

ANTİFUNGAL DUYARLILIĞIN SAPTANMASINDA E TEST YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mine YÜCESOY, Esvet MUTLU, Nuran YULUĞ

ÖZET

Bu çalışma, antifungal duyarlılığın saptanmasında E testinin değerlendirilmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 77 *C.albicans* suşunun amfoterisin B'ye ve bunlardan 75'inin flukonazole duyarlılığı NCCLS M-27A kriterlerine uygun olarak mikrodilüsyon ve E test yöntemleri ile çalışılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi sonuçları 48 saat sonra gözle okunarak amfoterisin B'nin üremeyi tam inhibe ettiği, flukonazolün ise belirgin inhibisyon sağladığı nokta MİK olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca flukonazol sonuçları 492 nm boyunda spektrofotometrede okutulmuş ve kontrol kuyucuğuna göre en az % 50 ve % 75 inhibisyon sağlayan noktalar da belirlenmiştir. E test yöntemi ise amfoterisin B için MOPS ile, flukonazol için ise fosfat tampon ile tamponlanmış, % 2 glukoz eklenmiş RPMI 1640 agar kullanılarak çalışılmış ve MİK değerleri hem 24 hem de 48 saat sonra değerlendirilmiştir. Daha sonra sonuçlar karşılaştırılmış ve ± 2 dilüsyon içindeki MİK değerleri belirlenerek % tutarlılık saptanmıştır. Buna göre amfoterisin B için 24 ve 48 saatteki tutarlılık oranı % 85.7 olarak bulunmuştur. Flukonazol için ise gözle değerlendirme sonuçlarında 24 ve 48 saatlerdeki tutarlılık oranları sırasıyla % 64.0 ve % 62.8'dir. Flukonazolün spektrofotometrik sonuçlarından % 75 inhibisyon kriteri dikkate alındığında, bu oranlar sırası ile % 65.3 ve % 64.0, % 50 inhibisyon kriteri dikkate alındığında ise % 73.3 ve % 62.7 olarak belirlenmiştir. Sonuçların duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olma durumları dikkate alındığında tutarlılık oranları amfoterisin B için 24 ve 48 saatte % 98.7 ve % 93.5 şeklinde olmaktadır. Flukonazol için ise bu oranlar farklı değerlendirme kriterlerine göre 24 saatte % 88.0 ile % 96.0 arasında, 48 saatte ise % 80.0 ile % 90.7 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, uygulanması kolay E test yönteminin antifungal duyarlılığın belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemine bir alternatif olabileceğini, özellikle amfoterisin B için uygun olduğunu düşünmekteyiz.

SUMMARY

Evaluation of the E test method for antifungal susceptibility testing.

This study was carried out to evaluate the E test method for the determination of antifungal susceptibility. The susceptibility of 77 *C.albicans* strains isolated from various clinical specimens against amphotericin B were investigated while the susceptibility of 75 of these strains were determined for fluconazole by E test and microdilution method according to NCCLS M27-A standards. The microdilution results were read visually after 48 hours and the endpoints which produced total inhibition and prominent decrease in turbidity were considered as MICs for amphotericin B and fluconazole, respectively. Fluconazole results were also evaluated spectrophotometrically at 492 nm and the endpoints producing 50 and 75 % inhibition were calculated. E test method was performed by using RPMI 1640 agar supplemented with 2 % glucose and buffered with phosphate buffer for amphotericin

B and with MOPS for fluconazole and MIC points were determined both after 24 and 48 hours of incubation. Then the results were compared and MIC agreement rates within ± 2 dilutions were calculated. 24 and 48 hour agreement for amphotericin B was evaluated as 85.7 %. The agreement for fluconazole visual evaluated results at 24 and 48 hours were 64.0 % and 62.8 %, respectively. When 75 % inhibition at 24 and 48 hours for the spectrophotometric results were considered, these values were determined to be 65.3 % and 64.0 %, respectively. These values were found to be 73.3 % and 62.7 % for 50 % inhibition criteria at 24 and 48 hours. With regards to the results as sensitive, dose dependent sensitive and resistant, the agreement was found to be 98.7 % and 93.5 % after 24 and 48 hours for amphotericin B, between 88.0 % and 96.0 % after 24 hours whereas between 80.0 % and 90.7 % after 48 hours for fluconazole. According to our results, we can conclude that E test which is an easy test to apply can be offered as an alternative to microdilution method for the antifungal susceptibility testing.

GİRİŞ

Fungal infeksiyonlar özellikle immün yetmezlikli olgularda önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (3). Son yıllarda tüm fungal infeksiyonlarla birlikte *Candida*'lara bağlı olarak oluşan infeksiyonlarda da belirgin bir artış izlenmiştir (11,17). Bunun yanı sıra *Candida* türlerinde hem sağaltım hem de profilaktik amaçla kullanılan antifungal ajanlara karşı direnç de bildirilmektedir (7,12,20). Tüm bu noktalar antifungal sağaltımın seçilmesi, yönlendirilmesi ve izlenmesinde Mikrobiyoloji Laboratuvarlarının önemini daha da arttırmıştır (4).

Gerek antifungal sağaltımın planlanması gerekse bölgesel direnç paternlerinin belirlenmesi için kolay uygulanabilir, klinik sonuçlar ile uyum gösteren güvenilir bir antifungal duyarlılık yöntemine gereksinim söz konusudur (5,6,19). "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) antifungal duyarlılığın belirlenmesinde standart makro ve mikrodilüsyon yöntemlerinin kullanılmasını bildirmiştir (15). Ancak bu yöntemlerin rutin uygulanabilirliği teknik olarak zor ve zaman alıcıdır. Bu açıdan daha kolay uygulanabilir ve daha basit testlerin geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (8,23).

E testi, bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan ve agar difüzyon formatında bir yöntem olup, minimal inhibitör konsantrasyon sonucu da verebilmektedir. Çalışmamız, *Candida*'lar için antifungal duyarlılığın saptanmasında E testi kullanımını değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden (25'i idrar, 21'i ağız-boğaz salgısı, 11'i vaginal-endoservikal salgı, 8'i balgam, 6'sı kan, 3'ü pü, 2'si dışkı, 1'i safra) soyutlanan toplam 77 *Candida albicans* suşunun amfoterisin B'ye, bunlardan 75'inin ise flukonazole duyarlılığı araştırılmıştır. Kalite kontrol suşları olarak ise *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 90018 ve *C.krusei* ATCC 6258 suşları kullanılmıştır.

Antifungal duyarlılık testleri: Suşların amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıkları mikrodilüsyon ve E testi yöntemleri ile çalışılmıştır.

a) Mikrodilüsyon yöntemi: Suşların amfoterisin B (Bristol-Myers Squibb) ve flukonazole (Pfizer) duyarlılıkları, 0.165 M morfolin-propan sulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış fenol kırmızılı, L-glutaminli ve sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyeri kullanılarak NCCLS M27-A kriterlerine uyularak mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir (15).

Kullanılan amfoterisin B ve flukonazol konsantrasyon aralığı sırasıyla 0.03-32 µg/ml ve 0.06-64 µg/ml şeklinde idi. Sonuçlar 48 saat sonra NCCLS önerisi doğrultusunda gözle okunarak amfoterisin B'nin üremeyi tam inhibe ettiği, flukonazolün ise belirgin inhibisyon sağladığı nokta (MİK-2 değeri) minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilmiştir. Ayrıca flukonazol sonuçları, daha objektif bir değerlendirme olabileceği düşüncesi ile spektrofotometrede 492 nm'de okutulularak da değerlendirilmiştir. Anaisie ve ark. (1) ile Tornatore ve ark. (25)'nin önerdiği kontrol kuyucuğuna göre en az % 50 ve % 75 inhibisyon sağlayan noktalar da belirlenmiştir. Amfoterisin B için belirlenen MİK değeri ≤ 1 µg/ml olanlar duyarlı, > 1 µg/ml olanlar ise dirençli; flukonazol için MİK değeri ≤ 8 µg/ml olanlar duyarlı, 16-32 µg/ml olanlar doza bağımlı duyarlı, ≥ 64 µg/ml olanlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir (15).

b) E test yöntemi: Suşların aynı antifungal ajanlara duyarlılığı, üretici firmanın önerdiği şekilde ve amfoterisin B için MOPS ile, flukonazol için ise fosfat tampon ile tamponlanmış, % 1.5 agar (Bacto-agar, Difco), % 2 glukoz eklenmiş, L-glutaminli ve sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 agar kullanılarak çalışılmıştır. 24 saatlik *C.albicans* kültürlerinden % 0.85 NaCl içinde 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanmıştır. Süspansiyonlar, eküvyonlar yardımı ile, standart kalınlıkta dökülmüş besiyeri yüzeylerine sürülmüştür. 10-15 dakika beklendikten sonra ekilmiş plaklara amfoterisin B ve flukonazol E testi şeritleri (AB Biodisk) yerleştirilmiştir. 35°C'de inkübe edilmiş ve MİK değerleri hem 24 hem de 48 saat sonra belirlenmiştir. MİK değerleri belirlenerek sonuçlar karşılaştırıldıktan sonra ara değerlerin varlığı durumlarında MİK sonuçları en yakın iki kat dilüsyona yükseltilerek de sonuçlar değerlendirilmiştir. Amfoterisin B için belirlenen MİK değeri ≤ 1 µg/ml olanlar duyarlı, > 1 µg/ml olanlar ise dirençli; flukonazol için MİK değeri ≤ 8 µg/ml olanlar duyarlı, > 8 - < 64 µg/ml olanlar doza bağımlı duyarlı, ≥ 64 µg/ml olanlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir (15).

Sonuçların değerlendirilmesi: Amfoterisin B için mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri ve flukonazol için mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen ve üç farklı şekilde değerlendirilen MİK sonuçları, E testinin 24 ve 48 saat sonuçları ile karşılaştırılmıştır. ± 2 dilüsyon içindeki MİK değerleri tutarlı kabul edilerek, % tutarlılık (uyum) saptanmıştır. Ayrıca sonuçların duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olma durumları dikkate alınarak da % tutarlılık oranları belirlenmiştir. NCCLS yöntemi referans alınarak E test için çok büyük hata (dirençli süşün duyarlı bulunması), büyük hata (duyarlı süşün dirençli bulunması) ve küçük hata (herhangi bir yöntemle orta duyarlı bulunan süşün diğer yöntemle duyarlı veya dirençli bulunması) oranları saptanmıştır.

BULGULAR

Çalışılan süşler için elde edilen MİK sınırları ile MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri tablo 1'de verilmiştir.

Görüldüğü gibi E testi ile; flukonazol için elde edilen MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri mikrodilüsyon sonuçlarına göre daha yüksek olmakla birlikte amfoterisin B için mikrodilüsyonunkiler ile benzerdir. Öte yandan *C.albicans* süşlerinin, E testi yöntemi ile çalışılmasında flukonazol için elde edilen MİK noktalarında keskin sınırlar olmaması, büyük koloniden küçük koloniye geçiş ve inhibisyon elipsinin içinde veya MİK noktasında üreme yoğunluğunda azalma gibi durumlar nedeni ile değerlendirilme aşamasında zorluklarla karşılaşmıştır. Amfoterisin B sonuçlarının değerlendirilmesinde aynı durum söz konusu olmayıp, keskin sınırlı inhibisyon zonları elde edilmiştir.

Tablo 1. Suşlar için elde edilen MİK sınırları ile MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

Antifungal ajan	Yöntem ve değerlendirme kriteri	24 saatte			48 saatte		
		MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Flukonazol	Mikrodilüsyon (gözle değerlendirme)				0.06-32	0.50	16
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme ≥% 75 inhibisyona göre)				0.064-32	0.25	8
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme % 50 inhibisyona göre)				0.06-32	0.50	16
	E test	0.09-256	1	6	0.06-256	1	256
	E test (en yakın iki kat dilüsyona yükseltilmiş olarak)	0.13-256	1	8	0.06-256	1	256
Amfoterisin B	Mikrodilüsyon				0.015-16	0.25	0.50
	E test	0.01-0.75	0.125	0.38	0.05-5	0.19	0.50
	E test (en yakın iki kat dilüsyona yükseltilmiş olarak)	0.03-1	0.13	0.50	0.06-8	0.25	0.50

E test ile elde edilen MİK değerlerinin en yakın iki kat dilüsyona yükseltilmesi ile amfoterisin B için 24 ve 48 saatteki tutarlılık oranı % 85.7 olarak bulunmuştur. Flukonazol için ise gözle değerlendirme sonuçlarında 24 ve 48 saatlerdeki tutarlılık oranları sırasıyla % 64.0 ve % 62.8'dir. Flukonazolün spektrofotometrik sonuçlarından en az % 75 inhibisyon kriteri dikkate alındığında, bu oranlar sırası ile % 65.3 ve % 64.0, % 50 inhibisyon kriteri dikkate alındığında ise % 73.3 ve % 62.7 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Mikrodilüsyon yöntemi ve E test ile belirlenen MİK sonuçları karşılaştırıldığında elde edilen tutarlılık oranları.

Antifungal ajan	Karşılaştırılan yöntemler	% tutarlılık (± 2 dilüsyon kriterine göre)	
		24 saat	48 saat
Flukonazol	Mikrodilüsyon (gözle değerlendirme) – E test	64.0	62.8
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme; ≥ % 75 inhibisyona göre) – E test	65.3	64.0
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme; % 50 inhibisyona göre) – E test	73.3	62.7
Amfoterisin B	Mikrodilüsyon – E test	85.7	85.7

Sonuçların, NCCLS kriterlerine göre duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olma durumlarına göre değerlendirilmesinde elde edilen tutarlılık oranları tablo 3'de gösterilmiştir. Tutarsız sonuçlar incelendiğinde saptanan çok büyük hata, büyük hata ve küçük hata oranları tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 3. Sonuçların duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olma durumlarına göre tutarlılık oranları.

Antifungal ajan	Karşılaştırılan yöntemler	% tutarlılık (duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli kriterine göre)	
		24 saat	48 saat
Flukonazol	Mikrodilüsyon (gözle değerlendirme) - E test	89.3	80.0
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme; \geq % 75 inhibisyona göre) - E test	96.0	80.0
	Mikrodilüsyon (spektrofotometrik değerlendirme; % 50 inhibisyona göre) - E test	88.0	90.7
Amfoterisin B	Mikrodilüsyon - E test	98.7	93.5

Tablo 4. Sonuçların duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olma durumları göz önüne alındığında saptanan çok büyük, büyük ve küçük hata oranları.

Antifungal ajan ve değerlendirme	24 saat			48 saat		
	Çok büyük hata n(%)	Büyük hata n(%)	Küçük hata n(%)	Çok büyük hata n(%)	Büyük hata n(%)	Küçük hata n(%)
Flukonazol						
Gözle değerlendirme	-	2 (2.7)	8 (10.7)	-	8 (10.7)	11 (14.7)
\geq % 75 inhibisyon	-	2 (2.7)	3 (4.0)	-	11 (14.7)	6 (8.0)
% 50 inhibisyon	-	1 (1.3)	10 (13.3)	-	10 (13.3)	9 (12.0)
Amfoterisin B	1 (1.3)	-	-	2 (2.6)	2 (2.6)	-

TARTIŞMA

Mayaların antifungal duyarlılık testlerinde agar bazlı tekniklerin kullanılması yaygın bir şekilde denenmektedir. Bunun nedenlerinin başında agar bazlı yöntemlerin kolay uygulanabilir olması ile özel ve pahalı aletlere gereksinim duyulmaması gelmektedir. Ancak bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin inokulum, ısı ve inkübasyon zamanının iyi standardizasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir (19). Bu çalışmada agar difüzyon bazlı yöntemlerden biri olan E testi, *C.albicans* suşlarının flukonazol ve amfoterisin B'ye duyarlılıklarının saptanmasında değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, E testi ile flukonazol için elde edilen MİK, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri mikrodilüsyon sonuçlarına göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu durum daha önce-

ki çalışma bulguları ile paralel doğrultudadır (5,6,14,16,19,21,28). Bu antifungal ajanın E testi ile MİK noktalarının belirlenmesinde, bu noktalarda keskin sınırlar olmaması, büyük koloniden küçük koloniye geçiş ve inhibisyon elipsinin içinde veya MİK noktasında türeme yoğunluğunda azalma gibi durumlar nedeni ile değerlendirilme aşamasında zorluklarla karşılaşmıştır. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da bildirilmiş olup, bu durumun özellikle *C.albicans* ve *C.tropicalis* suşlarında daha fazla oranda izlendiği belirtilmiştir (2,6,10,14,18,26,28). Çalışmamızda, E testi ile MİK noktalarının belirlenmesinin 24 saatlik inkübasyondan sonra daha kolay ve net olduğu, 48 saat sonra ise değerlendirmede daha fazla zorluk yaşandığı saptanmıştır. Bu bulgumuz Van Eldere ve ark. (26) ile Colombo ve ark. (5)'nin çalışma sonuçları ile aynı doğrultudadır.

Çalışmamız sonuçlarına göre flukonazol için elde edilen MİK noktaları dikkate alındığında farklı değerlendirme yöntemlerine bağlı olmak üzere mikrodilüsyon ile E test yöntemi arasında 24 saatte % 64-73.3; 48 saatte ise % 62.7-64 oranlarında tutarlılık söz konusudur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, *C.albicans* suşları için flukonazol açısından E testi ile NCCLS standartlarına uygun çalışılan makrodilüsyon arasında % 84-96 (6,27), mikrodilüsyon arasında ise % 74.7-95 (5,14,18) oranlarında tutarlılık bildirilmiştir. Tüm *Candida* suşları dikkate alındığında ise her iki yöntem ile E testi arasındaki tutarlılık oranları % 78-96 (9,13,18,22,24,26) arasında değişmektedir. Bizim sonuçlarımız bu oranlardan daha düşük olup, bu durum flukonazol MİK değerlerinin E testi ile belirlenmesindeki subjektiflik ve zorluktan kaynaklanabilir. Suşlar için elde edilen sonuçlar duyarlılık ve dirençlilik durumlarına göre karşılaştırıldığında ise bu oranlar % 80-96 rakamlarına yükselmektedir. Bu değerler de Martin-Mazuelos ve ark. (14)'nin *C.albicans* suşları için elde ettikleri % 80'lik oran ile paraleldir. Çalışmamızda E testi sonuçlarında flukonazol için 24 ve 48 saatte çok büyük hata izlenmez iken, 24 saat sonuçlarında % 1.3, % 2.7 oranlarında büyük, % 4 ve % 13.3 oranlarında küçük hata; 48 saat sonuçlarında ise % 10.7, %14.7 ve % 8, % 14.7 oranlarında sırasıyla büyük ve küçük hatalar gözlenmiştir. Belirtilen çalışmada *C.albicans* suşlarının E testi ile saptanan flukonazol sonuçlarında % 3.8, % 3.6 ve % 12.5 oranlarında çok büyük, büyük ve küçük hatalar saptanmıştır (14). Sonuçlarımız bu çalışmanınkiler ile benzer olup, farklı olarak bizde çok büyük hata izlenmemiştir. Öte yandan Dannaoui ve ark. (9) E testi ile belirlenen flukonazol MİK değerleri ile klinik sonuçlar arasında iyi oranda korelasyon olduğunu saptamıştır.

Amfoterisin B için saptanan MİK noktaları dikkate alındığında mikrodilüsyon ile E test yöntemleri arasında 24 ve 48 saatte % 85.7 oranında tutarlılık söz konusudur. Wanger ve ark. (27) makrodilüsyon yöntemi ile E testini *C.albicans* suşları için karşılaştırmış ve % 96 oranında bir tutarlılık belirlemiştir. Tüm *Candida* suşlarının dahil edildiği çalışmalarda amfoterisin B için mikro ve makrodilüsyon yöntemlerinin E testi ile karşılaştırıldığı durumlarda elde edilen oranlar % 59.5-93.1 arasındadır (13,26,29). Bizim rakamlarımız da diğer çalışmalarda elde edilen oranlarla benzerdir. Öte yandan suşların duyarlı, dirençli olma durumlarına göre değerlendirmede ise bu rakamlar % 93.5-98.7'ye çıkmaktadır. Tutarlılık oranları dikkate alındığında E testin *Candida* suşlarının amfoterisin B'ye duyarlılığının belirlenmesinde uygun bir yöntem olabileceği söylenebilir. Bu konu ile ilgili bir başka nokta da E testi ile amfoterisin B duyarlılığının belirlenmesinin amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli suşları ayırt etmede diğer yöntemlere göre daha üstün olduğunun bildirilmiş olmasıdır (27).

Candida suşlarının amfoterisin B ve flukonazole duyarlılığının belirlenmesinde referans yöntemlere alternatif olabileceği izlenen E testinin kolay ve kısa sürede uygulanabilmesi, basit olması, ek alete gereksinim göstermemesi, 24 saatte sonuç verebilmesi ve rutin çalışmaya uygun olması önemli avantajlarıdır. Öte yandan diğer yöntemlere göre daha pa-

halı olması ve flukonazol sonuçlarının değerlendirilmesinde karşılaşılan zorluklar da dezavantajları olarak görülmektedir.

Sonuçlarımız doğrultusunda; E test yöntemi ile *C.albicans* suşlarının flukonazol ve amfoterisin B'ye duyarlılık sonuçlarının 24 saat sonra verilebileceğini, uygulanması kolay E test yönteminin, MİK sonuçları açısından bakıldığında amfoterisin B için; duyarlı ve dirençli kategorisine göre bakıldığında ise her iki antifungal ajan için duyarlılığın belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemine bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Anaissie E, Paetznick V, Bodey GP: Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading, *Antimicrob Agents Chemother* 25: 1641 (1991).
- 2- Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Moller NF: Comparison of E test and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates, *J Antimicrobial Chemother* 47: 521 (2001).
- 3- Benarjii SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarwis WR, Horan T, Edwards JR, Tolsan J, Henderson T, Martone WJ: Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989, *Am J Med* 91: 86S (1991).
- 4- Chang HC, Chang JJ, Chan SH, Huang AH, Wu TL, Lin MC, Chang TC: Evaluation of E test for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures, *J Clin Microbiol* 39: 1328 (2001).
- 5- Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG: Evaluation of the E test system versus a microtitre broth method for antifungal susceptibility testing of yeasts against fluconazole and itraconazole, *J Antimicrobial Chemother* 36: 93 (1995).
- 6- Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG: Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing, *J Clin Microbiol* 33: 535 (1995).
- 7- Conly J, Rennie R, Johnson J, Farah S, Hellmann L: Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*, *J Infect Dis* 165:761 (1992).
- 8- Cornican MG, Pfaller MA: Standardization of antifungal susceptibility testing, *J Antimicrob Chemother* 38: 561 (1996).
- 9- Dannaoui E, Colin S, Pichot J, Piens MA: Evaluation of the E test for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 228 (1997).
- 10- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME, Jones RN: Interlaboratory evaluation of E test method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2 % glucose, *J Clin Microbiol* 34: 848 (1996).
- 11- Karlowsky JA, Zhannel GG, Klym KA, Hoban DJ, Kabani AM: Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996, *Diagn Microbiol Infect Dis* 28: 5 (1997).
- 12- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Einsele H: Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients, *Lancet* 348: 1523 (1996).
- 13- Koç AN, Gökahmetoğlu S, Oğuzkaya M: Comparison of E test with the broth microdilution method for susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals, 6th Scientific Meeting of European Society of Chemotherapy-Infectious Diseases, Abs No. B2, p. 73, İstanbul (1999).

- 14- Martin-Mazuélos E, Gutierrez MJ, Aller AI, Bernal S, Martinez MA, Montero O, Quindos G: A comparative evaluation of E test and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp, *J Antimicrobial Chemother* 43: 477 (1999).
- 15- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, Approved Standard, NCCLS Document M27-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (1997).
- 16- Odds FC: Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance, *J Antimicrob Chemother* 6: 749 (1980).
- 17- Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP: National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program, *Diagn Microbiol Infect Dis* 31: 327 (1998).
- 18- Pfaller MA, Messer SA, Karlsson A, Bolmström A: Evaluation of the E test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different media, *J Clin Microbiol* 36: 2586 (1998).
- 19- Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN: Antifungal susceptibility testing, *Clin Microbiol Rev* 6: 367 (1993).
- 20- Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA: Resistance of *Candida* species to fluconazole, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1 (1995).
- 21- Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Engelmann E, Trautmann M: Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy, *J Clin Microbiol* 34: 208 (1996).
- 22- Schmalreck AF, Kottmann I, Reiser A, Ruffer U, Scharr E, Vanca E: An evaluation of seven methods of testing in vitro susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole, *Mycoses* 38: 359 (1995).
- 23- Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL: Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole, *J Clin Microbiol* 32: 2009 (1994).
- 24- Simor AE, Goswell G, Louie L, Lee M, Louie M: Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbroth dilution and the E test, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 693 (1997).
- 25- Tornatore MA, Noskin GA, Hacek DM, Obias AA, Peterson LR: Effects of incubation time and buffer concentration on in vitro activities of antifungal agents against *Candida albicans*, *J Clin Microbiol* 35: 1473 (1997).
- 26- Van Eldere J, Joosten L, Verhaeghe A, Surmont I: Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test, *J Clin Microbiol* 34: 842 (1996).
- 27- Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JN: Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2520 (1995).
- 28- Warnock DW, Johnson EM, Rogers TRF, BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy: Multi-centre evaluation of the E test method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*, *J Antimicrob Chemother* 42: 321 (1998).
- 29- Yeğenoğlu Y, Erturan Z, Anđ Ö, Uzun M: Comparison of E test and microbroth dilution for antifungal susceptibility testing of yeasts. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Abstract no:P361, p.80, Lausanne (1997).