

# Klinik Örneklerden İzole Edilen Filamentöz Mantarların İki Farklı Yöntemle Tanımlanması ve Duyarlılık Sonuçları\*

## Identification of Filamentous Fungi Isolated from Clinical Samples by Two Different Methods and Their Susceptibility Results

Şahin DİREKEL, Feza OTAĞ, Gönül ASLAN, Mahmut ÜLGER, Gürol EMEKDAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.  
Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

\* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi [proje no: BAP-SBE TM (ŞD) 2008-10 DR] tarafından desteklenmiş ve XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-11 Kasım 2010 Girne, KKTC)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 04.05.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.11.2011

### ÖZET

Küf mantarları doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. *Aspergillus* başta olmak üzere *Fusarium*, *Scedosporium* ve *Zygomycetes* türleriyle oluşan invaziv fungal enfeksiyonlar özellikle immün sistem yetmezliği bulunan hastalarda morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin kritik ünitelerinde yatan hastalardan, Nisan 2008-Ocak 2010 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen toplam 6742 klinik örnek dahil edilmiştir. Örneklerden izole edilen mantarlar klasik mikolojik yöntemler ve polimeraz zincir reaksiyonu bazlı DNA dizi analizi ile tanımlanmış; antifungal duyarlılıkları ise amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve posakonazole E-test ile, vorikonazol ve flukonazole disk difüzyon testiyle belirlenmiştir. Çalışmamızda, 32 hastaya (13'ü kadın, 19'u erkek; yaş aralığı 7 ay-77 yıl, yaş ortalaması: 46.6 yıl) ait 71 (%1.05) örnekten (13 balgam, 4 yara, 4 periton diyaliz sıvısı, 3 dış kulak yolu akıntısı, 3 apse ve birer beyin omurilik sıvısı, kan, doku biyopsi örneği, burun sürüntüsü, konjunktiva sürüntüsü örneği) filamentöz mantar izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastaların %62.3'ünde bir veya birkaç risk faktörü (kronik böbrek yetmezliği 8, kronik obstrüktif akciğer hastalığı 6, kanser 6, diabetes mellitus 5, periferik damar hastalığı 5) mevcuttur. Klasik yöntemle izolatların altısı *Aspergillus niger*, altısı *Aspergillus flavus*, beşi *Aspergillus fumigatus*, dördü *Aspergillus terreus*, beşi *Fusarium* spp., ikisi *Bipolaris* spp. ve birer adedi *Acremonium* spp., *Aurebasidium* spp., *Mucor* spp. ve *Scedosporium* spp. olarak ta-

İletişim (Correspondence): Dr. Şahin Direkel, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye. Tel (Phone): +90 505 911 2595, E-posta (E-mail): sdirekel@yahoo.com

nımlanmıştır. DNA dizi analizi sonuçlarına göre sadece üç filamentöz mantarın tanısında farklılık saptanmıştır. Her iki yöntemle *Aspergillus* suşlarının tüm tür düzeyinde; diğer mantarlar ise konvansiyonel yöntemle cins, DNA dizi analiziyle tür düzeyinde tanımlanmıştır. E-test ile flukonazol minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, *Scedosporium* spp. hariç, bütün suşlarda > 256 mg/L, vorikonazol MİK değeri tüm *Aspergillus* türlerinde < 0.38 mg/L, kaspofungin MİK değeri *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* ve *Bipolaris* suşlarında > 32 mg/L, *Aspergillus* türlerinde ≤ 0.006-0.125 mg/L olarak saptanmıştır. Posakonazolün MİK değeri üç suşta (*Fusarium equiseti*, *Cylindrocarpon lichenicola* ve *Rhizopus oryzae*) > 32 mg/L olarak bulunurken, diğer suşlarda < 1.5 mg/L olarak tespit edilmiştir. Amfoterisin B MİK değeri *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* ve tüm *A.terreus* suşlarında > 32 mg/L iken, diğer suşlarda < 2 mg/L olarak bulunmuştur. E-test ve disk difüzyon antifungal sonuçlarının birbiriyle ve yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, özellikle riskli hastalardan sıklıkla izole edilen *Aspergillus* ve *Fusarium* gibi filamentöz mantarların tanısının klasik yöntemle doğru olarak ve kolayca yapılabildiği kanısına varılmış; invaziv fungal enfeksiyonların giderek arttığı günümüzde, özellikle kritik hastaların klinik örneklerinde filamentöz mantarların araştırılmasının mortalite riskini azaltması bakımından önemli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Filamentöz mantar; *Aspergillus*; *Fusarium*; DNA dizi analizi; antifungal duyarlılık.

## ABSTRACT

Molds are widely distributed in nature. *Aspergillus* spp. represent the most frequently observed causative agents, however less frequent pathogens *Fusarium*, *Scedosporium* and *Zygomycetes* have also been considered the most important causes of morbidity and mortality in profoundly immunosuppressed hosts. The aims of this study were to identify filamentous fungi isolated from clinical specimens by conventional and molecular methods, and to detect their antifungal susceptibilities. A total of 6742 clinical specimens obtained from hospitalized patients at critical units of Mersin University Medical Faculty Hospital and sent to our laboratory between April 2008-January 2010 were included in the study. The isolates were identified by classical mycological methods and polymerase chain reaction-based DNA sequencing. Susceptibilities to fluconazole and voriconazole were tested by disk diffusion method and to fluconazole, voriconazole, amfoterisin B, caspofungin and posaconazole by E-test. Filamentous fungi were isolated from 71 (1.05%) samples (13 sputum, 4 wound, 4 peritoneal fluid, 3 external ear discharge, 3 abscess and one of each cerebrospinal fluid, blood, tissue biopsy, nasal swab and conjunctival swab) which belonged to 32 patients (13 female, 19 male; age range 7 months-77 years, mean age: 46.6 years). Of the patients 62.3% presented one or more risk factors such as chronic renal failure (n= 8), chronic obstructive lung disease (n= 6), malignancy (n= 6), diabetes mellitus (n= 5) and peripheral vascular disease (n= 5). Of the isolates six were identified as *Aspergillus niger*, six as *Aspergillus flavus*, five as *Aspergillus fumigatus*, four as *Aspergillus terreus*, five as *Fusarium* spp., two as *Bipolaris* spp., and one of each as *Acremonium* spp., *Aurebasidium* spp., *Mucor* spp., and *Scedosporium* spp. By conventional methods. Three isolates exhibited different identities by DNA sequencing. All *Aspergillus* isolates were correctly identified at species level by both methods, Other fungi were identified at genus level by conventional methods and at species level by DNA sequencing. Fluconazole minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined as > 256 mg/L in all strains, except *Scedosporium*; voriconazole MIC values were < 0.38 mg/L in all *Aspergillus* spp. Caspofungin MIC values were > 32 mg/L for *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* and *Bipolaris* strains and ≤ 0.006-0.125 mg/L in all *Aspergillus* isolates, In three strains (*Fusarium equiseti*, *Cylindrocarpon lichenicola* and *Rhizopus oryzae*) posaconazole minimum inhibitory concentration (MIC) values were > 32 mg/L, however it was < 1.5 mg/L, for the other strains. Amphotericin B MIC values were > 32 mg/L for *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus* and all *A.terreus* strains and < 2 mg/L for the others. E-test and disk diffusion test results were compatible with each other for all the antifungal agents tested. In conclusion, the identification of filamentous fungi such as *Aspergillus* and *Fusarium* spp. is easily and reliably achieved by conventional methods. Since the rate of invasive fungal infections is increasing currently, filamentous molds should be searched especially in the clinical specimens of immunocompromised patients for accurate and prompt diagnosis of such infections and to decrease the related mortality risk.

**Key words:** Filamentous fungi; *Aspergillus*; *Fusarium*; DNA sequencing; antifungal susceptibility.

## GİRİŞ

Doğada yaygın olarak bulunan filamentöz mantarlar, özellikle belirli risk faktörlerine sahip hastalarda ciddi fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir<sup>1</sup>. Örneğin; immün sistemi baskılanmış hastalarda, *Aspergillus fumigatus* başta olmak üzere *Aspergillus* türleriyle oluşan invaziv enfeksiyonların mortalitesi %58-99 gibi yüksek oranlara ulaşmaktadır<sup>2,3</sup>. Ancak son yıllarda *Aspergillus* harici filamentöz mantarların insidansında da bir artış saptanmakta olup, büyük çoğunluğu hematolojik maligniteli hastalar, altta yatan hastalığı olanlar, transplant alıcıları ve kortikosteroid ya da immünsüpresif ilaç kullanan hastalarda olmak üzere *Fusarium*, *Bipolaris*, *Scedosporium* ve *Mucorales* grubu gibi mantarlarla oluşan, mortalite oranı yüksek invaziv enfeksiyonlara rastlanmaktadır<sup>4-11</sup>. İnvaziv mantar enfeksiyonlarında erken tanı, uygun tedavinin bir an önce başlanabilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu enfeksiyonlar çok hızlı ilerlediği ve tanımlanmasında güçlükler yaşandığı için, kesin tanı çoğunlukla otopsi sırasında konmaktadır<sup>12</sup>. Buna karşın aspergillozun tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve galaktomannan tespiti gibi hızlı yöntemlerin kullanılması, gecikmiş tanıdan kaynaklanan ölüm oranlarını düşürmektedir<sup>13</sup>.

Günümüzde mantar enfeksiyonlarının tedavisi büyük bir sorun oluşturmaktadır. Anti-fungal ajanların kullanımı, toksisitesi veya uygun olmayan farmakokinetik özelliklerine bağlı olarak çeşitli ilaçlarla etkileşimleri nedeniyle oldukça kısıtlıdır. Ayrıca, kullanımda olan antifungal ilaçlara karşı görülen direnç de giderek artış göstermektedir<sup>14,15</sup>. Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen filamentöz mantarların klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinde Nisan 2008-Ocak 2010 tarihleri arasında kritik ünitelerde (yoğun bakım üniteleri, reanimasyon, diyaliz üniteleri, transplantasyon, onkoloji) ve diğer servislerde (göğüs hastalıkları, nefroloji, hematoloji, pediatri, enfeksiyon hastalıkları, kardiyoloji, dermatoloji ve tüm cerrahi servisler) yatan ve uzun süreli tedavi gören hastalardan tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı laboratuvarına gönderilen 6742 klinik örnek çalışma kapsamına alındı.

Örneklerin ekimi için %5 kanlı agar, EMB (Eosin-methylene-blue) agar, çikolata agar ve Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerleri kullanıldı. Bakteriyojik açıdan değerlendirildikten sonra küf üremesinin takibi için petripler 25°C'de en az yedi gün daha inkübe edildi. Üreyen küf kolonileri, makroskobik (koloni büyüklüğü ve rengi, yüzey görünümü, pigment oluşumu vb.) ve laktofenol pamuk mavisi (LFPM) ile boyanarak mikroskobik (hif ve spor yapıları, konidyumların dizilişi vb.) özelliklerine göre değerlendirildi ve klasik yöntemlerle tanımlandı<sup>16,17</sup>.

Mikroskobik değerlendirme sonuçlarına göre, her hastadan birer suşun DNA dizi analizi için çalışılması uygun bulundu. Patates dekstroz agarda (PDA) saf olarak üretilen kolonilerin hif ve sporları DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA ekstraksiyonları, dondurma-kaynatma, sıvı nitrojen, Qiamp DNA Mini kit (Qiagen) gibi farklı yöntemlerle ve modifi-

ye edilerek kullanılan Makimura ve arkadaşlarının<sup>18</sup> yöntemiyle gerçekleştirildi. DNA miktarları spektrofotometre (ND 1000 UV-Vis, NanoDrop Technologies, ABD) ile ölçüldü. DNA dizilerinin çoğaltılması için daha önce tanımlanmış olan protokole göre PCR karışımı hazırlanarak termal döngü cihazına (Eppendorf Mastercycler, Almanya) yerleştirilerek amplifiye edildi.

PCR karışımı; toplam 25 µl olacak şekilde, örnek başına 3 µl kalıp DNA, 2.5 µl PCR tamponu (10X, Vivantis), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Vivantis), 0.3 µl dNTP karışımı (10 mM, Vivantis), 0.3 µl ITS (internal transcribed spacer)-1 primeri (100 pmol) (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 0.3 µl ITS-4 primeri (100 pmol) (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0.2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl, Vivantis) ve 16.4 µl steril nükleaz içermeyen distile su kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon şartları; 94°C'de 5 dakikalık 1 döngü başlangıç denatürasyonunu takiben, 94°C'de 20 saniye denatürasyon, 58°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 1.5 dakika uzama olmak üzere toplam 40 döngü ve 72°C'de 7 dakikalık 1 döngü son uzama şeklinde uygulandı. PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak mantarlara özgü DNA bantları (500-600 baz çifti) ultraviyole ışık altında incelendi.

Klinik suşların DNA dizi analizleri, elde edilen PCR ürünleri ve primerleri kullanılarak özel bir laboratuvarında (RefGen) ABI 3100 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Dizi analizi verileri "National Center for Biotechnology Information (Bethesda, ABD)" BLAST sistemi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak analiz edildi ve suşlar tür düzeyinde tanımlandı.

Suşların antifungal duyarlılıkları, amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve posakonazol için E-test ile, vorikonazol ve flukonazol için disk difüzyon testi ile GM-MHA besiyeri (%2 glukoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton Agar) kullanılarak araştırıldı. PDA'da üretilen suşların spor süspansiyonları 10 ml steril serum fizyolojik içerisinde 1 x 10<sup>6</sup> spor/ml olacak şekilde hazırlandı. GM-MHA besiyeri yüzeyine 5'er ml'lik hacimlerde yayılan spor süspansiyonlarının fazlası beş dakika bekletildikten sonra steril pipetle toplanarak atıldı. Besiyerine inokülasyon için 15 dakika bekledikten sonra E-test stripleri her petri için bir tane olacak şekilde yerleştirildi. Antifungal diskler için tek petri kullanıldı. 35°C'de inkübe edilen petriler, 24 ve 48 saat sonra değerlendirilerek E-test MİK değerleri ve disk difüzyon zon çapları belirlendi.

Standart kontrol suşları olarak *Aspergillus niger* (RSHMB 04017) ve *A.fumigatus* (RSHMB 04005) kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda, 22 aylık dönemde 32 hastaya ait 71 (%1.05) örnekten filamentöz mantar izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastaların 13'ü kadın 19'u erkek olup, beşi pediatri hastası olmak üzere yaş aralığı 7 ay-77 yıl arasında (ortalama: 46.6 yıl) değişmektedir. Hastaların sekizinde kronik böbrek yetmezliği, altısında kronik obstrüktif akciğer hastalığı, altısında kanser, beşinde diabetes mellitus ve beşinde periferik damar hastalığı

mevcut olup, küf mantarı izole edilen hastaların %62.3'ünde risk faktörü varlığı saptanmıştır.

Hiçbir hastada birden fazla türe ait küf üremesi olmamıştır. Her hastadan birer suş olmak üzere 13 balgam, 4 yara, 4 periton diyaliz sıvısı, 3 dış kulak yolu akıntısı, 3 apse ve birer beyin omurilik sıvısı (BOS), burun sürüntüsü, doku biyopsi örneği, periferik kan ve konjunktiva sürüntüsünden izole edilen suşların klasik yöntemle altısı *A.niger* (%18.7), altısı *Aspergillus flavus* (%18.7), beşi *Aspergillus fumigatus* (%15.6), dördü *Aspergillus terreus* (%12.5) olmak üzere tür düzeyinde, beşi *Fusarium* (%15.6), ikisi *Bipolaris* (%6.2) ve birer *Scedosporium* (%3.1), *Acremonium* (%3.1), *Mucor* (%3.1), *Aureobasidium* (%3.1) olmak üzere cins düzeyinde tanımlanmıştır (Tablo I).

Dondurma-kaynatma yöntemiyle *Fusarium*, sıvı nitrojen yöntemiyle *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Scedosporium*, hazır DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, ABD) ile *A.fumigatus* ve *A.flavus* türleri ve modifiye yöntemle<sup>18</sup> bütün türlerin DNA ekstraksiyonları yapılabilmektedir. PCR ürünlerinin görüntüleri Resim 1'de verilmiş; ancak özellikle bazı *Aspergillus* türlerinde (*A.niger*, *A.flavus*, *A.fumigatus*) çok zayıf bantlar elde edildiği için tekrar ikinci bir DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (Resim 2).

Klasik yöntemle elde edilen sonuçlardan farklı olarak DNA dizi analizi ile *Fusarium*, *Bipolaris*, *Scedosporium* ve *Aureobasidium* suşları tür düzeyinde tanımlanmıştır. *Acremonium*, *Mucor* ve *Fusarium* olarak cins düzeyinde tanımladığımız suşlar, DNA dizi analizi ile sırasıyla *Lecythophora hofmannii*, *Rhizopus oryzae* ve *Cylindrocarpon lichenicola* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır.

*Aspergillus* spp. kronik böbrek yetmezliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kanser, diabetes mellitus ve periferik damar hastalığı olan hastalardan; *Fusarium* spp. kronik böbrek yetmezliği, diabetes mellitus ve kanserli hastalardan; *Bipolaris* spp. kronik böbrek yetmezliği ve diabetes mellituslu hastalardan; *Lecythophora* kronik böbrek yetmezliği ve diabetes mellitusu olan bir hastadan; *Rhizopus* pansitopenisi olan hastadan; *Scedosporium* yabancı cisim batması olan hastadan ve *Aureobasidium* penil protez implantasyonu yapılan hastadan izole edilmiştir. *Aspergillus* üreyen 21 hastadan altısı invaziv pulmoner aspergilloz ve biri meningoel aspergilloz tanısı almıştır. Hastaların 7 (%21.8)'si filamentöz mantar izolasyonundan kısa bir süre sonra hayatını kaybetmiştir.

İzolatların E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle saptanan antifungal duyarlılık sonuçları ayrıntılı olarak Tablo II'de görülmektedir.

## TARTIŞMA

Son yıllarda filamentöz mantarların neden olduğu enfeksiyonların sayısında yaygın bir artış olduğu bildirilmiştir<sup>19,20</sup>. Birçok çalışmada hastaların klinik örneklerinden %69.8-85 oranlarıyla en sık *Aspergillus* cinsi küf mantarları izole edilmektedir<sup>3,8,13,21,22</sup>. Bizim çalışmamızda da ilk sırayı %62.5 izolasyon oranıyla *Aspergillus* spp. almıştır. Casto'n ve arkadaşları<sup>22</sup> retrospektif çalışmalarında 1994-2004 yılları arasındaki dönemde yatarak ya da ayakta tedavi gören 332 hastanın 505 solunum yolu örneğinden sırasıyla *Aspergillus* (%80.5), *Penicillium* (%7.9), *Fusarium* (%2.1), *Scedosporium* (%5.3), *Alternaria* (%1.4),

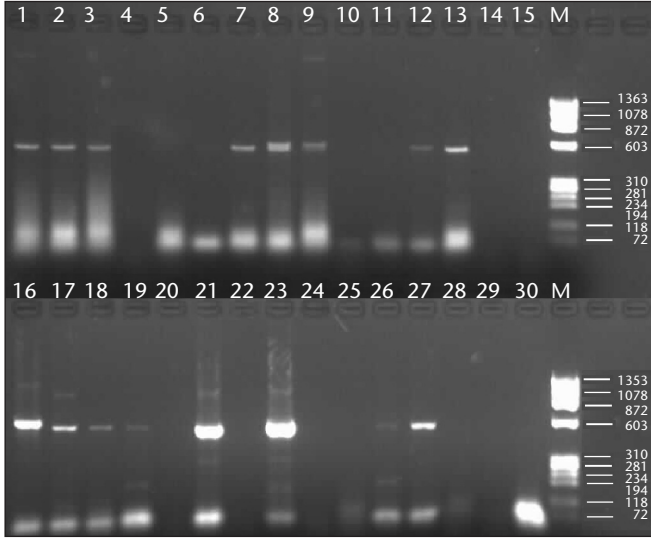
Tablo 1. Filamentöz Mantar Üreyen Hastaların Demografik Özellikleri ve Tanımlama Verileri

Hasta no	Yaş	Klinik örnek	Üreme/kültür	Servis	Klasik yöntem	DNA dizi analizi	BLAST no
1	12	PDS	13/19	Pediyatrik nefroloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ376117.1
2	52	KS	2/4	Göz hastalıkları	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium solani</i>	AF130141.1
3	67	Yara	3/4	Dermatoloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Cylindrocarpon lichenicola</i>	AF133843.1
4	54	Doku	1/1	Plastik cerrahi	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	HM130707.1
5	64	Apse	1/1	Göz hastalıkları	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>Scedosporium apiospermum</i>	FJ345358.1
6	21	Balgam	1/2	Nefroloji	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Bipolaris spicifera</i>	GU596488.1
7	57	Balgam	1/1	Göğüs hastalıkları	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i>	EF625687.1
8	10 ay	BOS	1/2	Pediyatrik cerrahi	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	GU594752.1
9	8	PDS	2/4	Pediyatri	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i>	GU594738.1
10	16	PDS	1/15	Pediyatrik nefroloji	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Bipolaris spicifera</i>	GU183125.1
11	48	Balgam	1/1	Göğüs hastalıkları	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>A. terreus</i>	FN811183.1
12	59	PDS	6/6	Nefroloji	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Lecytophora hoffmannii</i>	AB231012.1
13	67	Balgam	2/3	Hematoloji	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	GU594756.1
14	77	Balgam	4/5	Nefroloji	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	GU594749.1
15	53	Balgam	5/6	Göğüs hastalıkları	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	GU594757.1
16	60	Kan	1/8	Nefroloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium equiseti</i>	HM062514.1
17	52	Balgam	1/1	Enfeksiyon hastalıkları	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	DQ198161.1
18	52	DKA	2/3	KBB	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	EF625687.1
19	25	BS	5/7	KBB	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	EU645689.1
20	69	Balgam	2/3	Göğüs cerrahisi	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	EF625687.1
21	40	Balgam	2/2	Hematoloji	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	DQ198161.1
22	50	Apse	2/2	Plastik cerrahi	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	GU594778.1
23	7 ay	Apse	1/2	Pediyatri	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus oryzae</i>	GU594768.1
24	48	Balgam	1/2	Endokrinoloji	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	GU594740.1
25	54	Balgam	1/1	Göğüs hastalıkları	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	DQ198161.1

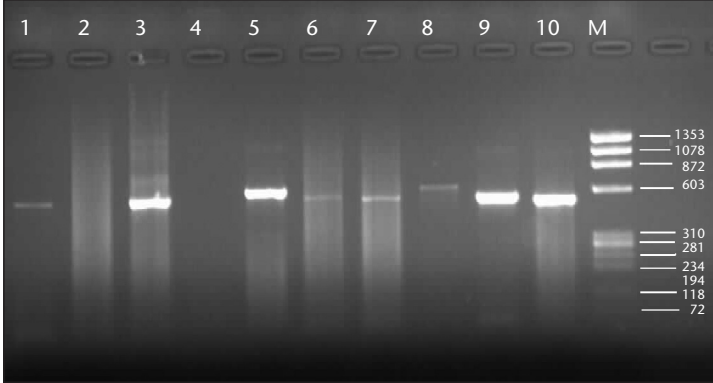
Tablo 1. Filamentöz Mantar Üreyen Hastaların Demografik Özellikleri ve Tanımlama Verileri (Devamı)

Hasta no	Yaş	Klinik örnek	Üreme/kültür	Servis	Klasik yöntem	DNA dizi analizi	BLAST no
26	39	Yara	1/1	Üroloji	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AF121283.1
27	57	Balgam	2/3	Hematoloji	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	DQ198161.1
28	69	DKA	1/2	KBB	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	FJ537110.1
29	49	DKA	1/1	KBB	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	EF625687.1
30	76	Balgam	2/2	Göğüs hastalıkları	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	GU594757.1
31	71	ABY	1/1	Nefroloji	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	EF625687.1
32	26	EPY	1/2	Plastik cerrahi	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	EF592171.1

PDS: Periton diyaliz sıvısı; KS: Konjunktival sürüntü; BOS: Beyin omurilik sıvısı, DKA: Dış kulak yolu akıntısı; BS: Burun sürüntüsü; ABY: Ayak başparmak yarası; EPY: El ikinci parmak yarası; KBB: Kulak Burun Boğaz.



**Resim 1.** Suşların ITS1-ITS4 primerleriyle amplifikasyon sonrası elektroforez görüntüsü [Kolon 10, 11, 18, 24, 29: *A.flavus*; Kolon 4, 6, 14, 20, 28: *A.niger*; Kolon 5, 9, 22, 26: *A.fumigatus*; Kolon 7, 19, 25: *A.terreus*; Kolon 1, 2, 3, 17, 27: *Fusarium spp.*; Kolon 21, 23: *Bipolaris spp.*; Kolon 16: *Scedosporidium spp.*; Kolon 8: *Ae-robasidium spp.*; Kolon 12: *Mucor spp.*; Kolon 13: *Acremonium spp.*; Kolon 15, 30: Negatif kontrol; M: Moleküler ağırlık standardı ( $\phi$ X174 DNA/BsuRI [HaeIII] Marker, Fermentas)].



**Resim 2.** *Aspergillus* suşlarının ITS1-ITS4 primerleriyle ikinci amplifikasyon sonrası elektroforez görüntüsü [Kolon 1(4), 2(6), 3(14), 4(20): *A.niger*; Kolon 5(10), 6(11), 7(24), 8(29): *A.flavus*; Kolon 9(5), 10(22): *A.fumi-gatus*; M: Moleküler ağırlık standardı ( $\phi$ X174 DNA/BsuRI [HaeIII] Marker, Fermentas)] (parantez içerisindeki kolon numaraları Resim 1'de zayıf bant veren *Aspergillus* suşlarına aittir).

*Paecilomyces* (%0.8), *Cladosporium* (%0.8), *Mucor* (%0.6), *Rhizomucor* (%0.2) ve *Tricho-derma* (%0.2) türlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, incelenen top-lam 6742 klinik örnekten 32 hastaya ait 71 (%1.05) örnekte filamentöz mantar üremiş ve bunların klasik yöntemle tanımlanması sonunda sırasıyla *A.niger* (%18.7), *A.flavus* (%18.7), *A.fumigatus* (%15.6), *A.terreus* (%12.5), *Fusarium spp.* (%15.6), *Bipolaris spp.* (%6.2) ve %3.1 oranında olmak üzere *Aureobasidium spp.*, *Acremonium spp.*, *Mucor spp.*



Tablo II. Suşların E-test ve Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Hasta no (µg)	İzolat	E-test (mg/L) 24/48 saat			DD (mm) 24/48 saat			
		VOR	FLU	AMB	CAS	POS	VOR (1 µg)	FLU (25)
1	<i>F.oxysporum</i>	0.50/0.50	> 256/> 256	> 32/> 32	> 32/> 32	1/1.5	< 6/< 6	< 6/< 6
2	<i>F.solani</i>	> 32/> 32	> 256/> 256	> 32/> 32	> 32/> 32	1/1.5	< 6/< 6	< 6/< 6
3	<i>C.lichenicola</i>	> 32/> 32	> 256/> 256	0.50/0.50	> 32/> 32	> 32/> 32	< 6/< 6	< 6/< 6
4	<i>F.brachyibbosum</i>	> 32/> 32	> 256/> 256	> 32/> 32	> 32/> 32	1/1.5	< 6/< 6	< 6/< 6
5	<i>S.apiospermum</i>	0.25/0.38	6/6	> 32/> 32	> 32/> 32	0.94/0.125	25/23	22/20
6	<i>B.spicifera</i>	0.125/0.125	> 256/> 256	0.064/0.064	> 32/> 32	0.50/0.50	17/16	< 6/< 6
7	<i>A.niger</i>	0.19/0.25	> 256/> 256	0.19/0.38	0.19/0.25	0.25/0.38	20/15	< 6/< 6
8	<i>A.fumigatus</i>	0.064/0.064	> 256/> 256	0.25/0.25	0.094/0.19	0.50/0.75	27/26	< 6/< 6
9	<i>A.flavus</i>	0.25/0.50	> 256/> 256	1.5/2	0.064/0.064	0.25/0.25	21/17	< 6/< 6
10	<i>B.spicifera</i>	0.125/0.125	> 256/> 256	0.064/0.064	> 32/> 32	0.50/0.50	17/16	< 6/< 6
11	<i>A.terreus</i>	0.125/0.125	> 256/> 256	> 32/> 32	0.094/0.125	0.19/0.19	23/22	< 6/< 6
12	<i>L.hoffmannii</i>	6/4	> 256/> 256	0.38/0.38	1.5/2	0.50/0.50	< 6/< 6	< 6/< 6
13	<i>A.fumigatus</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	0.094/0.19	0.094/0.094	0.125/0.125	18/14	< 6/< 6
14	<i>A.fumigatus</i>	0.19/0.19	> 256/> 256	0.125/0.125	0.094/0.125	0.25/0.25	20/18	< 6/< 6
15	<i>A.fumigatus</i>	0.25/0.25	> 256/> 256	0.25/0.50	0.125/0.125	0.19/0.25	20/18	< 6/< 6
16	<i>F.equiseti</i>	> 32/> 32	> 256/> 256	> 32/> 32	> 32/> 32	> 32/> 32	< 6/< 6	< 6/< 6
17	<i>A.flavus</i>	0.50/0.50	> 256/> 256	0.50/1	0.125/0.19	0.25/0.38	20/14	< 6/< 6
18	<i>A.niger</i>	0.125/0.19	> 256/> 256	0.25/0.50	0.012/0.012	0.25/0.38	19/13	< 6/< 6
19	<i>A.terreus</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	> 32/> 32	0.032/0.047	0.032/0.064	19/16	< 6/< 6
20	<i>A.niger</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	0.064/0.25	0.094/0.125	0.016/0.032	17/15	< 6/< 6
21	<i>A.flavus</i>	0.19/0.19	> 256/> 256	1.5/3	0.032/0.047	0.094/0.25	24/22	< 6/< 6
22	<i>A.terreus</i>	0.38/0.50	> 256/> 256	> 32/> 32	0.023/0.032	0.064/0.125	16/14	< 6/< 6
23	<i>R.oryzae</i>	> 32/> 32	> 256/> 256	> 32/> 32	> 32/> 32	> 32/> 32	< 6/< 6	< 6/< 6
24	<i>A.flavus</i>	0.19/0.25	> 256/> 256	0.50/1	0.125/0.19	0.19/0.19	22/19	< 6/< 6
25	<i>A.flavus</i>	0.19/0.25	> 256/> 256	2/3	1/1.5	0.38/0.50	15/12	< 6/< 6

**Tablo II. Suşların E-test ve Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılık Sonuçları (Devamı)**

Hasta no (µg)	İzolat	E-test (mg/L) 24/48 saat			DD (mm) 24/48 saat			
		VOR	FLU	AMB	CAS	POS	VOR (1 µg)	FLU
26	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.094/0.094	> 256/> 256	0.25/0.38	> 32/> 32	0.32/0.32	25/24	< 6/< 6
27	<i>A. flavus</i>	0.19/0.25	> 256/> 256	1/1.5	0.32/0.32	0.19/0.25	22/21	< 6/< 6
28	<i>A. niger</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	0.25/0.38	0.006/0.012	0.25/0.25	17/16	< 6/< 6
29	<i>A. niger</i>	0.125/0.25	> 256/> 256	0.125/0.25	0.016/0.032	0.19/0.38	23/17	< 6/< 6
30	<i>A. fumigatus</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	0.25/0.25	0.064/0.094	0.064/0.064	19/19	< 6/< 6
31	<i>A. niger</i>	0.25/0.38	> 256/> 256	0.125/0.25	0.016/0.023	0.50/0.75	19/13	< 6/< 6
32	<i>A. terreus</i>	0.38/0.38	> 256/> 256	> 32/> 32	0.032/0.064	0.25/0.38	15/10	< 6/< 6
STD1	<i>A. fumigatus</i>	0.25/0.25	> 256/> 256	0.125/0.25	0.094/0.125	0.125/0.125	20/19	< 6/< 6
STD2	<i>A. niger</i>	0.125/0.19	> 256/> 256	0.125/0.19	0.016/0.023	0.25/0.25	20/18	< 6/< 6

DD: Disk difüzyonu; AMB: Amfoterisin B; VOR: Vorikonazol; CAS: Kaspofungin; POS: Posakonazol.

ve *Scedosporium* spp. saptanmıştır. Husain ve arkadaşlarının<sup>20</sup> çok merkezli olarak dört yıllık dönemde yaptıkları çalışmada da, invaziv küf enfeksiyonu bulunan 53 karaciğer/kalp alıcısından, bizim izolat dağılımımıza benzer şekilde, en çok *Aspergillus* spp. (n= 37) izole edilmiş, bunu *Aspergillus* dışı Hyalohyphomycetes (n= 5), Phaeohyphomycetes (n= 5), Zygomycetes (n= 3) ve diğerleri (n= 3) izlemiştir. Eren ve arkadaşları<sup>23</sup>, 10 aylık dönemde kritik ünitelerde yatan immün sistemi baskılanmış 43 hastaya ait klinik örnekleri mikolojik olarak değerlendirmişler ve örneklerin sekizinden filamentöz mantar (dört *Penicillium chrysogenum*, iki *A.fumigatus*, bir *A.flavus*, bir *Valsa sordida*) izole ederek moleküler yöntemlerle doğrulamışlardır.

Filamentöz mantar üretilen hastaların çoğunda altta yatan bir hastalık bulunmaktadır. Nir-Paz ve arkadaşları<sup>6</sup> *Fusarium* izolasyonu yaptıkları 89 klinik örneğin 22'sinin kronik böbrek yetmezliği, 27'sinin diabetes mellitus, 15'inin periferel damar hastalığı, 14'ünün iskemik kalp hastalığı ve sekizinin yanıklı hastalara ait olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da en sık tespit edilen *Aspergillus* ve *Fusarium* türlerinin kronik böbrek yetmezliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kanser, diabetes mellitus ve periferel damar hastalığı bulunan hastalardan izole edildiği izlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, 22 hematopoietik kök hücre alıcısının %82'sinden *Aspergillus* cinsi, %18'inden Zygomycetes grubu izole edilmiş ve hastalardan 20 (%91)'sinin öldüğü bildirilmiştir<sup>21</sup>. Karacan ve arkadaşlarının<sup>24</sup> solid organ transplantasyonu yapılan 207 hastayı üç yıl izledikleri çalışmalarında, yedi hastaya invaziv pulmoner aspergilloz tanısı konulmuş ve bunların 5 (%71.4)'i antifungal tedaviye rağmen kaybedilmiştir. Bizim çalışmamızda ise mortalite oranı %21.8 (7/32) olarak saptanmıştır.

Filamentöz mantarlar, sert hücre duvar yapılarına ve aktif nükleazlara sahip oldukları için genomik DNA ekstraksiyonu oldukça zahmetli ve zaman alıcı bir işlemdir<sup>25</sup>. Çalışmamızda *Aspergillus*'ların DNA ekstraksiyonunda farklı yöntemler denenmiş olmasına rağmen tam olarak etkili sonuçlar Makimura ve arkadaşlarının<sup>18</sup> yöntemiyle alınmıştır. Elde edilen DNA'ların dizi analizi sonuçları, klasik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, *Aspergillus*'ların tamamının klasik yöntemlerle tür düzeyinde; *Fusarium* suşlarından biri hariç diğerlerinin cins düzeyinde; *Bipolaris*, *Scedosporium* ve *Aureobasidium* suşlarının ise sadece cins düzeyinde doğru olarak tanımlanabildiği görülmüştür. Klasik yöntemle sırasıyla *Acremonium*, *Mucor* ve *Fusarium* olarak tanımladığımız suşlar dizi analizi sonucuna göre yine sırasıyla *Lecythophora*, *Rhizopus* ve *Cylindrocarpon* olarak tanımlanmıştır. Buna göre klasik yöntemle cins düzeyinde doğru tanımlama oranı %90 (29/32) olarak tespit edilmiştir. Klasik yöntemle tanımlanan tüm *Aspergillus* türleri moleküler yöntemle %100 uyumlu bulunmuş; diğer üç suşun klasik yöntemle tanımlanan cinslerle aynı aile içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bunun, klasik yöntemlerle tiplendirme yapılırken gözden kaçırılmış olan küçük ayrıntılardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Yaygın olarak izole edilen filamentöz mantarlar mikoloji atlaslarından yararlanılarak doğru olarak tanımlanabilse de, daha nadir rastlanan ve klasik yöntemle zor tanımlanan suşların referans laboratuvarlarda incelenmesi uygun olacaktır.

Filamentöz mantarların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde uzun zamandır standardize olmayan test yöntemleri kullanıldığından direnç durumlarının yorumlanması oldukça zordur. Bu amaçla "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" referans yöntem olarak sıvı dilüsyon yöntemlerini önermekte ve E-test ile makro ve mikrodilüsyon testleri arasında iyi bir uyum olduğu bildirilmektedir<sup>26</sup>. Yapılan çalışmalarda *Aspergillus* ve *Fusarium* suşlarında E-test ile mikrodilüsyon arasındaki uyumun %100, makrodilüsyon yöntemiyle %80 olduğu ifade edilmiştir<sup>26-28</sup>. Buna karşın *Aspergillus* spp. için antifungal duyarlılık testleri hastanelerdeki rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için önerilmektedir<sup>29</sup>. Çalışmamızda tüm izolatların antifungal duyarlılıkları E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle araştırılmıştır (Tablo II). Flukonazolün *Aspergillus* türlerine karşı temel olarak etkisiz olduğu bildirilmektedir<sup>29,30</sup>. Çalışmamızdaki tüm *Aspergillus* suşlarının MİK değerleri > 256 mg/L ve disk difüzyon ile zon çapı < 6 mm olarak saptanmıştır. Vorikonazolün *Aspergillus* türlerine karşı in vitro ve in vivo mükemmel bir aktivite sergilediği vurgulanmıştır<sup>31</sup>. Çalışmamızda *Aspergillus* spp. için E-test ile MİK değeri 24 saatte < 0.38 mg/L bulunurken, disk difüzyon ile zon çapının  $\geq 15$  mm olduğu görülmüştür. *Kaspofungin*; *Fusarium*, *Scedosporium*, *Zygomycetes*, *P. boydii* ve dematiaceous küflere karşı ya sınırlı bir etkiye sahiptir veya etkisizdir<sup>32</sup>. Bizim çalışmamızda da *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Rhizopus* spp. ve *Bipolaris* spp. suşlarında kaspofungin E-test MİK değerleri > 32 mg/L olarak tespit edilmiştir. *Aspergillus*'larda kaspofungin duyarlılığı E-test ile  $\leq 0.006-0.125$  mg/L MİK değerleri arasında saptanmış ve diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür<sup>33,34</sup>.

Posakonazolün sıklıkla izole edilen birçok maya (*Candida*) ve filamentöz mantara (*Aspergillus*, *Zygomycetes*) karşı etkili olduğu bildirilmiştir<sup>32</sup>. Çalışmamızda üç suşun (biri *Fusarium*, *Cylindrocarpon* ve *Rhizopus* suşu) posakonazol MİK değeri > 32 mg/L bulunurken, diğer suşların MİK değeri < 1.5 mg/L olarak tespit edilmiştir. Özellikle *Aspergillus* suşlarının diğer çalışmalarla<sup>35</sup> uyumlu olarak düşük MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. *A. terreus* suşlarının genellikle amfoterisin B'ye dirençli olduğu bildirilirken<sup>29</sup>, çalışmamızda risk faktörü taşımayan dört hastadan izole edilen ve klasik yöntemle tanımlanan *A. terreus* suşlarının da E-test ile MİK değerleri > 32 mg/L olarak saptanmıştır. Ayrıca, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Rhizopus* spp. amfoterisin B MİK değerleri > 32 mg/L olarak bulunurken, diğer suşların MİK değerinin < 2 mg/L olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, invaziv fungal enfeksiyonların giderek arttığı günümüzde özellikle kritik hastaların klinik örneklerinde filamentöz mantarların araştırılması önemlidir. Sıklıkla izole edilen *Aspergillus* ve *Fusarium* gibi mantarların LFPM ile boyanmış preparatlarının incelenmesiyle kolayca tanısı yapılabilmektedir. Bu prospektif çalışmanın Mersin'de ilk defa yapılıyor olması çalışmamızın önemini artırmaktadır. Çalışmamız sırasında artan klinik-laboratuvar iş birliği sayesinde mikoloji laboratuvarlarının önemi anlaşılmıştır. Nitekim nötroopenik ateş, immün sistem yetmezliği ve malignitesi olan hastaların örneklerinden izole edilen mantar etkenlerinin doğru ve kısa sürede tanımlanarak klinisyenin en kısa zamanda tedaviye başlamasının sağlanmasıyla, klinik örneklerden küf mantarlarının aranmasıyla ilgili talepler artmıştır. Ek olarak çalışmamızın verilerinin, bölgemiz ve ülkemizdeki klinik filamentöz mantarların epidemiyolojik durumunun belirlenmesinde daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmüştür.

**KAYNAKLAR**

1. Maertens J, Vrebos M, Boogaerts M. Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2001; 10(1): 56-62.
2. Rubin RH. Fungal infections in the organ transplant recipient, pp: 473-80. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), *Clinical Mycology*. 2009, 2<sup>nd</sup> ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
3. Özçelik T, Ozkalemkaş F, Kocaeli H, et al. Successful treatment of neuroaspergillosis in a patient with acute lymphoblastic leukemia: role of surgery, systemic antifungal therapy and intracavitary therapy. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 499-506.
4. Ener B. Nadir görülen fırsatçı mikozlar, s: 1105-9. Ustaçelebi Ş (ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1999, 1. Baskı. Güneş Kitabevi, Ankara.
5. Karaarslan A, Arıkan S, Karaarslan F, Cetin ES. Skin infection caused by *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses* 2003; 46(11-12): 524-6.
6. Nir-Paz R, Strahilevitz J, Shapiro M, et al. Clinical and epidemiological aspects of infections caused by *Fusarium* species: a collaborative study from Israel. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3456-61.
7. Greenberg RN, Scott LJ, Vaughn HH, Ribes JA. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17(6): 517-25.
8. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda tanımlanmış olan *Pseudallescheriasis* olguları ve Avrupa Tıp Mikoloji Konfederasyonu (ECMM) *Pseudallescheriasis* çalışma grubu. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36 (2): 90-6.
9. Kalkancı A, Kustimur S, Sucak GT, et al. Fulminating fungal sinusitis caused by *Valsa sordida*, a plant pathogen, in a patient immunocompromised by acute myeloid leukemia. *Med Mycol* 2006; 44(6): 531-9.
10. Anaissie EJ, Graziutti M, Nucci M. Invasive fungal infections in cancer patient, pp: 431-71. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), *Clinical Mycology*. 2009, 2<sup>nd</sup> ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
11. Coşkun T. Ev ortam havasındaki küf ve mayaların ve ev karakteristiklerinin çocuklarda allerjik astımla ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009. Mersin.
12. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 70(1): 23-8.
13. Luong ML, Clancy CJ, Vadnerkar A, et al. Comparison of an *Aspergillus* real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2011; 52(10): 1218-26.
14. Gündüz K. Safety of systemic antifungal drugs. *Türkderm* 2003; 37(4): 294-301.
15. Dalgıç N, İnce E. Sistemik etkili antifungal ilaçlar. *Klinik Pediatri* 2005; 4(3): 90-8.
16. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, et al. Laboratory approach to the diagnosis of fungal infections, pp: 1156-66. In: Koneman's *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams, Philadelphia.
17. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, et al. Hyaline molds and hyalohyphomycosis, pp: 1172-87. In: Koneman's *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams, Philadelphia.
18. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1994; 40(5): 358-64.
19. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34(7): 909-17.
20. Husain S, Alexander BD, Munoz P, et al. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. *Clin Infect Dis* 2003; 37(2): 221-9.
21. Shaukat A, Bakri F, Young P, et al. Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristics. *Mycopathologia* 2005; 159(2): 181-8.
22. Caston JJ, Linares MJ, Gallego C, et al. Risk factors for pulmonary *Aspergillus terreus* infection in patients with positive culture for filamentous fungi. *Chest* 2007; 131(1): 230-6.

23. Eren A, Kuştimur S, Kalkancı A, Unverdi S, Aktaş F, Sucak GT. Investigation of the effect of constructions in hospital environment on the crucial units for immunocompromised patients and the development of opportunistic mold infections. *Mikrobiol Bul* 2008; 42(1): 83-93.
24. Karacan Ö, Akçay Ş, Eyüboğlu FÖ ve ark. Solid organ transplant alıcılarında invaziv pulmoner aspergillozis. *Tüberk Toraks* 2003; 51(2): 177-82.
25. Suzuki S, Taketani H, Kusumoto K, Kashiwagi Y. High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *J Biosci Bioeng* 2006; 102(6): 572-4.
26. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3359-61.
27. Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(6): 789-93.
28. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(1): 163-94.
29. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(1): 44-69.
30. Xie L, Zhai H, Zhao J, Sun S, Shi W, Dong X. Antifungal susceptibility for common pathogens of fungal keratitis in Shandong Province, China. *Am J Ophthalmol* 2008; 146(2): 260-5.
31. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-50.
32. Cornely OA. *Aspergillus* to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. *Infection* 2008; 36(6): 605-6.
33. Martos AI, Romero A, González MT, et al. Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. *Med Mycol* 2010; 48(6): 858-61.
34. Shi JY, Xu YC, Shi Y, et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp. against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123(19): 2706-9.
35. Alanio A, Sitterlé E, Liance M, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2): 371-4.