

İN VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ: STANDARDİZASYON VE KLİNİK ÖNEMİ

IN VITRO ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTS: STANDARDIZATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE

Beyza ENER*

Özet: Son 10-15 yıldır mantar enfeksiyonlarının insidansındaki artış, etyolojik etkenlerde direnç görülmeye başlanması ve yeni antifungal ilaçların kullanıma girmesi antifungal duyarlılık testlerine ilginin artmasına yol açmıştır. Bu derlemenin amacı NCCLS tarafından geliştirilen referans antifungal duyarlılık testinin standardizasyonunu özetlemek, farklı yöntemleri tartışmak ve antifungal duyarlılık testlerinin klinik önemi ve değeri hakkında bilgi vererek bundan sonraki aşamalarda izlenmesi gereken yollar hakkında fikirler oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Antifungal duyarlılık testleri, standardizasyon.*

Summary: Substantially increased fungal infections over the past 10-15 years, the emergence of resistance of availability of new antifungal drugs have resulted in increased attention to antifungal susceptibility tests. In this article, standardization of the reference in vitro antifungal susceptibility test proposed by NCCLS, discussion of different methods and clinical significance and value of antifungal susceptibility tests were reviewed.

Key words: *Antifungal susceptibility tests, standardization.*

G İ R İ Ş

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarının insidansında önemli artışlar görülmektedir. Bu artış özellikle hematolojik maliniteli hastalarda, yaşam sürelerinin uzaması nedeniyle barizdir. Akut lösemili hastaların otopsileri sonucu elde edilen verilere göre 1954-1958 yılları arasında bu hastalarda % 10 olan oran, 1959-1964 yıllarında % 30 civarına çıkmıştır¹. Bunun ötesinde genel olarak hastanelerde geniş etkili antibiyotiklerin, yapay protezlerin daha fazla kullanılması, uzun süren operasyonların, kemik iliği ve solid organ transplantasyonlarının daha fazla yapılması insidansı artıran diğer önemli faktörlerdir. CDC verilerine göre ABD'de 1980-1990 yılları arasında tesbit edilen nozokomiyal patojenlerin % 7.9'unu mantarlar oluşturmaktadır².

* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Mantar enfeksiyonlarının insidansında görülen bu belirgin artışla beraber, bu enfeksiyonlara sebep olan mantar türlerinin çeşitliliğinde de değişiklikler olmaya başlamıştır. Endojen kaynaklı olması nedeniyle halen nozokomiyal fungal enfeksiyonlarda % 72-79 oran ile ilk sırayı *Candida* türleri almakta^{2,3} ancak antifungal tedaviye daha zor yanıt verdiği bilinen *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* gibi *C.albicans* dışı türlerle karşılaşma oranı hızla artmaktadır^{4,5}. Bunun dışında çeşitli hastalarda ve tekrarlayan orofaringeal kandidoz atakları nedeniyle sık olarak antifungal tedavi alan HIV (+) hastalarda zamanla *C.albicans* suşlarında da direnç görülmeye başlanmıştır⁶⁻¹⁰. *Candida* türleri dışında önceleri patojen olarak tanımlamadığımız *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, dematiaceous mantarlar gibi cinsler tedavide oluşturdıkları problemler nedeni ile gittikçe artan öneme sahip olmaya başlamışlardır.

Bilindiği gibi fungal enfeksiyonların tedavisinde 1950'li yıllarda kullanıma giren amfoterisin B'nin yeri tartışmasızdır. Bilinen en toksik ilaç olan amfoterisin B, her ne kadar her mantar türüne etkili olmasa da uzunca bir süre alternatifsiz olarak kullanılmıştır. Ancak fırsatçı mantar enfeksiyonlarının insidansındaki artışa paralel olarak son on yılda sistemik aktivitesi olan yeni antifungal ajanlar da geliştirilmiştir. Bugün için fungal enfeksiyonlarda kullanılabilecek sistemik etkili lisanslı 6 antifungal ajan bulunmaktadır. Bunlar poliyen grubundan amfoterisin B, imidazollerden mikonazol ve ketokonazol, triazollerden flukonazol ve itraconazol ve primidin sentez inhibitörü olan flusitozindir¹¹.

Yukarıda bahsedildiği gibi, fungal patojenlerin giderek artan klinik problem oluşturmaları, dirençli suşların görülmeye başlaması ve sistemik etkili antifungal ajanların sayısının artması in vitro antifungal duyarlılık testlerine ilginin artmasına neden olmuştur. In vitro antifungal duyarlılık testleri, antibakteriyel duyarlılık testleri ile karşılaştırıldığında standardizasyonu daha tamamlanmamış, klinik önemi ve yararlılığı daha tam olarak bilinmeyen testlerdir. Bu derlemenin amacı bu konudaki gelişmeleri ve standardizasyon çalışmalarını özetlemek ve bu testlerin klinikte kullanılabilirliğini tartışarak çeşitli öneriler oluşturmaktadır.

İN VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİNİN STANDARDİZASYONU

Makrodilüsyon Yöntemi : Bilindiği gibi ökaryotik mikroorganizmalar olan mantarlarla duyarlılık çalışmaları yapmak bakterilere göre çok daha zordur. Bunun, yavaş üreme hızı, dimorfizm gibi mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan, zor çözünme, ısı, pH ve ışıktan etkilenme gibi antifungal ajanlardan kaynaklanan ve standart olmayan çeşitli test metodlarından kaynaklanan birçok nedeni vardır. Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda buyyonda dilüsyon (makrodilüsyon ve mikrodilüsyon), agarda dilüsyon ve difüzyon yöntemleri (disk ve E testi gibi) gibi bakterilere uygulanan hemen hemen bütün yöntemler mantarlar için de uygulanmıştır. Ancak son 4-5 yıla kadar bu yöntemler çalışanların ve laboratuvarların isteği ve imkanlarına göre rastgele seçilmiş ve hiçbir standardizasyon gözetilmemiş, elde edilen sonuçlar ise herhangi bir katkı sağlamamıştır. Tüm bu problemleri çözmek için 1982 yılında ABD'de bir komite kurulmuş ve bu komite işe bir anket çalışması yaparak başlamıştır. 200 yataktan daha fazla yatak kapasitesi olan

hastane laboratuvarlarına yapılan sorgulamada en fazla tercih edilen metodun makrodilüsyon yöntemi olduğu anlaşılmış ve bu yöntemin standardizasyonuna gidilmesine karar verilmiştir¹². Bu yöntem aynı laboratuvarlarda birçok kez ve çeşitli laboratuvarlarda farklı kişiler tarafından denendiğinde laboratuvar içi uyumun iyi olduğu laboratuvarlar arası uyumun ise kötü olduğu görülmüş, ancak laboratuvarlar arası sonuçlar farklı da olsa suşların duyarlılık-dirençlilik sınırları değişmediği için yöntemin standardize edilebileceğine karar verilmiştir^{12, 13}. Yaklaşık 10 yıl süren ve birçok parametrenin denendiği çalışmalar sonucunda 1992 yılında NCCLS tarafından referans bir yöntem açıklanmıştır¹⁴. Kesin olarak bilinmesi gereken, bu referans yöntemin yalnızca *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için standardize edildiği, bifazik ya da küf mantarları için uygun olmadığı ayrıca in vitro sonuçlarla hastanın tedaviye yanıtı arasında kesin bir korelasyonun bulunmadığıdır. Ancak bu yöntem, laboratuvar içi ya da laboratuvarlar arasında daha önceden görülen uyumsuz sonuçların çok aza indirilmesi ile standardizasyonda büyük aşama kaydedilmesini sağlamıştır. Bundan sonraki aşama, yöntemi diğer mantar türlerine de uyarlayabilmek ve daha önemlisi hastanın tedaviye yanıtı hakkında yönteme dayanarak fikir yürütebilecek duruma gelmektir. Referans yöntemde kullanılan antiungal ajanlar amfoterisin B, flusitozin, ketokonazol ve flukonazoldür. Besiyeri olarak 0.165 M MOPS (morpholinopropanesulfonic asit) ile tamponlanmış pH'sı 7.0 olan RPMI sentetik besiyeri önerilir. İnokulum miktarı spektrofotometrik olarak ayarlanır ve 530 nm'de McFarland 0.5 tüpünün verdiği geçirgenlikle aynı geçirgenliği veren maya süspansiyonunun 1/2000 kez sulandırılması ile elde edilen yaklaşık $0.5 \times 10^3 - 1.5 \times 10^3$ /ml'lik yoğunluk kullanılır. İnkübasyon ısısı olarak 35 °C, inkübasyon süresi olarak ise *Candida* türleri için 48 saat *C. neoformans* için 72 saat önerilmektedir. MİK (minimal inhibitör konsantrasyon) değeri olarak amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, flusitozin ve azoller için ise üremenin % 80 inhibe olduğu en düşük konsantrasyonun alınması uygun bulunmuştur. Flusitozin ve azol grubu antifungallerde görülen kısmi inhibisyon nedeniyle bazı laboratuvarlar üremenin tamamen kesildiği bazı laboratuvarlar ise üremenin azaldığı konsantrasyonları MİK değeri olarak aldıkları için çok farklı sonuçlar ortaya çıkmış, sorun ancak bu şekilde çözülebilmıştır¹⁵.

Referans yöntem kullanılarak çok merkezli (13 merkez) yapılan geniş bir çalışmada laboratuvarlar arası uyum % 85 olarak bulunmuştur¹⁶.

Mikrodilüsyon Yöntemi : Referans yöntem büyük ölçüde in vitro standardizasyonu sağlasa da oldukça zaman alıcı, fazla malzeme kullanımına neden olan ve dolayısı ile daha pahalı ve rutin laboratuvar hizmetleri içinde uygulaması zor olan bir yöntemdir. Bu nedenle 1992 yılından sonra ilgi mikrodilüsyon yöntemine olmuş ve çalışmaların çoğu mikrodilüsyon yönteminin standardizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Prensipte olarak mikrodilüsyon yöntem referans yöntemle aynıdır ve daha az miktarlarla çalışılan bir uyarlamasıdır. Mikrodilüsyon yönteminde de referans yönteme benzer şekilde karşılaşılan en önemli sorun MİK değerlerini tesbit etmededir. Özellikle yine azol grubu antifungal ilaçlarda bu zorluk oldukça belirgindir. Yapılan çeşitli çalışmalarda MİK değerini okumak

için vizüel, spektrofotometrik ve kolorimetrik olmak üzere farklı yollar denenmiştir¹⁷⁻¹⁹. Vizüel okumada kuyucuklardaki bulanıklığın kontrol kuyusundaki bulanıklığa göre azalması gözle değerlendirilerek MİK tayin edilir. Bunun için bir skorlama geliştirilmiştir. Skorlamaya göre +4; bulanıklıkta hiç azalmama, +3; bulanıklıkta hafif bir azalma, +2; bulanıklıkta belirgin azalma, +1; bulanıklıkta çok azalma ve 0; optik olarak berrak anlamına gelmektedir. Buna göre MİK değeri amfoterisin B için 0, flusitozin ve azoller için ise genellikle +2 değeri olarak alınmaktadır. Bu yöntem kullanılarak yapılan oldukça geniş çaplı bir çalışmada (273 suş), sonuçların 48. saatte değerlendirilmesi sonunda referans yöntemle flukonazol için % 92, itrakonazol için % 85.7, flusitozin için % 98.3 ve amfoterisin B için % 96.4'lük uyum elde edilmiştir²⁰. Tarafımızdan yürütülen bir çalışmada ise bu uyum hem flukonazol hem de amfoterisin B için benzer şekilde % 89.7 olarak bulunmuştur (yayınlanmamış veri).

Mikrodilüsyon yönteminin daha kolay olması ve daha az malzeme kullanılarak yapılması üstünlükleri yanı sıra 24 saatte sonuç alınabileceği düşünülmüş ve bu amaçla MİK değerlendirilmesi yapılırken spektrofotometrik ya da kolorimetrik okuma gibi yeni alternatifler gündeme gelmiştir. Spektrofotometrik okumada kontrol kuyusuna göre bulanıklığın amfoterisin B için % 90, flukonazol için % 50-70 oranında azaldığı kuyular MİK olarak alınmaktadır. Yapılan bir çalışmada, RPMI besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun % 2'ye çıkarılması, inokulum miktarının da 10^4 /ml olması durumunda spektrofotometre ile 24. saatte okuma yapılabildiği ve referans yöntem ile % 97.7'lik uyumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir¹⁸. Kolorimetrik yöntemde ise ortama bir oksidasyon redüksiyon indikatörü konmakta ve oluşan renk değişimi ile üremenin olmadığı kuyucuk bulunmaktadır. Bu prensibi temel alarak yapılan çalışmalarda oksidasyon redüksiyon indikatörü olarak alamar mavisi denen bir madde sisteme eklenmiştir. Başlangıçta mavi olan bu madde üreme olduğu zaman pembeye dönüşmektedir. Dolayısı ile renk değişikliklerini takip ederek MİK değerini bulmak kolaylaşmaktadır. Kolorimetrik yöntem denenerek yapılan geniş çaplı bir çalışmada (134 suş) 24. saatte okumada referans yöntemle % 83.1'lik uyum elde edilmiş ve bu uyum 48. saatte okumadan daha yüksek bulunmuştur²¹. Ayrıca kolorimetrik yöntemin çok merkezli olarak denendiği bir çalışmada laboratuvarlar arası uyumun da oldukça iyi olduğu gösterilmiştir¹⁹. Benzer şekilde ülkemizde yapılan bir çalışmada alamar mavisi yerine bir tetrazolyum tuzu olan MTT boyası indikatör olarak kullanılmış ve bu şekilde çalışılan mikrodilüsyon yönteminin referans yöntemle 24. saatte 48. saatten daha iyi olarak % 88.9 oranında uyumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır²².

Diğer Yöntemler : Tüm bu çalışmaların dışında antifungal duyarlılığı ölçmeye yönelik disk difüzyon, çeşitli firmalar tarafından üretilen bazı ticari kitler, flow sitometrenin ya da otomatize kan kültür sistemlerinin kullanıldığı çeşitli yöntemler vardır²³⁻²⁵. Ancak tüm bu yöntemler çok dar kapsamlı ve kontrolsüz olarak çalışıldığı için herhangi bir yorum yapmak ya da sonuca gitmek olanaksızdır.

İN VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ VE YARARLILIĞI

Bilindiği gibi antimikrobik duyarlılık testlerinin amacı hastaya uygulanacak olan tedavide yol gösterici olması ve tedavi sonucu hakkında yorum yapabilmesidir. Bu amaca antibakteriyal duyarlılık testlerinde büyük ölçüde ulaşılmasına rağmen yukarıda da bahsedildiği gibi antifungal duyarlılık testlerinde henüz in vitro in vivo uyum tam değildir. Bu uyumu sağlayabilmek ve bu aşamadaki bir standardizasyonla ne ölçüde yarar sağlanabileceği aşağıda özetlenmiştir.

1. Karşılaşılan önemli sorunlardan birisi antifungal ilaçların duyarlılık ya da dirençlilik sınırlarının (break point) tam olarak belirlenememiş olmasıdır. Bazı klasik kitaplarda ve yayınlarda bu nokta ile ilgili bilgiler olsa da genellikle verilen değerler çok sayıda suşla yapılan çalışmalardan elde edilen MİK aralıkları olup kesin yorum yapılamamaktadır²⁵. Klasik amfoterisin B'nin bilinen yan etkileri nedeni ile yüksek dozlarda kullanılamaması ve uygulanabilen maksimum dozda ulaşılan en yüksek kan seviyesinin 2 µg/ml olması nedeniyle hemen hemen çoğu kaynakta direnç sınırı olarak > 2 µg/ml değeri alınmaktadır. Ancak bilindiği gibi son yıllarda kullanıma giren amfoterisin B'nin lipid formülleri ile çok daha yüksek dozlara çıkılabilmekte ve klasik kullanımda dirençli olabilen bir suş duyarlı hale gelebilmektedir. Benzer sorun flukonazol için de geçerlidir. Birçok çalışmada direnç sınırı olarak 8-20 µg/ml gibi farklı değerler alınmaktadır^{6, 26-28}. Oysa 1600 mg/gün dozuna kadar çıkılabildiğinden bahsedilen flukonazolün etkisiz olduğu birçok durumda yüksek dozda etkili olunabilmektedir⁸.

2. Yukarıda açıklanan, dirençlilik sınırında yaşanan bu problem nedeniyle rutin olarak laboratuvarların antifungal duyarlılık testlerini uygulamaları doğru değildir. Ancak sınırlandırılmış hasta gruplarında (hematolojik maliniteli hastalar, hemodiyaliz hastaları, yenidoğanlar gibi) klinik uyumu takip ederek ve referans yöntem kullanılarak planlanan çalışmalarda açıklık olan bu noktada ilerlemeler elde edileceğine inanılmaktadır. Ülkemizde bugüne kadar yapılan basılı çalışmalarda (ulaşılabildiği ölçüde) referans yöntemin kullanıldığı sadece iki çalışmaya rastlanıldı. Bunlardan bir tanesi yukarıda bahsedildiği gibi yöntem karşılaştırılmasına yönelik bir çalışma olup²², diğerinde ise izole edilen suşların hasta grubu ve kaynakları hakkında bilgi bulunmamakta idi²⁹.

3. Son yıllarda önem kazanan mikrodilüsyon yönteminin ülkemizde de yaygın kullanılması için çok sayıda kökenle çok merkezli yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Kanımızca ülkemiz koşullarında ancak bu tür çalışmalarla mikrodilüsyon yöntemi hakkında detaylı bilgi edinilecektir.

4. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikoloji bölümlerinin artık mutlaka klinik önemi olan suşlarda tür tayinini rutin olarak yapması gerekmektedir. Gerek ülkemizdeki çalışmalar gerek dünya literatürlerinden elde edilen verilere göre antifungal tedavide farklı türlerin tedaviye yanıtı farklı olmakta, örneğin *C.albicans* birçok antifungale duyarlı iken *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.topicalis* gibi türlerde doğal ya da kazanılmış direnç bulunabilmektedir^{4, 30}.

Dolayısı ile in vitro duyarlılık sonucu ne olursa olsun eğer herhangi bir ilaca karşı doğal direnç olduğunu bildiğimiz bir suşla enfeksiyon oluşmuşsa vakit kaybetmeden ilacı değiştirmeyi planlamamız gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anaissie E: Opportunistic mycosis in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review. *CID* 1992, 14 (Suppl 1): 43-53.
2. Edwards JE, Filler SG: Current strategies for treating invasive candidiasis: emphasis on infections in nonneutropenic patients. *CID* 1992, 14 (Suppl 1): 106-113.
3. Pfaller MA: Epidemiological typing methods for mycosis. *CID* 1992, 14 (Suppl 1): 4-10.
4. Wingard JR: Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *CID* 1994, 19 (Suppl 1): 49-53.
5. Iwen PC, Kelly DM, Reed EC, Hinrich SH: Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *CID* 1995, 20: 342-347.
6. LeGuenec R, Reynes J, Mallie M, Pujol C, Janbon F, Bastide JM: Fluconazole and itraconazole resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: Multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 2732-2737.
7. Millon L, Manteaux A, Reboux G, et al: Fluconazole resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1115-1118.
8. Redding S, Smith J, Farinacci G, et al: Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: Documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *CID* 1994, 18: 240-242.
9. McCullough M, Ross B, Reade P: Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 696-700.
10. Bilgen H, Özek E, Korten V, Ener B, Malbay D: Treatment of systemic neonatal candidiasis with fluconazole. *Infection* 1995, 23: 294.
11. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA: Antifungal agents and susceptibility testing, p. 1405-14. In Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 1995, 6th ed. ASM Press, Washington DC.
12. Calhoun DL, Roberts D, Galgiani JN, et al: Result of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1986, 23: 298-301.
13. Galgiani JN, Reiser J, Brass C, Espinel-Ingroff A, Gordan AM, Kerkering TM: Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1987, 31: 1343-1347.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts. Proposed standard, Document M-27-P, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova 1992.
15. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani J: Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993, 6: 367-381.
16. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, et al: Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility tests for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993, 37: 39-45.
17. Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, et al: Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992, 30: 3138-3145.

18. Espinel-Ingroff A, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV: Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference microdilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole resistant and susceptible isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 3154-3158.
19. Pfaller MA, Vu Q, Lancaster M, et al: Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1625-1628.
20. Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi G: Comparative study of broth microdilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 2494-2500.
21. To WK, Fothergill AW, Rinaldi MG: Comparative evaluation of microdilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 2660-2664.
22. Gülay Z, Yuluğ N: Antikandidal duyarlılık testlerinde yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül* 1995, 29: 179-188.
23. Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y: Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993, 12: 336-342.
24. Green L, Petersen B, Steimel L, Haerber P, Current W: Rapid determination of antifungal activity by flowcytometry. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1088-1091.
25. Hazen KC, Chery MP, Yongmoon H: Potential use of BacT/Alert automated blood culture system for antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 848-850.
26. McGinnis MR, Rinaldi MG: Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids, p. 223-269. In Lorian V (ed), *Antibiotics in laboratory medicine*. 1986, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
27. Dermoumi H: In vitro susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B. *Chemotherapy* 1994, 40: 92-98.
28. Ruhnke M, Eigler A, Engelmann E, Geiseler B, Trautmann M: Correlation between antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from patients with HIV infection and clinical results after treatment with fluconazole. *Infection* 1994, 22: 132-136.
29. Gün H, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baysallar M: Klinik örneklerden patojen etken olarak izole edilen *Candida* suşlarının sistemik etkili antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1993, 4: 181-192.
30. Akova M, Akalın EH, Uzun Ö, et al: Efficacy of fluconazole in the treatment of upper gastrointestinal candidiasis in neutropenic patients with cancer: Factors influencing the outcome. *Clin Infect Dis* 1994, 18: 298-304.