherlands,

**Çeviri:** Prof. Dr. Beyza Ener (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı), Prof. Dr. Zayre Erturan ( İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

## GİRİŞ

Antifungal duyarlılık testleri, doğal veya edinilmiş direnç olasılığı olduğunda ya da sadece tür tanımlamasıyla duyarlılığın güvenilir olarak tahmin edilemediği durumlarda invazif, tekrarlayan veya tedaviye yanıtız hastalıklara sebep olan mantarlara uygulanır. Direnç takibi, epidemiyolojik çalışmalar ve yeni ve mevcut ajanların in vitro aktivitesinin karşılaştırılması için de antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önemlidir.

Antimikrobiyal ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanması için dilüsyon (seyreltme) yöntemleri kullanılır. Dilüsyon yöntemleri, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde referans yöntemlerdir. Yeni bir antimikrobik ilacın aktivitesini belirlemede, diğer test formatlarıyla (ticari gradiyent ve disk difüzyon testleri) arada kalındığı zaman organizmaların duyarlılığını doğrulamada ve diğer test formatlarının güvenilir veya valide olmadığı (ki bu küf mantarlarının duyarlılığında halen en genel senaryodur) organizmaların duyarlılığını belirlemede esas olarak kullanılmaktadır. Dilüsyon testleriyle, mikrodilüsyon plağının kuyucuklarında bir antimikrobiyal ajanın seri sulandırılmalarını bulunduran sıvı ortamında (sıvı besiyeriyle mikrodilüsyon), mantarların görülebilen üreme oluşturma yetenekleri araştırılır.

Bir ilacın bir mantarın üremesini engelleyen (inhibe eden) en düşük konsantrasyonu -mg/L olarak ifade edilir- antifungal MİK olarak tanımlanır. MİK mikroorganizmanın antifungal maddeye duyarlılığı veya direnci konusunda bilgi vermektedir ki bu tedavi kararına yardımcıdır.

İnvazif küf hastalıklarının tedavisinde artan sayıda seçeneklerle beraber bazı tür ve suşlarda antifungal ilaçlara direncin gösterilmesi, filamentöz fungal izolatlarla karşı yeni ve mevcut antifungal ilaçların in vitro duyarlılığını belirleyen standart bir yöntem ihtiyacı olduğunu doğrulamaktadır (1-10).

Bu dokümanda tanımlanan yöntem, klinik önemi olan mantar hastalıklarına yol açan küfleri test etmek için Avrupa referans yöntemi olarak hazırlanmıştır.

## KAPSAM

Bu EUCAST standardı, konidia oluşturan küflerin antifungal maddelere karşı MİK'lerinin saptanmasıyla duyarlılıklarını belirleyen bir yöntemi tarif etmektedir. MİK'ler belirli bir antifungal ilacın, tarif edilen test koşulları altında in vitro aktivitesini göstermektedir ve farmakokinetik, farmakodinamik ve direnç mekanizmaları gibi başka faktörler ile birlikte hasta yönetiminde kullanılabilir. MİK, uygun sınır noktalar (break-point) kullanıldığında, küflerin bir antifungale "duyarlı (D)", "orta duyarlı (OD)" veya "dirençli (Di)" olarak sınıflandırılmasına olanak vermektedir (11,12). Ayrıca türe spesifik epidemiyolojik cutoff değerleri (ECOFF) kullanıldığında, MİK dağılımları sokak tipi (wild-type) veya sokak tipi (non-wild type) olmayan mantar popülasyonlarının tanımlanması için de kullanılabilir.

Bu tanımlanan standart, küflerin antifungal ilaçlara duyarlılığını ölçmede kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntemdir ve kabul edilebilir derecede uygunluk (ör. laboratuvarlar arasında belirli aralık içindeki uyuşma) sağlamak için hazırlanmıştır. Rambali ve ark (13) tarafından gösterildiği gibi, antifungal maddelerin filamentöz mantarlar için MİK değerleri birçok faktörden etkilenmektedir. Örneğin, *Aspergillus* türlerine karşı itrakonazol MİK'i mikrodilüsyon kuyucuğunun şeklinden, inokulum konsantrasyonundan, inkübasyon sıcaklığı ve zamanından büyük oranda etkilenir. Dolayısıyla teknik faktörler çok önemli olduğundan bu standart; inokulum hazırlanması, inokulum miktarı, inkübasyon sıcaklığı ile zamanı ve besiyeri formülü gibi test koşullarına odaklanmıştır.

## TERİMLER VE TANIMLAR

1. **Antifungal madde:** Bir küfün üremesini engelleyen veya öldüren biyolojik, semi-sentetik, sentetik orijinli maddedir. Dezenfektanlar, antiseptikler ve koruyucular bu tarife dahil değildir.
2. **Antifungal maddelerin özellikleri**
  - a. **Etki gücü (potens).** Bir test maddesinin, aynı maddenin referans olarak alınan toz halindeki şekline (bilinen potense sahip) karşı bir "bioassay" ile belirlenmiş olan antimikrobik olarak aktif fraksiyonudur. Etki gücü, kütle fraksiyonu olarak gram başına miligram şeklinde (mg/g) veya etkinlik içeriği olarak gram başına uluslararası ünite (IU) şeklinde, yüzde kütle veya yüzde hacim fraksiyonu şeklinde veya madde konsantrasyonunun miktarı olarak (kütle fraksiyonu) test maddesinin içerdiği malzemelerin litresi başına mol olarak ifade edilmektedir.
  - b. **Konsantrasyon.** Tanımlanmış hacimdeki bir sıvının içerisindeki bir antimikrobik maddenin miktarı. Konsantrasyon SI üniteleri olarak, mg/L şeklinde ifade edilmektedir.
3. **Stok solüsyonu.** Ek sulandırmalar için kullanılan başlangıç solüsyonu.
4. **Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK).** Tanımlanmış bir zaman periyodunda küflerin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon. MİK mg/L olarak ifade edilmektedir.
5. **Sınır nokta ("Breakpoint" BP).** Küflerin "duyarlı", "orta duyarlı" ve "dirençli" şeklindeki klinik kategorilere ayrılmasına temel oluşturan spesifik MİK değerleri. Sınır nokta değerleri, koşullardaki değişikliklere bağlı olarak değişime uğrayabilmektedir (örneğin sık kullanılan ilaç dozajlarındaki değişiklikler).
  - a. **Duyarlı (D).** Bir küf, terapötik başarı olasılığının yüksek olması ile ilişkili olan bir antimikrobiyal aktivite düzeyine göre duyarlı olarak tanımlanmaktadır. Mantarlar belirlenmiş bir fenotipik test sisteminde uygun sınır nokta ile duyarlı olarak kategorize edilmektedir.
  - b. **Orta duyarlı (OD).** Bir küf, terapötik etkinin belirsiz olması ile ilişkili olan bir antimikrobiyal madde aktivite düzeyine göre orta duyarlı olarak tanımlanmaktadır. Bu küf belirlenmiş bir fenotipik test sisteminde uygun sınır nokta ile orta duyarlı olarak kategorize edilmektedir. Bununla kastedilen, bu suşa bağlı bir enfeksiyonun, ilaçların fiziksel olarak yoğunlaştığı vücut bölgelerinde veya ilaç yüksek dozda kullanılabilirdiği zaman uygun şekilde tedavi edilebileceğidir ki bu, aynı zamanda ufak, kontrolsüz teknik faktörlerin değerlendirmelerde majör uyumsuzluklara neden olmasını önleyecek olan bir tampon bölge oluşturmaktadır.
  - c. **Dirençli (Dİ).** Bir küf, terapötik başarısızlık olasılığının yüksek olması ile ilişkili olan bir antimikrobiyal aktivite düzeyine göre dirençli olarak tanımlanmaktadır. Mantar suşları belirlenmiş bir fenotipik test sisteminde uygun sınır nokta ile dirençli olarak kategorize edilmektedir.
6. **Sokak-tipi ("Wild-type").** Antifungal maddeye karşı edinilmiş direnç mekanizmalarına sahip olmayan bir suş.
7. **Kalite kontrolü için referans suş.** Sabit, belirli antifungal duyarlılık fenotiplerine ve/veya genotiplerine sahip karakterize edilmiş, kataloglanmış mantar. Bunlar kültür koleksiyonlarından elde edilebilmekte ve kalite kontrolünde kullanılabilir.
8. **Duyarlılık test yöntemi**
  - a. **Sıvı dilüsyon.** Sıvı besiyerinde antifungal ajanların seri sulandırmalarının (genellikle iki-kat) yapıldığı bir teknik olup, bu ortamda standart sayıda bir

organizma belirli bir süre inkübe edilmektedir. Bu yöntemin amacı MİK belirlenmesidir.

b. **Mikrodilüsyon.** Sıvı dilüsyonun, kuyucuk kapasitesi yaklaşık 300µl olan bir mikrodilüsyon plağındaki uygulamasıdır.

9. **Sıvı besiyeri.** Mantarların in vitro üremesi için kullanılan sıvı ortam.

10. **İnokulum.** Belirli bir hacim içerisinde süspanse edilen sporların/konidiaların (koloni oluşturan birimler) sayısı. İnokulum mililitre başına koloni oluşturan birimler olarak ifade edilmektedir (KOB/mL).

## TEST YÖNTEMLERİ

### Genel

Yöntem, kuyucukları düz tabanlı olan mikrodilüsyon plaklarında uygulanmakta olup, kuyucuk başına 100µl antifungal çalışma solüsyonuna 100µl inokulumun eklenmesine dayanır.

### Besiyeri

Son konsantrasyon %2 olacak şekilde glikoz ilave edilmiş olan RPMI 1640 (L-glutamin ve bir pH indikatörlü fakat bikarbonatsız) (RPMI %2 G) önerilmektedir. RPMI en az başka sentetik besiyerleri kadar tatmin edicidir (14,15). Standart %0,2'lik glikoz konsantrasyonu yerine %2'nin kullanılmasının daha iyi bir üreme ile sonuçlandığı ve son noktaların ("end-point") saptanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (16). RPMI 1640 besiyeri için kullanılması önerilen tampon, son konsantrasyonu 0.165 mol/L; pH'ı 7.0 olan 3-(N-morfolino) propansulfonik asittir (MOPS). RPMI 1640'ın bileşimi Tablo 1'de özetlenmiştir. Önerilen iki kat konsantre %2 glikozlu RPMI 1640 (RPMI %2 G) (mantar inokulumu eklenir eklenmez %50'lik [1:1] bir dilüsyona imkan tanımak için, bkz. "çalışma solüsyonlarının hazırlanması" ve sonrası) besiyeri şu şekilde hazırlanmaktadır:

1. Tablo 2'deki bileşenlere 900 ml distile su eklenir.
2. Bileşenler tamamen çözünene kadar karıştırılır.
3. Bir yandan karıştırarak, 25°C'de 1M sodyum hidroksit ile pH 7.0'ye ayarlanır.
4. Son hacim 1000 ml olana kadar su eklenir.
5. Gözenek büyüklüğü 0.22µm olan bir filtre ile steril edilir.
6. 4°C veya daha düşük sıcaklıkta altı aya kadar saklanır.
7. Steril hale getirilmiş besiyerinin bir miktarı kalite kontrolü amacıyla sterilite denetimi, pH'ın yeniden test edilmesi (6.9-7.1 kabul edilebilirdir) ve bir referans suş ile üreme kontrolü için kullanılır.

## ANTİFUNGAL MADDELER

### Genel

Tüm antifungal ilaç solüsyonları İyi Üretim Uygulamalarına (Good Manufacturing Practice) uygun olarak hazırlanmalıdır. Saf antifungal tozlar doğrudan ilaç üreticisinden veya güvenilir ticari kaynaklardan temin edilmelidir. Klinik kullanım için hazırlanan ilaçlar, duyarlılık testi ile etkileşebilen ek maddeler içerebildiklerinden kullanılmamalıdır. Tozlar ilacın jenerik adı, bir üretim parti ("lot") numarası, etki gücü, son kullanma tarihi ve önerilen saklama koşulları ile birlikte sağlanmalıdır. Tozlar, imalatçılar tarafından başka şekilde önerilmiyorsa, bir kurutucu madde ile birlikte, kapalı kaplarda -20°C'de veya daha düşük sıcaklıkta saklanmalıdır. Nem çeken maddeler dondurulmadan önce tercihen her seferinde biri kullanılacak şekilde, parçalara bölünmelidir. Suyun tozun üstünde yoğunlaşmasını önlemek için kapakları açılmadan önce kapların oda ısısına kadar ısınması sağlanmalıdır.

## Stok solüsyonlarının hazırlanması

Antifungal ilaç solüsyonları, kullanılacak olan antifungal tozun etki gücü dikkate alınarak hazırlanmalıdır. Standart bir solüsyonun hazırlanması için gerekli olan toz veya çözücünün miktarı şu şekilde hesaplanır.

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

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

Antifungal madde tozundan 100 mg tartıldığında, iki basamaklı gösterecek şekilde ayarlanmış bir analitik tartı kullanılmalıdır. En az 100 mg tozun tartılması önerilmektedir. Antifungal ilaç, stok solüsyonlarını mikrodilüsyon plağında test edilecek olan en yüksek konsantrasyondan 200 kere yüksek konsantrasyonlarda hazırlanır. Üretici, ilaç ile birlikte antifungal bileşiklerin çözünürlükleri ile ilgili bilgi de sağlamalıdır. Bazı antifungal maddeleri eritmek için su dışında çözücüler gerekmektedir (Tablo 3). Stok solüsyonların sterilizasyonu normalde gerekli değildir. Bununla birlikte gerektiğinde, ilaçların işlem sırasında absorbe olmadıklarına veya bozulmadıklarına emin olarak (örneğin filtrasyondan önce ve sonra alınan örnekler test edilmelidir) uygun bir yöntemle (örneğin bir sterilizasyon filtresi) steril edilebilir.

İlaç imalatçısı tarafından başka şekilde belirtilmediyse, ilaç solüsyonları ufak hacimler halinde steril polipropilen veya polietilen şişelerde -70°C'de veya altında depolanır. İlaçlar, -70°C'de en az altı ay belirgin bir aktivite kaybı olmaksızın saklanabilir (17). Ekinokandinler daha önce -70°C'de dayanıksız olarak kabul edilmiş olmakla birlikte, bu sıcaklığa en az altı ay dayandıkları bulunmuştur (18).

Şişeler -70°C'den çıkartıldıktan sonra çözüldükleri gün kullanılmalıdır. Aynı gün kullanılmayan her ilaç atılır. Antifungal ilaçtaki belirgin bir bozulma, kalite kontrol suşlarının duyarlılık test sonuçlarında görülecektir (Tablo 5). Gerektiğinde ilaç, ilaç etki gücünün saptanması amacıyla test edilebilir.

## Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Konsantrasyon aralığı test edilen mikroorganizmaya ve antifungal ilaca bağlıdır. Konsantrasyon aralığı, eğer mevcutsa sınır noktaları ve ayrıca kalite kontrol suşları için beklenen sonuçları kapsamalıdır. Önerilen ilaç konsantrasyon aralıkları Tablo 3'de görülmektedir. İki-kat ilaç dilüsyon serisi, iki kat konsantre RPMI %2 G'de hazırlanır (Tablo 4). İki kat konsantre RPMI %2 G, inokulum eklenmesi ile %50 sulanır ve son konsantrasyonuna ulaşır. Bu yaklaşım inokulumun distile suda hazırlanmasına olanak vermektedir.

İlaç dilüsyonları ISO önerilerine uygun olarak hazırlanmalıdır (Tablo 4) (19). Referans yöntem kadar iyi uygulandıkları gösterildiğinde, alternatif sulandırım şemaları da kullanılabilir (20).

Çalışma solüsyonu hazırlamak (2X son konsantrasyon) için gerekli basamakların özeti:

1. Bir antifungal ilaç tüpü -70°C'den alınır.
2. Çözücü uygun hacimlerde (çözücüler için Tablo 3, çözücü hacimleri için Tablo 4'e bakınız) dokuz farklı tüpe dağıtılır.

3. Son konsantrasyonun 200 katı seri sulandırım hazırlamak için Tablo 4'de tarif edilen basamaklar izlenir. Stok konsantrasyonlar (3200 mg/L veya 1600 mg/L) Tablo 4'ün 1. basamağındaki benzer sulandırım şeması ile sulandırım aralığı 0,03-16mg/L ve 0,015-8mg/L olacak şekilde sulandırılır.
4. İki kat konsantrasyondaki RPMI %2 G besiyerinden 9,9 ml 10 adet tüp içine dağıtılır. Çözücü içinde 200 kat konsantrasyonda antifungal olan tüplerden 100 µl alınarak 9,9 ml besiyeri (1:100 sulandırım) bulunan tüplere aktarılır. Böylece besiyeri tüplerinde çözücünün konsantrasyonu %1 ve antifungal ilacın konsantrasyonu ise son konsantrasyonun iki katı olur.

### **Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması**

Steril plastik (yüksek bağlayıcı plastikten kaçınınız) tek kullanımlık, nominal kapasitesi yaklaşık 300 µl olan tabanı düz 96 kuyucuklu plaklar kullanılır. Düşük buharlaştırma kapakları kullanılmaz.

Mikrodilüsyon plağının 1-10. kolonlarındaki kuyucuklara, her tüpteki iki kat konsantre antifungal ajandan 100'er µl dağıtılır. Örneğin itrakonazol, vorikonazol veya posakonazol için birinci kolondaki kuyucuklara 16 mg/L ilaç içeren besiyeri, ikinci kolondaki kuyucuklara 8mg/L ilaç içeren besiyeri konur ve bu böyle 10. kolon kuyucuklarına kadar devam eder. Mikroplağın 11. ve 12. kolonundaki kuyucuklara ise 100 µl iki kat konsantre RPMI %2 G besiyeri dağıtılır.

Böylece 1-10. kolonlardaki kuyucuklara, son konsantrasyonun iki katı antifungal ilaç bulunan %1 çözücülü iki kat konsantre RPMI %2 G besiyerinden 100 µl dağıtılmış olur. On bir ve 12. kolonlardaki kuyucuklarda ise iki kat konsantre RPMI %2 G besiyeri vardır.

### **Mikrodilüsyon plaklarının saklanması**

Plaklar plastik veya alüminyum folyo ile kapatılır ve -70°C veya daha düşük sıcaklıkta altı aya kadar veya -20°C'de en fazla bir ay, her hangi bir etki gücü kaybı olmaksızın donuk olarak saklanır. Eritilen plaklar bir daha dondurulmamalıdır. Ekinokandiler daha az stabildir ve hazırlanan plaklar sadece -70°C'da saklanmalıdır (-20°C'da değil).

### **İNOKULUM HAZIRLANMASI**

Doğru ve tekrarlanabilir antifungal duyarlılık testi için inokulum standardizasyonu esastır. Son inokulum  $1 \times 10^5$  KOB/mL ile  $2,5 \times 10^5$  KOB/mL arasında olmalıdır.

### **Spor/konidia süspansiyon yöntemi**

İzolatlar patates dekstroz agar veya Sabouraud dekstroz agar veya mantarların yeterince sporlanabildiği diğer besiyerlerine pasajlanmalı ve 35°C'da inkübe edilmelidir. İnokulum süspansiyonu taze, olgun (2-5 günlük) kültürlerden hazırlanır. Bazı durumlarda ise yeterli sporlanma için inkübasyonun uzatılması gereklidir. Koloniler, %0.1 Tween 20 eklenmiş yaklaşık 5 mL steril su ile kapatılır. Daha sonra koloni, steril bir pamuk ekivyonla dikkatlice kazınır ve bir pipetle steril bir tüpe aktarılır. Alternatif olarak, steril nemli bir pamuk ekivyon koloniye nazikçe deşdirmek için kullanılır ve ekivyona gelen sporlar Tween 20 eklenmiş 5 mL su bulunduran steril bir tüpe aktarılır. Süspansiyon, döndürücü bir vorteks karıştırıcı ile 2000 rpm'de 15 saniye homojenize edilir. Daha sonra bir sayma kamerası ile doğru konsantrasyonu elde edebilmek için uygun dilüsyonları yapılır (*Aspergillus* spp için aşağıdaki alternatif yöntem yorumlarına bakınız). İnokulum preparatı, hif ve kümelerin varlığı açısından da incelenmelidir. Eğer önemli sayıda hif belirlenirse (mantar yapılarının >%5), süspansiyon steril bir enjektöre alınır ve por çapı 11 µm olan bir filtreden geçirilerek steril bir

tüpe toplanır. Bu basamak hifleri uzaklaştırır ve sadece konidiadan oluşan bir süspansiyon elde edilmesini sağlar. Eğer kümeler saptanmışsa, inokulum vorteks karıştırıcı ile bir kez daha 15 saniye karıştırılır. Bu basamak kümeler kaybolana kadar gerekli olduğu kadar tekrarlanabilir. Konidialar sayma kamerasında sayılarak süspansiyon, steril distile su ile  $2-5 \times 10^6$  konidia/mL yoğunluğuna ayarlanır. Alternatif olarak, *Aspergillus* konidia süspansiyonu filtre edilir ve spektrofotometrik olarak McFarland 0.5 yoğunluğundaki standarda eş bir yoğunlukta hazırlanabilir (24,25). Hazırlanan süspansiyonlar son çalışma inokulumu olan  $2-5 \times 10^5$  KOB/mL yoğunluğunu elde etmek için daha sonra distile su ile 1:10 oranında sulandırılır (24-27).

## **MİKRODİLÜSYON PLAKLARININ İNOKÜLASYONU**

Canlı konidia konsantrasyonunu bozmamak için mikrodilüsyon plakları inokulum süspansiyonu hazırlanmasını takiben 30 dk içinde inoküle edilmelidir.

İnokulum süspansiyonu ( $2-5 \times 10^5$  cfu/mL) döndürücü vorteks karıştırıcıda karıştırılır ve mikrodilüsyon plağının her kuyucuğuna, kuyucuğun içeriğine dokunmadan 100 µL olarak inoküle edilir. Böylece gerekli son ilaç ve inokulum yoğunluğunu (son inokulum =  $1 \times 10^5-2,5 \times 10^5$ ) sağlanmış olur.

İlaçsız steril besiyeri (100 µL) bulunan üreme kontrol kuyucuklarına (kolon 11) da aynı inokulum süspansiyonundan 100 µL konur. Mikrodilüsyon plağının 12. kolonunda bulunan kuyucuklar ise, distile su ve besiyeri sterilite kontrolü amacıyla, inokulumun hazırlandığı steril distile su ile 100 µL doldurulur (sadece ilaçsız besiyeri). Kalite kontrol organizmaları, her zaman, izolatların test edildiği aynı yöntemle test edilmelidir.

Kuyucuklardaki inokulum süspansiyonunun  $1 \times 10^5$  ve  $2,5 \times 10^5$  KOB/mL arasında olduğundan emin olmak için kalite kontrolü amacıyla canlı hücre sayımı şu şekilde yapılır. İnokulum süspansiyonunun 10 mL'si, %0.1 Tween 20 içeren 2 mL steril distile suda seyreltilmelidir. Süspansiyon daha sonra 2000 rpm'de döndürücü vortek karıştırıcıda homojenize edilir. Bu süspansiyondan alınan 100 mL uygun bir agarın (Sabouraud dekstroz agar veya patates dekstroz agar) yüzeyine yayılır, 24-48 saat ya da koloniler rahat sayılana kadar inkübe edilir ve 100-250 koloni oluşması beklenir. Seyreltilen süspansiyondan alınan 100 mL'nin %0.1 Tween 80 içeren 900 mL steril distile su ile yapılan ileri sulandırımının 100 mL'sinin ekimi ile yapılan opsiyonel/ek sayımda ise 10-50 koloni oluşması beklenir.

## **MİKRODİLÜSYON PLAKLARININ İNKÜBASYONU**

Mikrodilüsyon plakları normal havada çalkalamadan  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'da inkübe edilmelidir. Mucarales, üreme yeterli olduğu zaman 24 saatte okunurken, diğer küfler 48 saat sonra okunmalıdır. Bazen kontrol kuyucuğunda yeterli üreme sağlamak için (örneğin *Scedosporium*) 24 saat daha ileri inkübasyon gerekebilir. Ancak, 72 saatten daha uzun inkübasyon önerilmez.

## **SONUÇLARIN OKUNMASI**

Son nokta ("endpoint"), her kuyucuktaki üreme derecesi kaydedilerek göz ile okunur.

- Ekinokandiler hariç diğer ilaçlar için MİK son noktası: Gözle görülebilir bir üremenin olmadığı ilaç konsantrasyonu MİK değeridir. Sıvı besiyerinin yüzeyindeki tek kolonileri ve gözle görülen üremeli iki kuyucuk arasında üremenin olmadığı tek kuyucuk yok sayılır. Plakları okurken arka fon olarak, siyah-beyaz yatay bir kağıdın kullanılması önerilir. Havaya kaldırılmış plaktan bakıldığında hiç üreme olmadığı zaman, siyah ve beyaz rengin arasındaki kenar keskin ve farklı görülecektir (Şekil 1).



- Kontrol kuyucuğunda görülen uzun, dallanmamış hifler yerine anormal, kısa ve dallı hif kümelerinin görüldüğü en düşük ekinokandin konsantrasyonu, ekinokandiler için minimal efektif konsantrasyondur (MEK) (Şekil 2). Bu, pozitif kontrol kuyucuğundaki görüntü ile karşılaştırıldığında değişik filamentöz bir üremenin (mikrokoloni veya granüler üreme) olduğu en düşük konsantrasyon olarak nadiren gözle makroskobik olarak saptanabilir. Bu olmadığı durumlarda, kuyucuklardan alınan az bir miktarın, ilacın oluşturduğu morfolojik değişikliği belirlemek için mikroskobik olarak incelenmesi veya kuyucuklardaki değişikliği gösterebilecek "inverted" bir mikroskobun kullanılması gerekir.

## **SONUÇLARIN YORUMLANMASI**

EUCAST, *Aspergillus* türlerinde amfoterisin B, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol için sınır değerleri oluşturmuştur ve ilgili literatür ile beraber, yayınlardan ve EUCAST web sitesinden elde edilebilir (11,12). Ekinokandin MEK'leri ile tedavi başarısı arasındaki korelasyonu gösteren veri ise henüz yoktur. Diğer küfler için ise sınır değerlerin yokluğunda MİK'leri yorumlamak kolay değildir ve klinik deneyim, tedavi sırasında ilaç maruziyeti gibi diğer elde edilen her veri dikkate alınmalıdır. Ek olarak, duyarlılıkla ilgili bilgilerin sağlanması ve diğer küflerin MİK'lerinin belirlenmesi, ECOFF ve sınır değer seçimleri açısından son derece önemli veri seti oluşturacaktır.

## **KALİTE KONTROL**

Sonuçların kalitesi ile ilgili kontrol yöntemleri oluşturulmuş ve CLSI tarafından detaylı bir şekilde tarif edilmiştir (28). Test sonuçlarının kalitesi rutin olarak kontrol suşları ile takip edilir.

### **Kontrol suşları**

Kontrol suşlarının MİK'leri test edilen iki katlık seri aralığın ortalarına yakın olmalı ve antifungal ilaç duyarlılık paterni stabil kalmalıdır (28).

### **Kontrol suşlarının saklanması**

Fungal izolatlar liyofilize veya donuk olarak -60°C veya daha altında saklanmalıdır (29,30). Her iki haftada bir donuk kültürden yenileri hazırlanmak koşuluyla, kültürler 2-8°C'da eğri Sabouraud dekstroz agar veya patates dekstroz agarda kısa süre (iki haftadan az) saklanabilir.

### **Kontrol suşlarının rutin kullanımı**

Kontrol suşlarının rutin kullanımı için yatık agar, donuk veya liyofilize kültürlerin seçici olmayan besleyici bir agara (örneğin Sabouraud dekstroz agar veya patates dekstroz agar) inokülasyonu ile taze kültürleri hazırlanmalıdır.

1. Her test uygulamasına en az bir kontrol suşu eklenmelidir ve MİK'leri Tablo 5'de verilen kontrol aralıkları içinde olmalıdır. Eğer bir kontrol suşunun MİK değerleri bir veya daha fazla ilaç için kontrol aralığının dışında kalırsa iki ya da daha fazla suşa ihtiyaç vardır. Eğer kontrol suşlarının MİK'leri aralığın dışında ise test tekrarlanmalıdır. Eğer 20 test içinde birden fazla aralık dışında kalma varsa kaynak hatası araştırılmalıdır.
2. Test organizmasının üremesini göstermek ve son nokta okumasının yoğunluk kontrolünü sağlamak için her testte antifungal ilaç olmayan besiyerinin bulunduğu kuyucuk olmalıdır.

3. Saflığından emin olmak ve eğer tekrar test etmek gerekirse taze koloniler elde etmek için inokulum uygun bir agara pasajlanır.
4. Her yeni kutu besiyeri, yeni mikrodilüsyon plak üretim numarası ve yeni RPMI %2 G besiyeri, MİK'lerin beklenen aralık içinde kaldığını göstermek için Tablo %2'de listelenen en az iki kalite kontrol suşu ile test edilir.

## KAYNAKLAR

1. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Graybill JR. 2000. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Aspergillus* Study Group. *Medicine (Baltimore)* 79:250-260.
2. Verweij PE, van den Bergh MF, Rath PM, de Pauw BE, Voss A, Meis JF. 1999. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review. *J Clin Microbiol* 37:1606-1609.
3. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1364-1368.
4. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2003. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1120-1124.
5. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D. 2005. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 131:201-207.
6. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2004. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2747-2750.
7. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1897-1904.
8. Howard SJ, Arendrup MC. 2011. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol* 49 Suppl 1:S90-95.
9. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 15:1068-1076.
10. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, Mellado E, Donders AR, Melchers WJ, Verweij PE. 2008. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism. *PLoS Med* 5:e219.
11. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. 2012. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin Microbiol Infect* 18:E248-250.

12. Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Arendrup MC. 2013. EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus* spp. Clin Microbiol Infect 19:E278-280.
13. Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, Woestenborghs F, Baert L, Massart DL, Odds FC. 2001. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. J Antimicrob Chemother 48:163-177.
14. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Hughes CE, Odds FC, et al. 1990. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother 34:1648-1654.
15. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, Body BA, Frey C, Hall G, Roberts GD, et al. 1993. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. Antimicrob Agents Chemother 37:39-45.
16. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. 1997. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. J Antimicrob Chemother 40:401-414.
17. Anhalt JP, Washington II JA. 1991. Preparation and storage of antimicrobials, p. 1199-1200. In Balows A (ed.), Manual of Clinical Microbiology.
18. Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Perlin DS. 2011. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. Using 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 55:1580-1587.
19. ISO. 15-11-2006. 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. ISO 20776-1, 1-20, Geneva, Switzerland, ISO.
20. Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2010. 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 48:1918-1920.
21. Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. 2001. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. J Clin Microbiol 39:2513-2517.
22. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. 2001. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 45:327-330.
23. Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Garcia-Effron G, Perlin DS, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. 2010. Comparison of caspofungin MICs by means of EUCAST method EDef 7.1 using two different concentrations of glucose. Antimicrob Agents Chemother 54:3056-3057.
24. Rodriguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. 2003. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum

preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 41:5236-5237.

25. Arendrup MC, Howard SJ, Lass-Flörl C, Mouton JW, Meletiadis J, Cuenca-Estrella M. 2014. EUCAST isavuconazole susceptibility testing of *Aspergillus*: comparison of results for inoculum standardisation using conidia counting versus optical density. *Antimicrob Agents Chemother* In Press.

26. Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Petrikkou E, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. 2002. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 50:719-722.

27. Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. 2001. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 39:1345-1347.

28. CLSI. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. Document M38-A2.

29. Pasarell L, McGinnis MR. 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *J Clin Microbiol* 30:1000-1004.

30. Chandler D. 1994. Cryopreservation of Fungal Spores Using Porous Beads. *Mycological Research* 98:525-526.

**Tablo 1.** RPMI 1640 besiyerinin içeriği

<b>İçerik</b>	<b>g/L</b>
L-arginin (serbest baz)	0.200
L-aspargin (anhidro)	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-isolösin	0.050
L-lösin	0.050
L-lizin HCl	0.040
L-methionin	0.015
L-fenilalanin	0.015
L-prolin	0.020
L-serin	0.030
L-threonin	0.020
L-triptofan	0.005
L-tirosin 2Na	0.02883
L-valin	0.020
Biotin	0.0002
D-pantotenik asit	0.00025
Kolin klorid	0.003
Folik asit	0.001
Myo-inositol	0.035
Niasinamid	0.001
PABA	0.001
Piridoksin HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamin HCl	0.001
Vitamin B12	0.000005
Kalsiyum nitrat H <sub>2</sub> O	0.100
Potasyum klorid	0.400
Magnezyum sülfat (anhidro)	0.04884
Sodyum klorid	6.000
Sodyum fosfat, dibasik (anhidro)	0.800
D-glukoz	2.000
Glutatyon, indirgenmiş	0.001
Fenol kırmızısı, Na	0.0053

<sup>a</sup> Bu besiyerinin %0.2 glukoz içerdiğine dikkat edin

**Tablo 2.** MOPS ile tamponlanmış iki kat yoğun RPMI %2G besiyerinin içeriği

<b>İçindekiler</b>	<b>İki kat konsantre</b>
Distile su	900 mL*
RPMI 1640 (Tablo 1)	20.8 g
MOPS	69.06 g
Glikoz	36 g

\*Toz halindeki maddeleri 900 mL distile suda çözüñ. Tamamen eridiğinde, 25°C'da 1M sodyum hidroksit ile karıştırarak pH'ı 7.0'a ayarlayın. Son hacim 1 L olana kadar su ekleyin. Kullanmadan önce filtreden geçirerek steril edin.

**Tablo 3.** Stok solüsyonların hazırlığı için çözücüler, özellikler ve antifungal ajanların test aralık konsantrasyonları

<b>Antifungal ajan</b>	<b>Çözücü</b>	<b>Özellik</b>	<b>Test aralığı (mg/L)</b>
Amphoteresin B	DMSO	Hidrofobik	0.0312 - 16
Anidulafungin	DMSO	Hidrofobik	0.0312 - 16
Kaspofungin	DMSO	Hidrofobik	0.0312 - 16
İtrakonazol	DMSO	Hidrofobik	0.0156 - 8
Mikafungin	DMSO	Hidrofobik	0.0312 - 16
Posakonazol	DMSO	Hidrofobik	0.0156 - 8
Vorikonazol	DMSO	Hidrofobik	0.0156 - 8

**Tablo 4.** Final konsantrasyonu 0.0312-16 mg/L olan dilüsyon serilerinin hazırlanması için şema.

Adım	Konsantrasyon mg/L	Kaynak	Antifungalın hacmi (µL)	Çözücünün <sup>a</sup> hacmi (µL)	Ara konsantrasyon (mg/L)	İki kat güçteki RPMI%2G <sup>b</sup> ile sulandırım sonrası konsantrasyon (mg/L)
1	3,200 <sup>c</sup>	Stok	200	0	3,200	32
2	3,200	Stok	100	100	1,600	16
3	3,200	Stok	50	150	800	8
4	3,200	Stok	50	350	400	4
5	400	Adım 4	100	100	200	2
6	400	Adım 4	50	150	100	1
7	400	Adım 4	50	350	50	0.5
8	50	Adım 7	100	100	25	0.25
9	50	Adım 7	50	150	12.5	0.125
10	50	Adım 7	25	175	6.25	0.625

<sup>a</sup> Antifungal dilüsyonların hazırlanması için gerekli çözücüler için Tablo 3'e başvurunuz.

<sup>b</sup> İnokülüm süspansiyonu ile 1:1 sulandırım, belirtilenlerin yarısı olacak şekilde final konsantrasyonlar vermektedir.

<sup>c</sup> En yüksek final konsantrasyonları 8mg/L olan dilüsyon serileri için 1600 mg/L'lik bir stok solüsyonu ile başlayınız.



**Tablo 5.** Kalite kontrol suşların antifungal maddeler için kabul edilebilen MİK sınırları<sup>a</sup>.

Suş	Antifungal madde	Kalite kontrol (QC) sınırları
<i>Aspergillus fumigatu</i> ATCC 204305	Amfoterisin B Kaspofungin İtrakonazol Mikafungin Vorikonazol Posakonazol	0.25-1.0 MD <sup>b</sup> 0.12-0.5 MD <sup>b</sup> 0.25-1.0 0.03-0.25
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	Amfoterisin B Kaspofungin İtrakonazol Mikafungin Vorikonazol Posakonazol	0.5-2.0 MD <sup>b</sup> 0.12-0.5 MD <sup>b</sup> 0.5-2.0 0.12-0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i> F6919 <sup>c</sup>	Amfoterisin B Kaspofungin İtrakonazol Mikafungin Vorikonazol Posakonazol	0.25-1.0 MD <sup>b</sup> 8.0-16.0 MD <sup>b</sup> 0.5-2.0 0.5-2.0
<i>Aspergillus flavus</i> CM1813 <sup>d</sup>	Amfoterisin B Kaspofungin İtrakonazol Mikafungin Vorikonazol Posakonazol	1.0-4.0 MD <sup>b</sup> 0.12-0.5 MD <sup>b</sup> 0.5-2.0 0.12-0.5

<sup>a</sup> Alternatif olarak EUCAST EDef 7.2'de önerilen *Candida* QC suşları kullanılabilir. (Birinci günde bir spektrofotometrede okunması gerekmektedir)

<sup>b</sup> Mevcut değildir

<sup>c</sup> Manchester Mikoloji Referans Laboratuvarından elde edilebilmektedir

<sup>d</sup> EUCAST AFST'den elde edilebilmektedir

**Şekil 1.** Berrak bir kuyucuk (yeşil daire) ile zayıf (portakal renkli daire) ve göze çarpan (kırmızı daire) üremesi olan kuyucuklar arasındaki farkın belirlenmesi için havaya kaldırılmış mikrodilüsyon plağının arkasında siyah ve beyaz kağıt kullanınız.



**Şekil 2.** Uzun ve düzenli hifal üremeli, inhibe edilmemiş bir *A. fumigatus* üreme kontrolünün (sol) ve kaspofungin ile inhibe edilmiş, anormal ve/veya künt hifal üremeli *A. fumigatus* suşunun (sağ) arasındaki mikromorfolojik farkların gösterildiği yaş preparasyon resmi.

