

ANTİKANDİDAL DUYARLILIK TESTLERİNDE YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARATIVE EVALUATION OF ALTERNATIVE METHODS FOR ANTICANDIDAL SUSCEPTIBILITY TESTING

Zeynep GÜLAY*, Nuran YULUĞ*

Özet: Yeni bir antikandidal duyarlılık testi geliştirilmesi amacı ile klinik laboratuvarında izole ettiğimiz dört *Candida* suşu (*C.albicans* # 1, *C.albicans* # 2, *C. parapsilosis*, *C.kefyr*) referans olarak kullanılarak bunların flukonazol'e duyarlılığı makrodilüsyon ve kolorimetrik olarak mikrodilüsyon yöntemleri ile incelendi. Kolorimetrik yöntemde sonuçların değerlendirilmesinde, canlı hücreler tarafından sarı renkten mor renkli formazana indirgenen ve bu nedenle deneysel immünolojide sitotoksik aktivite saptanmasında da uygulanan bir tetrazolyum tuzu, MTT, boyası kullanıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda makrodilüsyon tüplerinin bulanıklığı, aynı besiyerinde 1/5 ve 1/10 oranında sulandırılan ilaçsız kontrol tüplerinin bulanıklığı ile karşılaştırılarak $MİK_{80}$ ve $MİK_{90}$ değerleri saptandı. Mikrodilüsyon yönteminde ise çukurlara MTT boyası eklenerek oluşan renk 550 nm dalga boyunda değerlendirildi. Kontrol ile test çukurlarının optik dansiteleri oranlanarak % canlılık saptandı. MTT ile elde edilen $MİK_{80}$ değerlerinin makrodilüsyon yöntemi ile saptanandan ortalama bir dilüsyon yüksek olduğu görüldü. Ayrıca sistemik kandidiyazis olgularından soyutlanan 50 *Candida* suşu da flukonazol'e duyarlılık yönünden çalışmamıza alınarak toplam 54 suş aynı yöntem ile değerlendirilmiş oldu.

Mikrodilüsyon yöntemlerinde, malzeme kullanımının az olması, otomasyon gibi özellikler bilinmektedir. Buna ilaveten MTT ile kolay görülebilecek bir sonuca ulaşmak söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla, bu tekniğin duyarlılık testlerinde kullanılmasının öncelikle düşünülmesini savunmaktayız.

Summary: An innovative anticandidal susceptibility test was described by comparative evaluation of fluconazole susceptibility of 4 clinical *Candida* spp. isolates (reference strains; *C.albicans* # 1, *C.albicans* # 2, *C.parapsilosis*, *C.kefyr*) by the standart macrodilution and a colorimetric microdilution assay. In the colorimetric assay, the results were evaluated by a yellow-colored tetrazolium salt, MTT, which is reduced to purple formazan by cellular dehydrogenases and used to assess cytotoxicity in experimental

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

immunology. MIC_{80} and MIC_{90} values for the macrodilution test were estimated visually after 24 and 48 hours of incubation by comparing the turbidity of test tubes with that of the growth control which was diluted 1:5 and 1:10 in medium. In the microdilution assay, MTT was added to the wells and the resultant color (absorbance) was assessed at a wavelength of 550 nm. Percentage of viable cells were determined by the relative optical density (OD) of test wells as compared to the OD of growth control wells. The colorimetric MIC_{80} values were generally one dilution higher than the macrodilution MIC_{80} values. Fluconazole susceptibilities of 50 clinical isolates of *Candida* spp. were also evaluated by the two methods.

Microdilution tests are, in general, easier to perform, rapid and suitable for automation. The use of MTT in addition to this method leads to better assessment of the results. We propose the utilization of this colorimetric method for antifungal susceptibility testing.

G İ R İ Ő

Son yıllarda, kandidiyazis olgularının sıklığındaki artış ve tedavi sırasında karşılaşılan direnç problemi geliştirilmiş antifungal duyarlılık testlerine olan gereksinimi ortaya koymaktadır (1, 2, 3, 4). Antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu ile ilgili gelişmeler olmakla birlikte günümüzde kullanılan yöntemler özellikle azol türevi ilaçların minimal inhibitör ve fungisidal konsantrasyonlarının saptanmasında yetersiz kalmaktadır (1, 2). Aynı konudaki çalışmalar sonucunda Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards: (NCCLS)) tarafından maya türleri için standart bir antifungal duyarlılık testi önerilmiştir (2, 5, 6). Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) metodunun kullanıldığı bu yöntemde azol türevleri için minimal inhibitör konsantrasyon ($MİK_{80}$ ve $MİK_{90}$) değerleri, ilaçsız kontrol tüptüne kıyasla üremeyi % 80 ve % 90 oranında inhibe eden en düşük konsantrasyonlar olarak tanımlanmaktadır. NCCLS yöntemine alternatif olarak bulanıklığın kontrole göre 0-4 arasında değerlendirildiği bir mikrodilüsyon metodu da geliştirilmiştir (7, 8). Ancak her iki yöntemde de $MİK$ değerleri görsel olarak saptandığı için çalışan kişiye göre değişebilmektedir (1, 2, 9, 10).

Çalışmamızda, flukonazol inhibitör konsantrasyonlarının MTT boyasının (3-[4,5 - Dimethylthiazol 2-yl] - 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) indirgenmesi ile kantitatif olarak saptanabildiği kolorimetrik bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirdik.

MTT, hücresel dehidrogenazlar tarafından sarı renkten mor renkli formazana dönüştürülmekte ve bu nedenle sitotoksisite değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (11, 12, 13).

Deneylerimizde 54 *Candida* suşunun flukonazol'e duyarlılığı referans makrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik (MTT) mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilerek MTT yöntemi için gerekli şartlar belirlendi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Deneylere kan, idrar, yara, vücut sıvıları ve solunum yolları örneklerinden soyutlanan 54 candida suşu alındı. Bunlar arasından referans olarak seçilen 4 suş (C.albicans # 1, C.albicans # 2 (sin. C.stellatoidea), C.parapsilosis, C.kefyr (sin. C.pseudotropicalis)), kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi için optimal şartların belirlenmesinde kullanıldı. İzole edilen Candida suşlarının türler arasındaki dağılımı; C.albicans (26), C.guilliermondii (6), C.parapsilosis (6), C.kefyr (6), C.catenulata (2), C.krusei (2), C.rugosa (2), C.tropicalis (2), C.famata (1), C.lipolytica (1) şeklindeydi. Candida tiplendirmesinde germ tüp oluşturma, assimilasyon ve fermentasyon testlerinden yararlandı (14, 15).

Antifungal İlaçlar: Deneylerde flukonazol'un 2000 µgr/ml'lik solüsyonu (Pfizer Int. Inc) stok olarak kullanıldı. Stok solüsyondan iki katlı dilüsyonlar hazırlandı. İlaç dilüsyonları, makrodilüsyon testi için 10x son ilaç konsantrasyonu (640-0.6 µgr/ml), mikrodilüsyon testi için 2x son ilaç konsantrasyonu (128-0.12 µgr/ml) olacak şekilde ayarlandı (2, 7, 8).

Duyarlılık Testleri: Her izolatin flukonazol MİK değerleri referans makrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik yöntem ile belirlendi. Duyarlılık testlerinde besiyeri, inokulum hazırlanması, inkübasyon şartları açısından NCCLS'in önerilerine uyuldu (2, 6). Deneylerimizde besiyeri olarak RPMI 1640 (L glutaminli, fenol kırmızısı indikatörü içermeyen) (Sigma, St Louis, Mo) kullanıldı. Besiyerinin pH'sı 0.165 M (35.54 g/litre) morpholinopropanesulfonic asid (MOPS) tamponu ile 7.0'ye ayarlandı.

Maya Süspansiyonlarının Hazırlanması: Her izolatin Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'daki 24 saatlik kültüründen 1 milimetre çaplı 5-7 koloni alınarak 5 mililitre steril serum fizyolojik içerisinde süspansiyonu yapıldı. Tüpin bulanıklığı, spektrofotometrik olarak (Shimadzu Corp.) 530nm'de Mc Farland 0.5 standartının bulanıklığına ayarlandı. Bu süspansiyondan koloni sayımı amacı ile SDA'ya ekim yapıp mililitrede $1-5 \times 10^6$ mikroorganizma içerdiği saptandı. Maya süspansiyonu, makrodilüsyon yöntemi için 1: 1000, mikrodilüsyon yöntemi için 1: 500 oranında seyreltildi (2, 7, 8).

Makrodilüsyon Yöntemi: Son konsantrasyonun 10 katı olacak şekilde hazırlanan flukonazol solüsyonunun iki katlı dilüsyonlarından 0.1 ml., steril, polistren, kapaklı tüpler içerisine konarak üzerine 0.9 ml maya süspansiyonu ($1-5 \times 10^3$ maya hücresi/ml) ilave edildi. İlaç içermeyen mikroorganizma (Candida) kontrol (CK) ve maya süspansiyonu içermeyen besiyeri kontrol tüpleri de hazırlandı. Kolorimetrik yöntemin optimizasyonu deneylerinde 35 °C'de 24 ve 48 saat, diğer deneylerde NCCLS önerilerine uyularak 48 saatlik inkübasyon sonunda MİK_{80 ve 90} değerlendirildi (2, 6).

Makrodilüsyon Yönteminde Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Saptanması: Aynı besiyeri kullanılarak ilaç içermeyen kontrol tüpünden (CK) MİK₈₀ için 1/5 ve MİK₉₀ için 1/10 oranında dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı. Test tüplerinin bulanıklığı standart tüplerle karşılaştırılarak MİK değerleri saptandı.

Mikrodilüsyon Yöntemi: Steril, U tabanlı mikrodilüsyon plaklarına flukonazol solüsyonunun (2x son konsantrasyon) iki katlı dilüsyonlarından 50 µl dağıtıldı. Her ilaç dilüsyonu için 3 çukur kullanıldı. Çukurlara 50 µl maya süspansiyonu ($2-10 \times 10^3$ /ml) eklendi. 35 °C'de inkübe edilerek 24 ve 48. saatlerde MTT deneyi uygulandı. Ayrıca deneylerimizde besiyeri ve Candida kontrol çukurları hazırlandı (7, 8).

MTT Yöntemi ve İnhibitör Konsantrasyonların Saptanması: MTT boyasının 5 µgr/ml'lik stok solüsyonundan 10 µl test ve kontrol çukurlarına ilave edilerek 35 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda formazan kristallerinin eritilmesi için her çukura 0.04 N hidroklorik asit - Isopropyl alkol karışımından 100 µl eklendi. Mikropipet ve çukur içerikleri iyice karıştırıldı. Kristaller eridikten sonra ELISA cihazında (Pasteur Diagnostics) 550 nm dalga boyunda (620 nm referans filtre ile) renk yoğunluğu (optik dansite; OD) değerlendirildi. Ayrıca her çukurdan 100 µl, EIA testleri için kullanılan düz tabanlı mikrotitrasyon plaklarına aktarılarak ölçüm yapıldı. Aşağıdaki formül yardımı ile MTT indeksi (yani relatif üreme) saptandı:

$$\text{MTT indeksi: } \frac{\text{Test çukuru OD} - \text{Besiyeri kontrol çukuru OD (Background)}}{\text{Candida kontrol çukuru OD} - \text{Besiyeri kontrol çukuru OD (Background)}} \times 100$$

MTT indeksi ≤ 10 olan en düşük konsantrasyon "inhibitör konsantrasyon (İK_{90})" olarak, MTT indeksi ≤ 20 olan en düşük konsantrasyon ise İK_{80} olarak değerlendirildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Makrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması amacı ile seçtiğimiz dört referans Candida suşunun MİK değerleri arasındaki uyum oranları saptandı. 2 kattan (1 dilüsyon = 1 tüp veya çukur) farklı olmayan MİK değerleri bu değerlendirmede eşit olarak kabul edildi. Değişiklikler belirtilmedikçe değerlendirmeler için 0.06'dan küçük MİK değerleri 0.06 µgr/ml, 64'ten büyük MİK değerleri ise 64 µgr/ml olarak kabul edildi (6, 7, 8, 9, 10).

B U L G U L A R

Referans suşlarının makrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen minimal inhibitör konsantrasyon değerleri: Kolorimetrik mikrodilüsyon ile elde edilen İK_{80} değerlerinin makrodilüsyon yöntemi ile saptanandan ortalama bir dilüsyon yüksek olduğu görüldü. Her iki yöntemde değerler arasındaki uyum 24-48 saat için eş değer olup uyum yüzdesi % 96.7 idi. Kolorimetrik yöntemle elde edilen minimal inhibitör konsantrasyon 90 değerleri makrodilüsyon ile elde edilenden yüksekti ve bu durum özellikle 48 saatlik inkübasyonda daha belirgindi. 24 saatteki uyum yüzdesinin % 85,9; 48 saatteki uyum yüzdesinin % 68.5 olduğu saptandı (Tablo 1, 2).

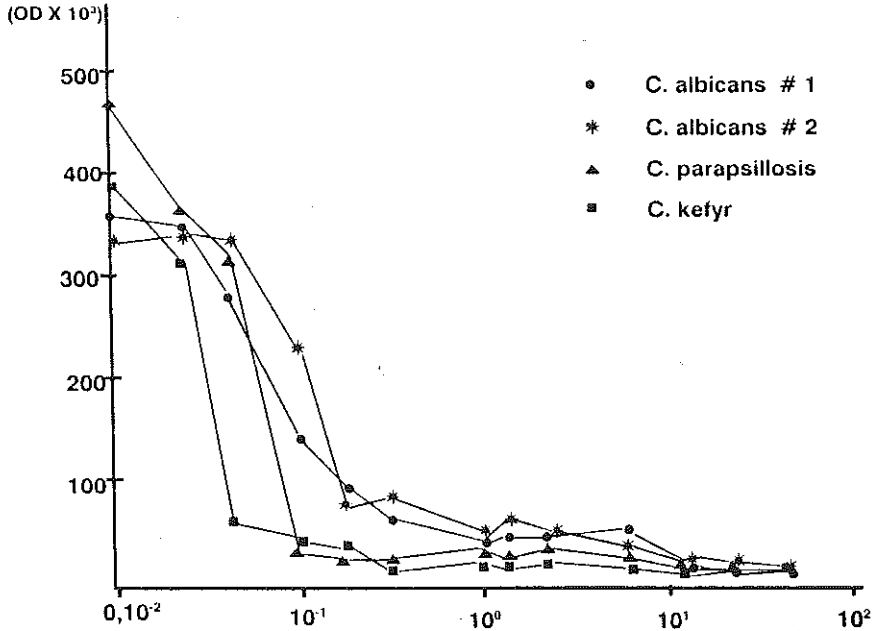
Tablo 1
Referans Candida Suşlarının Makrodilüsyon ve Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemleri ile Elde Edilen Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerleri

Suş	İnkübasyon Süresi (saat)	Tüp Dilüsyon MİK (µgr/ml)		K.Mikrodilüsyon İK (µgr/ml)	
		80	90	80	90
C.albicans # 1	24	0.5 - 2	4 - 8	1 - 2	4 - 8
	48	1 - 2	2 - 8	1 - 2	8 - 16
C.albicans # 2	24	0.25 - 1	1 - 4	0.5 - 1	4 - 8
	48	0.5 - 1	4 - 8	1 - 2	8 - 16
C.parapsilosis	24	0.06 - 0.25	0.25 - 1	0.12 - 0.25	1 - 2
	48	0.06 - 0.12	0.5 - 1	0.12 - 0.25	2 - 4
C.kefyr	24	0.06 - 0.12	0.25 - 0.5	0.06 - 0.12	0.25 - 1
	48	0.06	0.25 - 1	0.06 - 0.12	0.5 - 2

Tablo 2
Candida Suşlarının Flukonazol'e Duyarlılığının Saptanmasında Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemi ile Makrodilüsyon Yönteminin İnkübasyon Saatlerine Göre Uyum Yüzdeleri

Suş	İnkübasyon Süresi (saat)	Uyum Yüzdesi Minimal İnhibitör Konsantrasyon	
		80	90
C.albicans # 1	24	100.0	100.0
	48	93.7	68.3
C.albicans # 2	24	93.7	81.3
	48	93.7	62.5
C.parapsilosis	24	93.7	87.5
	48	100.0	68.3
C.kefyr	24	100.0	75.0
	48	100.0	75.0
Ortalama	24	96.9	85.9
	48	96.9	68.5

Flukonazol varlığında referans suşlarının MTT boyasını indirgemesi ve optik dansitedeki değişimler: Şekil 1'de görüldüğü gibi flukonazol dozu arttıkça indirgenen MTT miktarı, dolayısıyla optik dansite (yani metabolik olarak aktif maya hücre sayısı), azalmaktaydı. Değerlendirmede U tabanlı veya düz tabanlı mikrotitrasyon plakları kullanılmasının relatif optik dansiteyi değiştirmedeği gözlemlendi.



Şekil 1

Değişen dozlarda Flukonazol varlığında Candida suşlarının MTT indirgeme düzeyleri. (24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen ortalama optik dansite (OD) değerleri gösterilmiştir.)

Candida suşlarının flukonazol'e duyarlılığının standart makrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri ile değerlendirilmesi: Ellidört Candida suşunun flukonazol'e duyarlılığı kolorimetrik mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemleri ile değerlendirildi. Candida türlerinin flukonazol varlığındaki inhibitör konsantrasyon değerleri Tablo 3'de gösterildi. Genel olarak kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen inhibitör konsantrasyonlar (IK₈₀) makrodilüsyon yöntemi ile saptananlardan (MİK₈₀) yüksekti. Uyum yüzdesinin % 88.9 olduğu saptandı.

Tablo 3
Kolorimetrik Mikrodilüsyon ve Makrodilüsyon Yöntemleri ile
Candida Türlerinin Flukonazol MİK Değerleri

Suşlar (n = 54)	MİK ₈₀ (µgr/ml)		İK ₈₀ (µgr/ml)	
	Dağılım	% 50*	Dağılım	% 50*
C.albicans (26)	≤ 0.06-64 ≤	0.25	≤ 0.06-64 ≤	0.50
C.parapsilosis (6)	≤ 0.06-1	0.5	0.12-1	1
C.kefyr (6)	≤ 0.06-1	0.25	≤ 0.06-2	0.25
C.guilliermondii (6)	≤ 0.06-16	4	0.25-16	8
C.catenulata (2)	0.12, 0.25	–	0.25, 0.25	–
C.krusei (2)	64 ≤, 16	–	64 ≤, 16	–
C.rugosa	0.5, 1	–	1,1	–
C.tropicalis (2)	≤ 0.06, 4	–	0.12, 16	–
C.famata (1)	≤ 0.06	–	0.25	–
C.lipolytica (1)	≤ 0.06	–	0.12	–

* : Suşların % 50'sinin MİK_{80 ve 90} değerleri

(-) : Değerlendirilmedi

TARTIŞMA

Candida türlerinin antifungal ajanlara duyarlılığının saptanmasında en sık dilüsyon testleri kullanılmaktadır (1, 2). 1992 yılında, NCCLS'in Antifungal Ajanlar Altkomitesi tarafından yapılan ortak çalışmalarda pH, besiyeri, inokulum miktarı, ısı ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin etkileri incelenerek maya türleri için standart bir tüp dilüsyon (makrodilüsyon) yöntemi önerilmiştir (5, 6). Bu metoda alternatif olarak Espinell-İngroff ve arkadaşları (7, 8), bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirmişler ve sonuçların makrodilüsyon yöntemi ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu gelişmelere rağmen özellikle azol grubu ajanların inhibitör konsantrasyonlarının saptanması güç olmaktadır (1, 2, 9). Standart tüp dilüsyon metodunda değerlendirme görsel olarak yapılmakta ve MİK değeri, kontrole göre üremeyi % 80 oranında azaltan en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır (1, 2, 8). Ancak görsel değerlendirme oldukça sübjektiftir ve bu özellikle flukonazol gibi keskin bir MİK sınırı tanımlanamayan antifungallar için problem yaratmaktadır (1, 2, 9, 10). Bu nedenle antifungal duyarlılık testlerinde alternatif metod arayışı sürmektedir. Bu amaçla, turbidometrik, kolorimetrik, fluometrik, radyometrik metodlar tanımlanmıştır (16, 17, 18, 19).

Çalışmamızda, *Candida* türlerinin flukonazol'e duyarlılığının saptanmasında kullanılabilir, sonuçların kantitatif ve kolorimetrik olarak değerlendirilebildiği bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirdik. Bu yöntemde bir tetrazolyum tuzu olan MTT boyasını kullandık. Sarı renkli MTT boyası hücresel dehidrogenazlar ile indirgenerek mor renkli formazana dönüşmektedir. Formazan kristalleri eritildikten sonra oluşan renk yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Bu nedenle canlı hücre sayısının saptanmasının gerekli olduğu sitotoksik aktivite deneylerinde MTT yaygın olarak kullanılmaktadır (11, 12, 13). MTT boyasının maya hücreleri tarafından indirgendiği böylelikle canlı maya hücre sayısının saptanmasında da uygulanabileceği, araştırmacılarca gösterilmiştir (20).

Tellier ve arkadaşları (19), suda eriyebilen bir başka tetrazolyum tuzunun (XTT; 2,3 bis (2 methoxy 4-nitro-5 sulfopheny 1)-5-[(phenylamino) carbonyl] 2H-tetrazolium hydroxide) indirgenmesine dayanan bir antifungal duyarlılık testi tarif etmişlerdir. Ancak XTT tek başına kullanıldığında maya hücreleri tarafından ölçülebilir düzeyde indirgenememektedir. Bu nedenle, boyanın yanı sıra hücresel diyaforazların aktivitesini arttıran, elektron bağlayan ajanlar (menadione ve phenazine methyl sulfate gibi) kullanılması gerekmektedir. Ayrıca yöntem bir makrodilüsyon tekniği olduğu için, hazırlık aşamasındaki güçlükler, fazla malzeme kullanımı, değerlendirme yapılmadan önce santrifügasyon işleminin gerekmesi gibi dezavantajlara sahiptir.

Mikrodilüsyon yönteminin hız, otomatizasyon, az malzeme kullanımı, aynı anda çok sayıda suşun değerlendirilebilmesi gibi özellikleri bilinmektedir. Bu nedenle, NCCLS makrodilüsyon yöntemi gibi standart bir mikrodilüsyon tekniği geliştirmeye yönelik araştırmalar hız kazanmıştır (7, 8). Mikrodilüsyon tekniğinde çukurlardaki bulanıklık görsel olarak 0'dan 4'e kadar skorlama işlemi ile değerlendirilmiş ve makrodilüsyon yöntemine eşdeğer olarak bulunmuştur (1, 2, 7, 8). Çalışmamızda kullandığımız yöntem ise, hem mikrodilüsyon tekniklerinin avantajlarını taşımakta hem de optik dansite yoğunluğunun saptanması ile metabolik olarak aktif hücre sayısını verebilmektedir. Farklı türlerden 54 *Candida* suşu kullanarak yaptığımız deneylerde, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen inhibitör konsantrasyon değerleri, makrodilüsyon ile bulunanlardan ortalama bir dilüsyon yüksektir. Bununla birlikte, iki yöntem arasındaki uyum % 90'a yakındır (Tablo 1, 2, 3). Deneye alınan *Candida* suşları içerisinde *C.guilliermondii* ve *C.krusei* suşlarının flukonazol $MİK_{30}$ değerlerinin *C.albicans*'a göre yüksek olduğu dikkati çekmektedir (Tablo 3). Nitekim *C.krusei* için benzer sonuçlar bildirilmiştir (1, 2, 21, 22, 23).

MTT suda erimeyen kristaller oluşturmaktadır. Bu nedenle viabilite deneylerinde oluşan formazan miktarının değerlendirilebilmesi için, santrifügasyon, süpernatanın atılması, organik bir çözücü veya sonikasyon gibi yöntemlerle eritme işlemleri uygulanması gerektiği ve bunun teknik güçlükleri arttırdığı öne sürülmektedir (19). Ancak yöntemimizde çukurlardaki toplam hacim 100 µl olduğu için bir santrifügasyon işlemine gerek olmaksızın MTT boyası ve 4 saatlik inkübasyon sonunda isopropyl alkol eklenerek değerlendirme

yapılabilmektedir. Ayrıca sonuçların ELİSA cihazı gibi tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında bulunan temel bir sistem ile değerlendirilmesi de yöntemimizin avantajlarındanır.

Sonuç olarak mikrodilüsyon tekniklerinin hız, hesaplılık, otomatizasyon gibi özelliklerini taşıyan bu yöntem standart bir metod arayışının sürdüğü antifungal duyarlılık testlerinde objektif ve kantitatif bir değerlendirme yapılması amacı ile kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN: Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*, 1993, 6: 367-381.
2. Galgiani JN: Susceptibility testing of fungi; current status of the standartization process. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1993, 37: 2517-2521.
3. Guiot HFL, Fibbe WE, Van Wout JW: Risk factors for fungal infection in patients with malignant hematologic disorders implications for empirical therapy and prophylaxis. *Clin Infect Dis*, 1994, 18: 525-32.
4. Schwartz RS, Mackintosh FR, Schrier SL, Greenberg PL. Multivariate analysis of factors associated with invasive fungal disease during remission induction therapy for acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 1984, 53: 411-9.
5. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett BA, et al: Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol*, 1990, 34: 1618-1654.
6. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, et al: Multicenter evaluation of broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37: 39-45.
7. Espinel-Ingroff A, Kerkering TM, Goldson PR, Shadomy S: Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 1089-1094.
8. Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, et al: Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:3138-3145.
9. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Müller J, et al: Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36: 1805-1809.
10. Pfaller MA, Grant C, Mortlant V, Rhine-Chalberg J: Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 506-509.
11. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 1987, 47: 936-942.
12. Iselt M, Holtei W, Hilgard P: The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Arzneimittel Forschung/Drug Res.*, 1989, 39: 747-749.
13. Gebran SJ, Newton CA, Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H: A rapid colorimetric assay for evaluating *Legionella pneumophila* growth in macrophages in vitro. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 127-130.
14. Elnahi H: *Kandida*'ların tiplendirmesinde rutin testlerin uygulaması ve salgısal asid proteinaz enziminin saptanması. Uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Ankara, 1988.
15. Warren NG, Shadomy HJ: Yeasts of medical importance. p: 617-629. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann HD, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 5 th edition, 1991, American Society for Microbiology, Washington DC.
16. Blanco MT, Perex-Giraldo C, Blanco J, Moran FJ, et al: Invitro studies of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by the turbidimetric method. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 898-901.

17. Odds FC: Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by relative growth measurement at single concentrations of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36:1727-1737.
18. Green L, Petersen B, Steimel L, Haerber P, Current W: Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 1088-1091.
19. Tellier R, Krajden M, Grigoriew GA, Campbell I: Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 1619-1625.
20. Levitz SM, Diamond RD: A rapid colorimetric assay on fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*, 1985, 152: 938-945.
21. Akova M, Akalin HE, Uzun Ö, Gür D: Emergence of *Candida krusei* infections after therapy of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991, 10: 598-599.
22. Tam JY, Blume KG, Prober CG: Prophylactic fluconazole and *Candida krusei* infections. *N Engl J Med*, 1992, 326: 891.
23. Hamilton CW, Romankiewicz JA: Susceptibility testing: a practical review. p:7-18. In: Kobayashi GS, Odds FC (eds) *Current Perspectives on Antifungal Susceptibility Testing: Focus on Fluconazole*, 1st ed 1988, Scientific Therapeutics Information Inc for Pfizer Int, Inc, New Jersey.