

Klinik ve Çevresel Örneklerden Elde Edilen *Aspergillus fumigatus* İzolatlarında Azol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi

Phenotypic and Genotypic Evaluation of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Clinical and Environmental Specimens

Özlem DOĞAN^{1,2}(ID), Dolunay GÜLMEZ¹(ID), Sevtap ARIKAN AKDAĞLI¹(ID)

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Koc University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 2088.2014).

Makale Atfı: Doğan Ö, Gülmez D, Arkan Akdağlı S. Klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *Aspergillus fumigatus* izolatlarında azol direncinin fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):291-305.

ÖZ

Aspergillus fumigatus bağıışıklık sistemi baskılanmış konakta yüksek mortalite ile seyreden invaziv aspergillozun yanı sıra kronik pulmoner aspergillozu da içine alan farklı klinik tablolara neden olabilmektedir. Vorikonazol, aspergilloz tedavisinde ilk sırada tercih edilmesi önerilen antifungal ilaçtır. Vorikonazolün de içinde yer aldığı azol grubu ilaçlar, *cyp51A* geni tarafından kodlanan 14- α demetilaz enzimini inhibe eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda dünyada farklı merkezlerde çevresel ve klinik *A.fumigatus* izolatlarında artan azol direnci dikkati çekmektedir. Direnç gelişiminde iki farklı mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, klinikte uzun süreli azol kullanımına bağlı ortaya çıkan dirençtir. Bu yol ile gelişen azol direncinden genellikle *cyp51A* genindeki nokta mutasyonları sorumludur. İkinci mekanizma ise tarımda fungusit olarak azol kullanımına bağlı sekonder çevresel azol maruziyetidir. Uzun süreyle ve değişen konsantrasyonlarda azol bileşikleri ile temas, sporlanma sürecindeki *A.fumigatus* üzerinde seçici baskıya ve mutasyonlara neden olmaktadır. Azol direnci kazanan suşların doğada bulunması nedeniyle, duyarlı kişilerin bu suşları çevreden alarak enfekte olmaları mümkün olabilmektedir. Genotipik olarak incelendiğinde çevresel direnç kazanan bu izolatlarda genellikle *cyp51A* geninde 98. kodondaki nokta mutasyonuna ek olarak promotor bölgede "tandem repeat" (TR34/L98H) saptanmıştır. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde klinik örneklerden ve hastane çevresindeki peyzaj alanlarından izole edilen *A.fumigatus* izolatlarında azol direnç durumunun fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılmasıdır. Morfolojik özelliklerin incelenmesini takiben termotolerans testi ile *A.fumigatus* sensu stricto olarak tanımlanan izolatlarda azol duyarlılık durumunun saptanması için agar tarama testi uygulanmış, azol içeren plakların herhangi birinde üreme olan izolatlarda "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing"

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Özlem Doğan, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Davutpaşa Caddesi No: 4 34010 Topkapı, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): +90 850 250 8250/25204,, E-posta (E-mail): ozldogan@ku.edu.tr

referans mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiştir. Ayrıca seçili izolatlarda *cyp51A* geni dizisi incelenerek mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya klinik örneklerden 483, çevre örneklerinden 65 toprak *A.fumigatus* sensu stricto izolatu dahil edilmiştir. Klinik izolatların birinci grubu 1997-2015 yıllarına ait 215 izolatın oluşmuş ve retrospektif olarak test edilmiştir. İkinci grup ise *A.fumigatus* kompleksi için rutin azol agar tarama testinin yapıldığı 2016-2018 yıllarına ait 268 izolatın oluşmuştur. Tüm klinik izolatlar (n= 483) birlikte değerlendirildiğinde izolatlardan biri 2015 yılından önce, 10'u 2016-2018 yılları arasında olmak üzere 11 (%2.3)'i itraconazole dirençli, 5 (%1)'i artmış maruziyette duyarlı (Intermediate-I) *A.fumigatus* izolatu saptanmıştır. Azole dirençli izolatlarda incelenen *cyp51A* geninde, *Aspergillus* izolatlarında azol direnci ile ilişkilendirilmiş mutasyonların hiçbiri saptanmamış ve bu dirençli izolatlarda, direnç ile ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılmamış bazı polimorfizmler (Y46F, G89G, V172M, T248N, E255D, L358L, K427E, C454C, Y431D ve bir izolatta bu polimorfizme ek olarak Q141H) gösterilmiştir. Çalışmamızda *A.fumigatus* izolatlarında azol direnci düşük oranda (%2.3) saptanmıştır. Saptanan polimorfizmlerin azol direncine olası etkisinin gösterilmesi ve yüksek azol MİK değerleri ile ilişkili diğer mekanizmaların aydınlatılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür. Ayrıca ülkemizde bir bölgeden yüksek azol direnci bildirilmiş olması nedeniyle, farklı bölgelerde azol direnç durumunun ve azol direnci oranı için aralığın belirlenmesi ve ülkemize özgü olabilecek direnç mutasyonlarının açığa çıkarılması amacıyla çok merkezli çalışmaların gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus fumigatus*; azol direnci; polimorfizm; agar tarama testi; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing referans mikrodilüsyon testi.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus can cause different clinical manifestations including chronic pulmonary infections, as well as invasive aspergillosis which is highly mortal in the immunocompromised host. Azole antifungal drugs, voriconazole in particular, are the first-line recommended therapeutic regimen. Azoles inhibit 14- α demethylase enzyme encoded by the *cyp51A* gene. In recent years, increased azole resistance is observed among environmental and clinical *A.fumigatus* isolates. Two different mechanisms have been proposed for the development of resistance. The first one is the triggering of resistance as a result of long-term clinical azole use. Point mutations in *cyp51A* gene are generally responsible for this type of azole resistance. The second mechanism is incidental environmental azole exposure due to the use of azoles as agricultural fungicides. Contact with azoles for extended periods and at varying concentrations causes selective pressure and mutations on sporulating *A.fumigatus*. Since the resistant strains may persist in nature, susceptible individuals may be infected by acquisition of these strains from the environment. When genotypically examined, the *cyp51A* gene of the resistant isolates of environmental origin specifically presents with a tandem repeat in the promoter region in addition to the point mutation in codon 98 (TR34/L98H). The aim of this study was to investigate azole resistance rates in *A.fumigatus* strains isolated from clinical specimens and landscaping areas around Hacettepe University Faculty of Medicine Hospital by phenotypical and genotypical methods. Agar screening test was used as the initial test to detect azole resistance in isolates identified as *A.fumigatus* sensu stricto according to thermotolerance test results. For all strains that grew on any of the azole containing plates in agar screening test, minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined by "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" reference microdilution method for the confirmation of the resistance. In addition, *cyp51A* gene sequence was investigated in selected isolates and mutation analysis was performed. A total of 483 clinical and 65 environmental *A.fumigatus* sensu stricto isolates were included in the study. The first group of clinical isolates consisted of 215 strains isolated in 1997-2015, revived from stock and tested. The second group consisted of 268 strains belonging to the time period of 2016-2018, during which routine azole agar screening tests were performed for *A.fumigatus* isolates. When all isolates (n= 483) were evaluated together, 11 isolates (1 before 2015 and 10 between 2016-2018), were found to be resistant to itraconazole (2.3%). None of the mutations previously reported to be associated with azole resistance in *Aspergillus* strains that were detected in *cyp51A* sequence analysis. However, polymorphisms which are not (yet) fully elucidated in relation to the resistance (Y46F, G89G, V172M, T248N, E255D, L358L, K427E, C454C, Y431D and Q141H in one strain) were shown to exist in resistant isolates. These

results have shown that the rate of azole resistance among clinical *A.fumigatus* isolates was low (2.3%) in our center. Further studies are required to demonstrate the possible role of the detected polymorphisms on azole resistance and to clarify other mechanisms related with high azole MIC values. In addition, since high azole resistance has been reported from one region in our country, it has been concluded that multicenter studies are required to determine the azole resistance status and the range for the azole resistance ratio in different regions and to reveal resistance mutations that may be specific to our country.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; azole resistance; gene polymorphism; agar screening test; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing reference microdilution method.

GİRİŞ

Tüm dünyada mantar enfeksiyonlarının sıklığı, risk altındaki popülasyonun artışına bağlı olarak giderek artmaktadır¹. *Aspergillus* enfeksiyonlarında klinik tablo konağın bağışıklık durumuna göre değişmektedir². Özellikle nötropenik hastalarda yüksek mortalite ile seyreden invaziv aspergilloz öne çıkmakta iken, kistik fibrozis ve astım gibi kronik akciğer hastalığı olanlarda alerjik bronkopulmoner aspergilloz önemli sorun yaratmaktadır. Öte yandan, geçirilmiş akciğer tüberkülozu veya sarkoidoz gibi hastalıklar sonrası kaviter pulmoner sekelleri olan hastalarda aspergilloma olarak isimlendirilen fungus topları gelişebilmektedir. Diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlerin varlığında ise kronik pulmoner aspergilloz görülebilmektedir³.

Aspergillus enfeksiyonlarında etken olarak farklı türler izole edilebilmektedir. Doğada 150'nin üzerinde tür bulunmakla birlikte, klinik örneklerde bazı türler ön plana çıkmaktadır. Günümüzde *Aspergillus* cinsinde bulunan türler morfolojik yakınlıklarına göre komplekslere ayrılmıştır. Rutin klinik laboratuvarlarda tanımlama daha çok morfolojik özelliklere dayandığından, genellikle tür kompleksi düzeyinde ayırım yapılabilmekte olup, bu düzeyde tanımlama rutin amaçlı olarak yeterli olmaktadır. Tür düzeyinde tanımlama için morfolojik özellikler yetersiz kalmakta ve genotipik yöntemler gerekmektedir. Ancak, en sık rapor edilen *A.fumigatus* kompleksi içinde yine en sık gözlenen tür olan *A.fumigatus* sensu stricto, termotolerans testi ile ayrılabilir. Kompleks içindeki türlerin ayrılması, farklı antifungal duyarlılık profilleri gözlenmesi nedeniyle tedavinin yönlendirilmesinde önemli rol oynayabilmektedir⁴. Örneğin *A.fumigatus* kompleksi içinde, antifungal ilaçlara direnç gösteren *Aspergillus lentulus* gibi türler de yer almaktadır⁵. Kompleks içindeki kriptik türlerin genotipik ayırımında ITS geninin yanı sıra β -tübülin, kalmodülin ya da rodlet A genlerine ait diziler kullanılabilir⁶⁻⁸.

Aspergilloz tedavisinde bugün birçok uluslararası bilimsel dernek ve komite azol grubu antifungal ilaçları profilaksi ve tedavide önermektedir^{8,9}. Ancak son yıllarda tüm dünyada *A.fumigatus* izolatlarında artan azol direnci dikkati çekmektedir¹⁰. *A.fumigatus* izolatlarında azol direnci ilk kez 1997 yılında saptanmış ve ardından yayımlanan çeşitli direnç bildirimlerinin sonuçları genotipik olarak incelendiğinde azol direncine, ilacın hedef enzimi olan 14 α -demetilazı (lanosterol demetilaz) kodlayan *cyp51A* genindeki nokta mutasyonlarının neden olduğu gösterilmiştir^{11,12}. Hollanda'da 1994-2007 yıllarında yapılan bir çalışmada¹³ yıllar içinde artan itrakonazol direnci dikkati çekmiş, dirençli izolatların çok büyük bir bölümünde aynı değişimin olduğu görülmüştür. Bu değişim-

de, *cyp51A* geninde nokta mutasyonu (L98H) ile birlikte genin promotor bölgesinde 34 aminoasitlik bölgesinin çift kopya oluşunun rolü bulunmaktadır. Dirençten sorumlu bu değişim, "TR34/L98H" olarak isimlendirilmiştir. Takip eden sürede bu mekanizma hemen tüm Avrupa ülkelerinde hasta örneklerinde saptanmıştır. Bu direnç mekanizmasının kaynağı incelendiğinde, tarımda fungusit olarak kullanılan demetilaz inhibitörlerinin medikal azol ilaçlara benzer kimyasal yapıları ile direnci indükleyebileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Bu fungusitlerin yapısal olarak medikal azollere benzerlik göstermesi, doğada çok miktarda spor oluşturan *A.fumigatus*'ta direncin ortaya çıkmasına neden olmakta, ortaya çıkan azol dirençli suşlar doğada kalıcı olabilmekte ve daha önce hiç azol almamış hastalarda hastalık etkeni olarak ortaya çıkmaları mümkün olmaktadır¹⁴. Bu nedenle, azol direncinden sorumlu olan TR34/L98H mutasyonu klinik örneklerin yanı sıra çevresel örneklerde de yaygın olarak saptanmıştır. Ayrıca, kronik aspergillozu olan hastalarda uzun süreli azol kullanımı ile de direnç gelişebilmekte, bu durumda farklı mutasyonlar gözlenmektedir^{12,15}. Dünyada birçok farklı bölgede *A.fumigatus* izolatlarında sıklığı değişen oranda azol direnci bildirilmeye başlanmıştır¹⁶. Bu nedenle, ülkede ve merkezlerde *A.fumigatus* izolatlarındaki azol direncinin sıklığının saptanması ve direnç mekanizmasının genetik temellerinin aydınlatılması, güncel tanı ve tedavi kılavuzlarında önerilmektedir⁸. Bu çalışmada, hastanemizde klinik izolatlardan ve hastane çevresindeki doğal ortamlardan izole edilmiş *A.fumigatus* izolatlarında azol duyarlılığının saptanması ve direnç varlığında olası mekanizmaların moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik İzolatlar

Birinci grup: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında hasta örneklerinden 1997-2015 yılları arasında izole edilmiş ve -80°C'de saklanmış *A.fumigatus* sensu stricto izolatları çalışmaya alındı. Her hastadan bir izolat çalışmaya dahil edildi.

İkinci grup: Mikoloji Laboratuvarında 2016-2018 yıllarında izole edilen tüm *A.fumigatus* kompleksi izolatları termotolerans testine alınarak test sonucunda *A.fumigatus* sensu stricto olduğu saptanan izolatlara azol direnci için agar tarama testi yapıldı. Agar tarama testinde üreme pozitif bulunan izolatların "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" mikrodilüsyon referans yöntemi ile azol minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlendi. Azollere duyarlı ve dirençli izolatların eş zamanlı olarak bir hastada bulunabilmesi ve kronik aspergillozu olan hastalarda zaman içinde direnç gelişimi gözlenebilmesi nedeniyle, aynı hastanın tekrarlayan örneklerinden soyutlanan veya tek bir örneğinden izole edilen farklı makroskobik morfolojiye sahip izolatları için rutin olarak agar tarama testleri yapıldı ve gereken izolatlarda mikrodilüsyon duyarlılık testi uygulandı. Bu çalışmada, bir hastaya ait tekrarlayan izolatlar çıkarılarak (aynı hastadan izole edilen suşlar arasında > 1 ay olacak

şekilde ve invaziv aspergilloz şüphesi olanlarda farklı örneklerden bir tanesi dahil edilecek) kullanıldı.

Çevre İzolatları

Hacettepe Üniversitesi Erişkin, Çocuk ve Onkoloji Hastaneleri ve otoparkların çevresindeki peyzaj alanlarından toprak örnekleri toplandı. Hasta geçişinin yoğun olduğu bölgelerde olası azole dirençli suşların saptanması amaçlanarak direnç oranı belirleyebilmek için alan taraması yapılmadı. Örnekler, daha önce literatürde bildirilmiş yöntemler temel alınarak izole edildi^{7,14}. Seçilen alandan alınan 2 g toprak, %0.1 Tween 20 ve 0.04 g/L gentamisin içeren 5 ml steril serum fizyolojik ile karıştırılarak bu süspansiyondan 100 µl alınıp Sabouraud dekstroza agara (SDA) ekim yapıldı⁷. Plaklar 37°C'de inkübe edilerek 24, 48 ve 72 saat sonra üremelerin kontrolü yapıldı. Morfolojik olarak *A.fumigatus* kompleksine benzeyen tüm koloniler saflaştırıldıktan sonra *A.fumigatus* sensu stricto olarak tanımlanan izolatlar çalışmaya dahil edildi.

İzolatların Tanımlanması

İzolatların tanımlanmasında, makroskobik ve mikroskobik morfolojik özellikler ve termotolerans testi kullanıldı^{7,8,17}.

Termotolerans Testi

Test edilecek izolatın üç gün inkübasyonu sonrasında yeterli üreme göstermiş olan bir kolonisi, %0.1 Tween 20 içeren steril distile su ile ıslatılarak eküvyon çubuğu yardımı ile bir miktar konidyum alınıp SDA'ya ekildi. Ekilen plaklar çalışmanın ilk aşamasında 48°C'de, 2016 yılı ve sonrasında ise önerilen standartlardaki değişiklik göz önüne alınarak 50°C'de inkübe edildi^{7,8}. Üremeler 24 ve 48. saatte kontrol edildi. Üreme gözlenen izolatlar *A.fumigatus* sensu stricto olarak değerlendirildi.

Azol Agar Tarama ve Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan izolatlar önce azol agar tarama testi ile incelendi. İtrakonazol agar tarama plaklarında üreme gözlenen izolatlarda EUCAST önerileri doğrultusunda azol MİK değerleri saptandı^{18,19}. Kalite kontrolü için *Aspergillus flavus* ATCC 204304 ve azol direnci yönünden pozitif kontrol olarak daha önce Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında izole edilen ve TR34/L98H direnç mekanizmalarını içerdiği gösterilmiş bir izolat (suş 12868) kullanıldı^{19,20}.

Agar tarama testinde itrakonazol (4 µg/ml), vorikonazol (1 µg/ml), posakonazol (0.5 µg/ml) ilave edilmiş %2 glukozlu RPMI agar kullanıldı²¹. Önerilen değişiklikler göz önüne alınarak, Mayıs 2018 tarihinden itibaren vorikonazol miktarı 2 µg/ml'ye çıkarıldı^{18,22,23}. Bu amaçla, 48-72 saat inkübasyon sonrasında bir koloniden %0.1 Tween 20 içeren steril distile su ile ıslatılmış eküvyon yardımı ile bir miktar konidyum alınıp, tarama plaklarına ve eş zamanlı olarak antifungal içermeyen kontrol plağına ekim yapıldı. Plaklar, oda sıcaklığında kuruduktan sonra 35°C'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında

incelendi. Agar tarama yöntemi ile azol içeren plakların herhangi birinde üreme saptanan izolatlar, antifungal duyarlılık testine alındı.

Antifungal duyarlılık testleri, konidyum oluşturan küf mantarları için hazırlanan EUCAST kılavuzunun önerdiği biçimde mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirildi¹⁹. EUCAST tarafından önerilen klinik direnç sınır değerleri temel alınarak, itraconazol ve vorikonazol için $\geq 4 \mu\text{g/ml}$, posakonazol için ise $> 0.5 \mu\text{g/ml}$ olan MİK değerleri ilgili ilaca direnç olarak yorumlandı. MİK değeri itraconazol ve vorikonazol için $2 \mu\text{g/ml}$, posakonazol için ise $0.25 \mu\text{g/ml}$ olduğunda, artmış maruziyette duyarlı (intermediate) olarak alındı. Herhangi bir azol MİK değerinin direnç sınır değeri sınırında veya üzerinde bulunması durumunda, antifungal duyarlılık testi doğrulama amacıyla tekrar edildi.

Dizi ve Mutasyon Analizi

Azol agar tarama testinde itraconazol plaklarında üreme gözlenen ve MİK değeri duyarlılık sınırını aşan ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$) izolatlar ile, negatif kontrol olarak her üç azol için MİK değerleri duyarlılık sınırının altında bulunan bir izolat ve pozitif kontrol olarak TR34/L98H mutasyonu varlığı bilinen suş 12868 için *cyp51A* geni dizi analizi gerçekleştirildi ve elde edilen dizilerde mutasyon analizi yapıldı (Refgen Biyoteknoloji, Ankara). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *cyp51A* geninin çoğaltılması için F - 5'-ATG GTG CCG ATG CTA TGG-3' ve R - 5'-CTG TCT CAC TTG GAT GTG-3' primerleri kullanıldı²⁴. PCR ile elde edilen ürüne ait diziler, referans *cyp51A* dizisi ile karşılaştırıldı (GenBankası erişim no. AF338659). Dizi ve mutasyon saptama için BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2 programı ClustalW analizi kullanıldı.

BULGULAR

1997-2015 yılları arasında izole edilen 215 *A.fumigatus* sensu stricto izolatu birinci grup olarak çalışmaya alınmıştır.

2016-2018 yılları arasında tüm klinik örneklerden azol tarama testi ve/veya mikrodilüsyon testi yapılan 324 *A.fumigatus* kompleksine ait izolattan termotolerans testi ile *A.fumigatus* sensu stricto olarak tanımlanan 268'i ikinci grup olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 483 klinik *A.fumigatus* sensu stricto izolatu'nun örneklere göre dağılımları Tablo I'de özetlenmiştir. En sık alt solunum yollarından ($n= 313$, %64.8) üreme saptanmıştır.

Çalışmaya alınan 483 *A.fumigatus* sensu stricto suşundan 10'u ikinci grupta olmak üzere 34'ü itraconazol içeren plakta, bunlardan bir kısmı da vorikonazol ve/veya posakonazol içeren plaklarda üremiştir. Bu 34 izolata ait azol agar tarama ve EUCAST referans mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri Tablo II'de verilmiştir.

Agar tarama plaklarında üreme gözlenen 34 izolatu'nun 22'si sadece itraconazol plaklarında üremiştir. Bunlardan 4'ü, mikrodilüsyon ile her 3 azole de duyarlı bulunmuştur.

Tablo I. Klinik *Aspergillus fumigatus* sensu stricto İzolatlarının Elde Edildiği Örnek Türlerine Göre Dağılımı

Örnek	Birinci grup		İkinci grup		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Alt solunum yolu örnekleri ¹	125	58.1	188	70.1	313	64.8
Steril vücut sıvıları ²	17	7.9	38	14.2	55	11.4
Doku ³	40	18.6	14	5.2	54	11.2
Püvy ⁴	17	7.9	16	6.0	33	6.8
Diğer ⁵	16	7.4	12	4.5	28	5.8
Toplam	215	100.0	268	100.0	483	100.0

¹ Balgam, derin trakeal aspirat, bronkoalveoler lavaj.

² Plevral sıvı, periton sıvısı, perikardiyal sıvı, beyin omurilik sıvısı, kan, kemik iliği aspirat örneği, eklem sıvısı.

³ Biyopsi ve ameliyat örneği.

⁴ Püvy, dren sıvısı, aspirat sıvısı.

⁵ İdrar, burun sürüntüsü, kateter ucu örneği, boğaz sürüntüsü, tırnak, kaynağı bilinmeyen örnekler.

İtrakonazol plağında üreyen 34 izolatın 16'sında (MİK ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$), vorikonazol plağında üreyen 12 izolattan 11'inde (MİK ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) ve posakonazol plağında üreyen 6 suşun (MİK ≥ 0.25 $\mu\text{g/ml}$) hepsinde MİK değerleri duyarlılık sınır değerinin üzerinde bulunmuştur. Vorikonazol plağında üreme gözlenmeden MİK değeri duyarlılık sınırını aşan izolat bulunmamakla birlikte, posakonazol plağında üreme olmadığı halde 14 izolat dirençli (MİK ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$) olmak üzere 24 izolatta MİK değerinin duyarlılık sınırını aştığı (MİK ≥ 0.25 $\mu\text{g/ml}$) gözlenmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi, Çocuk Hastanesi, Onkoloji Hastanesi ile hastane kompleksi içindeki otoparkların giriş ve etrafındaki çiçek ve ağaçlardan oluşan peyzaj alanlarından toplanan 100 toprak örneğinden elde edilen 65 *A.fumigatus* kompleksi izolatının tamamı termotolerans testi ile *A.fumigatus* sensu stricto olarak tanımlanmıştır.

Azol agar tarama testine alınan 65 toprak izolatından 12'sinde itrakonazol plaklarında üreme görülmüş, hiçbirisi posakonazol ve vorikonazol kültür plaklarında ürememiştir. Buna karşın 1 izolatta vorikonazol, tüm izolatlarda posakonazol için duyarlılık sınır değerini aşan MİK değerleri saptanmıştır (Tablo III).

Seçilen bazı izolatlarda *cyp51A* geni dizisi analiz edilmiş ve mutasyon analizi sonuçları Tablo IV'te verilmiştir. Bunun için itrakonazol MİK değeri ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ olan 6 hasta ve 8 toprak izolatının yanı sıra tüm azollere duyarlı bir klinik izolat (K7) ve posakonazol MİK değeri 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olan 1 toprak izolatu (T2) çalışılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda, biri hariç tüm izolatlarda aynı patern belirlenmiş, yalnızca K16 izolatında diğer izolatlarda gözlenen polimorfizmlere ek olarak Q141H polimorfizmi tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde daha önce tek başına azol direncine neden olduğu tanımlanmış olan TR34/L98H direnç mekanizması ya da diğer *cyp51A* mutasyonları gösterilememiştir. Pozitif kontrol olarak çalışmaya alınmış olan suş 12868'de ise, beklendiği gibi TR34/L98H paterni yine saptanmıştır²⁰.

Tablo II. Azol Agar Tarama Plaklarında Üreme Gözlenen Klinik *Aspergillus fumigatus sensu stricto* İzolatlarının Azol Agar Tarama Testi ve Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları (K25-K34 İkinci Grup)

Örnek	Yıl	Azol agar tarama testi sonuçları			Antifungal duyarlılık testi sonuçları (µg/ml)		
		İtrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol
K1	2014	Pozitif	Negatif	Negatif	1	1	0.5
K2	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.5
K3	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.5
K4	2006	Pozitif	Pozitif	Negatif	2	1	1
K5	2007	Pozitif	Negatif	Negatif	1	1	0.25
K6	2008	Pozitif	Pozitif	Pozitif	4	2	1
K7	2005	Pozitif	Negatif	Negatif	0.25	0.25	0.06
K8	2000	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	1	0.25
K9	2002	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	1	0.25
K10	2003	Pozitif	Negatif	Negatif	2	1	0.5
K11	2006	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.06
K12	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.25
K13	1998	Pozitif	Negatif	Negatif	0.25	0.5	0.125
K14	2005	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.125
K15	2006	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.125
K16	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	2	1	0.5
K17	2002	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.25
K18	2014	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.25
K19	2005	Pozitif	Negatif	Negatif	0.5	0.5	0.25
K20	2014	Pozitif	Negatif	Negatif	1	1	0.25
K21	1999	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.25
K22	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	2	1	1
K23	2013	Pozitif	Negatif	Negatif	2	0.5	0.5
K24	2001	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.25
K25	2016	Pozitif	Pozitif	Pozitif	8	4	1
K26	2016	Pozitif	Pozitif	Pozitif	8	4	1
K27	2017	Pozitif	Pozitif	Pozitif	8	4	2
K28	2017	Pozitif	Pozitif	Pozitif	8	4	1
K29	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	4	4
K30	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	4	2
K31	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	8	2
K32	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	8	2
K33	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	8	1
K34	2018	Pozitif	Pozitif	Negatif	8	4	0.5

Tablo III. Azol Agar Tarama Plaklarında Üreme Gözlenen Toprak *Aspergillus fumigatus sensu stricto* İzolatlarının Azol Agar Tarama Testi ve Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları

Örnek	Azol agar tarama testi sonuçları			Antifungal duyarlılık testi sonuçları (µg/ml)		
	İtrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol
T1	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2	1
T2	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.5
T3	Pozitif	Negatif	Negatif	2	1	1
T4	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T5	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T6	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T7	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T8	Pozitif	Negatif	Negatif	> 8-4	2-1	1
T9	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T10	Pozitif	Negatif	Negatif	8-4	2-1	1
T11	Pozitif	Negatif	Negatif	> 8-8	2-1	1
T12	Pozitif	Negatif	Negatif	1	0.5	0.25

Tablo IV. Klinik ve Çevresel İzolatlarda *cyp51A* Geninde Saptanan Polimorfizmler*

Örnek	Saptanan polimorfizmler								
K4	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K6	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K7	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K10	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K16	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K22	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
K23	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T1	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T2	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T4	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T5	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T6	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T7	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T8	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T9	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T10	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D
T11	Y46F	G89G	V172M	T248N	E255D	L358L	K427E	C454C	Y431D

* K7 dışındaki suşlarda en az bir azol için duyarlılık sınır değerini aşan minimum inhibitör konsantrasyonu değerleri saptanmıştır.

TARTIŞMA

Aspergillus enfeksiyonlarında etken olarak en sık *A.fumigatus* sensu stricto karşımıza çıkmaktadır. Yakın zamana kadar klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tür kompleksi düzeyinde tanımlanma yeterli görülmekteyse de, *A.fumigatus*'ta sekonder azol direnci gösterilmesi ve azole dirençli türlerin tedavi sorunlarına yol açması nedeniyle *A.fumigatus* sensu stricto'nun diğer kompleks üyesi türlerden ayrılması önem kazanmıştır⁶.

A.fumigatus'da sekonder azol direnci ilk tanımlandığı 1997 yılından itibaren giderek artmış ve dünyada birçok bölgede gösterilmiştir. Yapılan çok ve tek merkezli sürveyans çalışmalarında *A.fumigatus*'ta azol direnci; çalışmaya alınan hasta popülasyonuna ve izolatların klinik veya çevresel kökenli olmasına göre %2-28 değişen oranlar arasında saptanmış, tarım ve çiçekçiliğin yaygın olduğu bölgelerde bu oranın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir^{12,25}. Azol grubu antifungal ilaçların özellikle kök hücre nakli yapılan ve nötropenik hastalarda tedavi ve profilaksi amacıyla kullanılıyor olması nedeniyle, artmakta olan direnç oranları kaygı vericidir²⁶. Azol direncinin saptanması için önerilen referans antifungal duyarlılık testlerinin rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanmasında karşılaşılan güçlükler nedeniyle azol agar tarama testi geliştirilmiştir²¹. İtrakonazol, vorikonazol ve posakonazol içeren agar tarama plakları ile yapılan çok merkezli bir çalışma¹⁸, bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün %99 olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada sadece itrakonazol ve vorikonazol plakları ile duyarlılığın aynı seviyede kaldığı belirtilmiştir. Bu yöntem, EUCAST E.Def 10.1 dokümanında standart referans yöntem olarak önerilmektedir²³. Bu çalışmada azol direnci yönünden tarama için her üç azol plağı da kullanılmış, herhangi bir plakta üreme gözlelendiğinde referans yöntem ile MİK değerleri belirlenmiştir. Şüpheli izolatların tamamı itrakonazol plaklarında, bazıları ek olarak vorikonazol ve/veya posakonazol plaklarında da üreyebilmiştir.

Azole direnç oranları dünyanın farklı bölgelerinde farklılıklar göstermekte ve %20 ve daha yüksek oranlara ulaşabilmektedir²⁷. Ülkemizde Bursa ilinde 1999-2012 yılları arasında izole edilmiş klinik *A.fumigatus* izolatlarında %10.2 oranında itrakonazol direnci bildirilmiştir²⁰. Bu çalışmada, 1997-2018 yıllarına ait 483 izolattan 11 (%2.3)'inde itrakonazole direnç saptanmıştır.

cyp51A geninde azol direnci ile ilişkili birçok nokta mutasyonu saptanmış olsa da, en bilinen mutasyonlar G54, P216, F219, M220 ve G448 olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar enzimin "hot spot" bölgeleri olarak tanımlanan, ilacın enzime bağlanma bölgesi gibi ilaç enzim ilişkisinin önemli olduğu bölgelerde meydana gelmektedir. Bu bölgelerde mutasyon oluştuğunda azol grubu antifungaller lanosterol demetilaz enzimiyle etkileşmemekte; bu durum hastanın kliniğine izole itrakonazol, posakonazol veya vorikonazol direnci ya da tüm azollere karşı panazol direnci olarak yansiyabilmektedir¹⁶. Bu çalışmada sözü edilen mutasyonlar gözlenmemiş, bir izolatta Q141H mutasyonu saptanmıştır. Snelders ve arkadaşları²⁴ tarafından yapılan bir çalışmada Q141H çevre kaynaklı panazol dirençli bir izolatta TR34/L98H mutasyonu ile birlikte bulunmuştur. Aynı araştırma gru-

bunun yaptığı bir başka çalışmada, toprak örneğinde TR34/L98H mutasyonu ile birlikte dirençli bir izolatta da Q141H saptanmıştır²⁸. Q141H'nin tek başına azol direnci ile ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceği ile ilgili henüz kesin veri bulunmamaktadır.

Tarımda azol fungusit kullanımına bağlı doğada meydana gelen azol direncinin ortaya çıkmasına neden olan en bilinen değişim, TR34/L98H değişimi ve mutasyondur¹⁴. Bu mekanizma ile ortaya çıkan dirençte, hedef modifikasyonu ve buna bağlı ilaç enzim etkileşimi bozulmasının yanı sıra, promotör bölgedeki 34 baz çiftlik bölgenin çift kopya oluşu da rol oynamaktadır¹². Son yıllarda, TR34/L98H mutasyonuna ilave olarak TR46/Y121F/T289A mutasyonu da benzer şekilde çevresel kaynaklı direnç olgularıyla ilişkilendirilmiştir. Bu paternin görüldüğü olgularda vorikonazol direncinin öncelikli olması dikkat çekmektedir²⁹. Gen bölgesinde aminoasit değişikliği olmaksızın sadece promotör bölgede "tandem repeat" ile kendini gösteren TR53 paterni de benzer olarak çevresel kaynaklı direnç ile ilişkilendirmektedir³⁰.

Ülkemizde Bursa ilinde hasta izolatlarında yapılmış olan çalışmada itrakonazol direnci %10.2 bulunmuş, dirençli izolatlar incelenmiş ve %86.8'inde TR34/L98H mutasyonu saptanmıştır²⁰. Çalışmamızda, *A.fumigatus* sensu stricto izolatlarında bu mutasyona rastlanmamıştır. Bursa ilinde tarım faaliyetlerinin yoğun olması, bu bölgede Ankara ili ile karşılaştırıldığında iklimin daha ılıman ve yağışlı olması ve bu iklim koşulları nedeniyle tarım alanlarında fungusitlerin daha sık kullanılabiliyor olması gibi faktörlerin iki çalışma sonuçları arasındaki farkı açıklayabileceği düşünülmüştür. Ancak, Bursa'da yapılan bu çalışmanın klinik örneklerle sınırlı olması ve çevresel izolatların dahil edilmemiş olması nedeniyle direncin kaynağına yönelik bir görüş oluşmamıştır. Ülkemizde *Aspergillus* azol direncinin yaygınlığının ve ortaya çıkış yolunun incelenebilmesi için ülkenin farklı bölgelerinden elde edilen klinik ve çevresel *Aspergillus* izolatlarında yapılacak çok merkezli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda klinik ve çevresel izolatlarda ortaya çıkan, bu iki farklı azol direnç mekanizmasını işaret eden belirlenmiş aminoasit değişimlerine ek olarak bir dizi *cyp51A* geni mutasyonu/polimorfizmi saptanmıştır. Bunlar hep birlikte veya farklı kombinasyonlarda olmak üzere Y46F, G89G, V172M, T248N, E255D, L358L, K427E, C454C mutasyonları olarak tanımlanmıştır⁷. Bu çalışmamızda da benzer olarak hem çevresel hem de klinik izolatlarda bu polimorfizmler saptanmıştır (Tablo IV). Literatürde bu polimorfizmlerin hem duyarlı hem de dirençli izolatlarda saptanabildiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda, bu polimorfizmler yükselmiş azol MİK değerleri ile ilişkilendirilmişse de direnç ile ilişkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır¹⁴. Çalışmamızda da çevresel ve klinik örneklerde MİK değeri yüksek izolatların yanı sıra duyarlı kontrol suşunda da bu polimorfizmlerin varlığı belirlenmiştir. Bu durum, bizim izolatlarımızda, farklı bir direnç mekanizmasının geçerli olabileceğini düşündürmektedir³¹. Alanio ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada¹⁵ bu polimorfizmlerin saptandığı izolatlarda itrakonazol MİK değerlerinin duyarlılık eşik değerinin altında; ancak, vahşi tip suşlara kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada vorikonazol ile önceden karşılaşmış olmanın bu polimorfizmi

taşıyan izolatların genotipik dağılımları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı seçici baskı oluşturduğu gösterilmiştir.

Öte yandan CYP51A proteinin üç boyutlu yapısal modellemelerinin oluşturulduğu bir çalışmada, azol direnci ile yakından ilişkilendirilen L98H veya M220 gibi aminoasit değişikliklerinin, proteinin azol ya da hem bağlantı noktalarında olduğu, bu nedenle bu değişikliklerin in vitro ve in vivo dirence neden olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada, Y46F, G89G, V172M, T248N, E255D, L358L, K427E, C454C değişikliklerinin ise proteinin dış bölgelerinde olduğu, proteinin yapısal bütünlüğü veya azol bağlanma bölgesi ile ilişkisiz olduğu bildirilmiştir³². Benzer olarak Snelders ve arkadaşları protein homoloji modelleme ile azol direncini araştırdıkları bir çalışmada²⁴, bu değişikliklerin CYP51A proteinin dış bölgelerinde olduğunu, korunmuş bölgede bulunmadığını ve proteinin biyolojik aktivitesine etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Bu polimorfizmin direnç ile ilişkisinin aydınlatılabilmesi için duyarlı ve dirençli izolatların birlikte değerlendirildiği geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Antifungal duyarlılık testleri ve Sanger dizileme yöntemiyle yapılan çalışmalar ise genotip-fenotip ilişkisini yansıtmakta yetersiz kalabilmektedir. Literatürde direnç-virülans ilişkisi yönünden birçok mikroorganizma için gösterildiği gibi, azol dirençli izolatların virülans kaybına uğradığına ilişkin bildirimler de bulunmaktadır³³. Polimorfizm saptanan bu izolatların dirençli izolatlara benzer şekilde virülans açısından da değerlendirildiği yeni çalışmalar gereklidir.

A.fumigatus'ta azol direnci *cyp51A* geninden bağımsız mekanizmalarla da oluşabilmektedir. Çalışmamızda, *cyp51A* geninin incelendiği izolatlarda direnç ile kesin ilişkili kabul edilen mutasyonların hiçbiri saptanmamıştır. Bu bulgu, *cyp51A* geninde saptanan polimorfizme ek olarak, farklı bir direnç mekanizmasının varlığı ile ilgili olasılığı akla getirmektedir. Bu olası mekanizmaların en önemlilerinden biri ATP bağlayan kaset taşıyıcıları (ABC) veya majör fasilitatör süper ailesi (MFS) gibi dışa atım pompası sistemleri aracılığıyla hücre içinde ilaç konsantrasyonunun azalmasıdır. Bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışmada, *A.fumigatus* atrF pompası itrakonazol direnci ile ilişkilendirilmiştir³⁴. Ayrıca, sterol metabolizması ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden SrbA ve HapE proteinlerinin azol direnci ile bağlantısını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır³⁵. Gelecekte tüm genom dizileme yönteminin daha yaygın kullanılması ile yeni tanımlanmış direnç mekanizmalarının aydınlatılması ve *cyp51A* geninden bağımsız olarak gelişen azol direncinin nedenlerinin ortaya çıkarılması mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak, çalışmamızda klinik ve çevresel *A.fumigatus* sensu stricto izolatlarında azol duyarlılık durumu belirlenmiştir. Klinik suşlarda itrakonazole dirençli olan izolat oranının %2.3 olduğu ve bu oranın ülkemizden başka bir merkezden daha önce rapor edilen orana göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada çevresel örneklerde, azol tarama plaklarında ve mikrodilüsyon testlerinde azol grubu ilaçlara karşı azalmış duyarlılık gösteren *A.fumigatus* izolatları da elde edilmiştir. Ancak, bu izolatların bölgesel olarak çok küçük bir alandan toplanmış olması nedeniyle, tek bir klonun tekrarlayan izolasyonunun muhtemel olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, çevresel izolatların genotipik yakın-

lıkları moleküler yöntemlerle analiz edilmemiştir. Çalışmamızda, azol MİK değeri yüksek ve düşük bir grup izolatta *cyp51A* mutasyonları araştırılmış ve literatürde direnç ile ilişkisi gösterilen mutasyonlara rastlanmamıştır. Öte yandan, hem azol MİK değeri yüksek olan izolatlarda hem de azole duyarlı sušta *cyp51A* geninde azol direnci ile ilişkisi kesin olarak gösterilmemiş bazı polimorfizmler saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin direnç durumu ile ilişkisinin anlaşılabilmesi için, tüm genom analizi çalışmalarının yararlı olabileceği düşünölmüştür. Azol direnci saptanan tüm izolatlarda mutasyon analizi yapılamamış olmasına karşın, literatürde sıklıkla bildirilmiş azol direnci ile ilişkili mutasyonlara rastlanmamış olması, ölkemiz için geçerli olan direnç mekanizmalarının araştırılmasının gerekli olacağını düşöndürmüştür. Bu nedenle, ölkemizden klinik izolatlarda yüksek direnç oranı bildiren bir raporun mevcut olduğu da göz önüne alındığında, farklı coğrafi bölgelerimizden elde edilen klinik ve çevresel *Aspergillus* izolatlarında azol duyarlılığının taranması ve direnç mekanizmalarının ortaya konması için çok merkezli ulusal çalışmaların gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamıza pozitif kontrol olarak dahil edilen TR34/L98H direnç genotipi gösteren 12868 suşu temin etmesi nedeniyle Prof. Dr. Beyza Ener'e teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ruping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs* 2008; 68(14): 1941-62.
2. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* 2010; 12(11): 1535-43.
3. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015; 70(3): 270-7.
4. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5(2): a019786.
5. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4): 1244-51.
6. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Front Microbiol* 2016; 7: 683.
7. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other Aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4545-9.
8. Ullmann AJ, Aguado JM, Arıkan-Akdaglı S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24 (Suppl 1): e1-e38.
9. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 63(4): e1-e60.
10. Vermeulen E, Cooreman S, Maertens J, Jeurissen A, Lagrou K. Azole resistance in *Aspergillus*: an emerging problem? *Acta Clinica Belgica* 2012; 67(5): 322-7.

11. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6): 1364-8.
12. Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. *Drugs* 2017; 77(6): 599-613.
13. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; 5(11): e219.
14. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; 9(12): 789-95.
15. Alanio A, Cabaret O, Sitterle E, Costa JM, Brisse S, Cordonnier C, et al. Azole preexposure affects the *Aspergillus fumigatus* population in patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(9): 4948-50.
16. Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi. *Front Microbiol* 2016; 7: 1382.
17. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 2011, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
18. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(12): 3325-33.
19. Arendrup MC, Lass-Flörl C, Hope W, Howard SJ, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST definitive document EDef 9.2. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. EUCAST, 2014. Basel, Switzerland.
20. Ozmerdiven GE, Ak S, Ener B, Agca H, Cilo BD, Tunca B, et al. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother* 2015; 21(8): 581-6.
21. van der Linden JWM, Arendrup MC, van der Lee HAL, Melchers WJG, Verweij PE. Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 2009; 52(Suppl 1): 19.
22. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(8): 2274.
23. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, Mouton JW, Barchiesi F, Arendrup MC, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(6): 681-7.
24. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJ. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(6): 2425-30.
25. Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole resistance in *Aspergillus* spp.: a worldwide problem? *J Fungi (Basel)* 2016; 2(3): 21.
26. Verweij PE, Lestrade PP, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*: beneficial or biased? *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(8): 2079-82.
27. Denning DW, Perlin DS. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol* 2011; 6(11): 1229-32.
28. Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(12): 4053-7.
29. Wiederhold NP, Patterson TF. Emergence of azole resistance in *Aspergillus*. *Semin Respir Crit Care Med* 2015; 36(5): 673-80.
30. Alvarez-Moreno C, Lavergne RA, Hagen F, Morio F, Meis JF, Le Pape P. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Sci Rep* 2017; 7: 45631.

31. Escribano P, Recio S, Pelaez T, Bouza E, Guinea J. *Aspergillus fumigatus* strains with mutations in the *cyp51A* gene do not always show phenotypic resistance to itraconazole, voriconazole, or posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5): 2460-2.
32. Liu M, Zheng N, Li D, Zheng H, Zhang L, Ge H, et al. *cyp51A*-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: illustration by a new 3D structural model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Med Mycol* 2016; 54(4): 400-8.
33. Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Snelders E, Frimodt-Moller N, Khan H, et al. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* 2010; 5(4): e10080.
34. Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* 2002; 36(3): 199-206.
35. Willger SD, Puttikamonkul S, Kim KH, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 2008; 4(11): e1000200.