

HASTANE KAYNAKLI *CANDIDA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNLERİ

BIOFILM PRODUCTION AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF *CANDIDA* SPECIES ISOLATED FROM HOSPITALIZED PATIENTS

**Müge DEMİRBİLEK¹, Funda TİMURKAYNAK², Füsün CAN¹
Özlem AZAP², Hande ARSLAN¹**

ÖZET: Biyofilm oluşturan *Candida* suşları immün sisteme ve antimikrobiyal ilaçlara daha dirençlidir ve bu da tedavi başarısını düşürmektedir. Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun araştırılması ve biyofilm oluşumunun antifungal duyarlılık paternleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Değişik klinik örneklerden (kan, steril vücut sıvıları, mukoza ve cilt lezyonu örnekleri) izole edilen 79 *C.albicans*, 37 *albicans* dışı *Candida* olmak üzere toplam 116 *Candida* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu suşların flukonazol, itraconazol, amfoterisin B ve kaspofungin in vitro duyarlılık testi için CLSI M27-A2 referans mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların biyofilm oluşturma özellikleri, %0.25 glikoz eklenmiş beyin kalp infüzyon buyyonu kullanılarak kantitatif mikropak yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada, tüm izolatların 33'ünün (%28) biyofilm oluşturduğu saptanmış, biyofilm oluşturan suşların 11'inin (%33) kan kültürü izolatları olduğu belirlenmiştir. Kan kültürü izolatlarında, diğer örneklerden izole edilen suşlara göre biyofilm oluşturma oranının daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Biyofilm oluşturma oranları açısından *albicans* dışı *Candida* türleri (%41) ile *C.albicans* (%23) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Amfoterisin B ve kaspofunginin $MİK_{90}$ değerleri *C.albicans* için sırasıyla 0.06 µg/ml ve 0.5 µg/ml, *albicans* dışı *Candida*'lar için 0.5 µg/ml ve 1 µg/ml olarak saptanmış ve bunların en etkili ilaçlar olduğu izlenmiştir. Amfoterisin B için elde edilen $MİK$ değerleri ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak çalışmamızda, *Candida* türlerinde saptanan yüksek biyofilm oluşturma oranlarının, kateterle ilişkili *Candida* enfeksiyonlarındaki artışın bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Candida spp., antifungal ilaçlar, biyofilm.

ABSTRACT: Biofilm producing *Candida* species are known to be more resistant to immune response and antimicrobial agents which leads to treatment failure. The aim of this study was to investigate the biofilm production among *Candida* species that were isolated from hospitalized patients and to compare the in vitro activities of antifungal agents with biofilm production. A total of 116 *Candida spp.* (79 *C.albicans* and 37 non-*albicans Candida spp.*) isolated from various specimens (blood, sterile body fluids,

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (muge@baskent.edu.tr)

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

mucosal and skin lesion samples) were included to the study. Fluconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin susceptibilities of the isolates were determined by broth microdilution method according to CLSI M27-A2 standards. Biofilm production of *Candida spp.* was determined by microplate method, using brain heart infusion broth supplemented with 0.25% glucose as a growth medium. Biofilm formation was detected in 33 of 116 isolates (28%) and 11 of them (33%) were the strains isolated from hemocultures. Biofilm production was determined more commonly in blood isolates than the strains isolated from other samples ($p<0.05$). The biofilm production rate of non-*albicans Candida* species (41%) was found higher than *C.albicans* (23%), which the difference was statistically significant ($p<0.05$). Amphotericin B and caspofungin were found the most effective antifungals with the MIC₉₀ values of 0.06 µg/ml and 0.5 µg/ml for *C.albicans*, and 0.5 µg/ml and 1 µg/ml for non-*albicans Candida* species respectively. The observed positive correlation between the biofilm production and amphotericin B MIC values were found significant ($p<0.05$). In conclusion, high biofilm production rates of *Candida* species may explain the increase in the rate of catheter-related *Candida* infections.

Key words: Candida spp, antifungal agents, biofilm.

GİRİŞ

Son yıllarda, *Candida* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlarda dramatik bir artış meydana gelmiştir. Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane kaynaklı kan akımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri en sık görülen dört etkenden biri olarak karşımıza çıkmaktadır¹. Bu enfeksiyonların büyük kısmı kateter, prostetik kapak, endotrakeal tüp ve eklem protezi gibi yabancı cisim (implant) kaynaklı olup, enfeksiyon patogenezinde etken mikroorganizmanın biyofilm oluşturması ve biyomateryal yüzeylere tutunma özelliği gibi çeşitli faktörler rol oynamaktadır^{1,2}.

Candida türlerinin oluşturduğu biyofilm, heterojen yapıları ve ekzopolimerik madde varlığı gibi özellikleri ile bakteriyel biyofilmlerle benzerlik göstermektedir^{3,4}. Biyofilm oluşturan suşların immün sistem ve antimikrobiyal ilaçlara daha dirençli olduğu ve bunun da tedavi başarısını düşürdüğü bilinmektedir⁴. Biyomateryal kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde çoğu zaman tek çözüm bu yabancı cismin çıkarılması olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, antifungal ilaçların biyofilm içinde yer alan sesil hücrelere, serbest yaşayan planktonik hücrelerden çok daha düşük etki gösterdiği bildirilmektedir⁵.

Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun araştırılması ve elde edilen kantitatif sonuçların, tür, izolasyon bölgesi ve antifungal duyarlılık profilleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar: Çalışmaya, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi'nde yatarak tedavi gören hastaların kan kültürlerinden (n: 25), steril vücut sıvılarından (n: 43), mukozal lezyonlarından (n: 29) ve cilt lezyonlarından (n: 19) izole edilen toplam 116 *Candida* suşu dahil edildi. Suşlar, germ tüp oluşturma özelliği, koloni morfolojisi, mısır unlu Tween 80 besiyerindeki morfolojik görünümü, 42°C'de üreme özelliği ve API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) kullanılarak saptanan asimilasyon reaksiyonlarının sonuçlarına göre tanımlandı. İzolatların

79'u *C.albicans* ve 37'si *albicans* dışı *Candida* türü [*C.glabrata* (11), *C.parapsilosis* (9), *C.tropicalis* (4), *C.dubliniensis* (3), *C.krusei* (3), *C.guilliermondii* (2)] idi. Suşlar çalışılincaya kadar "skim-milk" (Oxoid) besiyerinde -86°C'de saklandı ve test edilmeden önce en az iki kere olmak üzere patates dekstroza agar (PDA)'a pasajlandı⁶.

Antifungal Duyarlılık Testleri: Duyarlılık testleri, CLSI M27-A2 kriterlerine uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapıldı⁶. Bu amaçla, flukonazol (Pfizer), itrakonazol (Janssen), amfoterisin B (Sigma) ve kaspofunginin (Merck) standart toz formları kullanıldı. Stok ilaç solüsyonları, steril distile su (flukonazol, kaspofungin) veya dimetil sülfoksit (itrakonazol, amfoterisin B) kullanılarak hazırlandı ve -86°C'de saklandı. Antifungal ilaçların iki kat dilüsyonları, standart protokole uygun olarak 0.165 M morfolinpropanasulfonik asit (MOPS, Sigma) ile tamponlanmış (pH: 7.0) L-glutamin içeren RPMI 1640 (Sigma) besiyeri kullanılarak hazırlandı ve steril mikropklara her bir kuyucuğa 0.1 ml olacak şekilde dağıtıldı. *Candida* süspansiyonlarının hazırlanması için suşların PDA'daki 24-48 saatlik pasajları kullanıldı. Steril serum fizyolojik içinde McFarland 0.5 bulanıklığa göre hazırlanan maya süspansiyonları, 1/2000 oranında RPMI ile sulandırıldıktan sonra tüm kuyucuklara 0.1 ml dağıtıldı. Hazırlanan plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Amfoterisin B için üremeyi tam inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilirken, triazol ve kaspofungin için ise üremeyi, üreme kontrol çukuruna göre ~%50 azaltan en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. Sonuçlar hem spektrofotometrik hem de görsel olarak değerlendirildi. Tüm testler iki kere çalışıldı.

Biyofilm Oluşumu: *Candida* suşlarında biyofilm oluşumu kantitatif yöntemle çalışıldı⁷. Suşlar, %0.25 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyyonu (BHIB) içinde 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra taze olarak hazırlanmış ve önceden ısıtılmış %0.25 glikozlu BHIB ile 1/20 oranında sulandırıldı. Bu süspansiyonlardan 200 µl alınarak steril 96 kuyucuklu polistren mikropklara aktarıldı. 37°C'de 48 saatlik inkübasyonu takiben, kuyucuklar PBS ile yıkandı, ters çevrilerek kurutuldu ve %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyandı. PBS ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl etanol-aseton (80:20 vol/vol) aktarıldı. Plaklar, 590 nm'de okutularak optik yoğunlukları (OD) tespit edildi ve biyofilm oluşumu OD<1 ise negatif; 1<OD<2 ise zayıf pozitif (+); 2<OD<3 ise orta pozitif (++) ve OD>3 ise güçlü pozitif (+++) olarak değerlendirildi. Tüm deneyler iki kez tekrar edildi. Deneylerde, kalite kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı.

İstatistiksel analiz: Karşılaştırmalar SPSS 8.0 programında Ki kare testi kullanılarak, kantitatif biyofilm oluşumu ile antifungal ajanların MİK değerleri ise Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, 116 *Candida* suşundan 33'ünün (%28) biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. *Albicans* dışı *Candida* izolatlarının biyofilm oluşturma oranının (15/37, %41), *C.albicans*'a (18/79, %23) göre daha yüksek olduğu saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Biyofilm oluşumunun tür düzeyinde dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo I. *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu

<i>Candida</i> türleri	Suş sayısı	Biyofilm Oluşumu Sayı (%)
<i>Candida albicans</i>	79	18 (23)
<i>albicans</i> dışı <i>Candida spp.</i>	37	15 (41)
<i>C.glabrata</i>	11	4
<i>C.parapsilosis</i>	9	4
<i>C.tropicalis</i>	8	3
<i>C.dublinsiensis</i>	4	3
<i>C.krusei</i>	3	1
<i>C.guilliermondii</i>	2	0
Toplam	116	33 (28)

Optik yoğunluklarına göre suşlarda biyofilm oluşumu değerlendirildiğinde, 18 *C.albicans* suşunun 4'ünde (%22) güçlü pozitif, 5'inde (%28) orta pozitif, 9'unda (%50) zayıf pozitif, 15 *albicans* dışı *Candida* suşunun ise 9'unda (%60) güçlü pozitif, 3'ünde (%20) orta pozitif, 3'ünde (%20) zayıf pozitif biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Kan kültürlerinden izole edilen suşların diğer örneklerden izole edilenlere göre anlamlı olarak daha yüksek oranda biyofilm oluşturdukları saptanmıştır ($p<0.05$). İzolasyon bölgelerine göre biyofilm oluşturma oranları Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II. İzolasyon Bölgelerine Göre Biyofilm Oluşumu

İzolasyon Bölgesi	İzolat sayısı	Biyofilm Oluşumu n (%)
Kan kültürleri	25	11 (44)*
Steril vücut sıvıları	43	11 (26)
Mukozal lezyonlar	29	7 (24)
Cilt lezyonları	19	4 (21)

* $p<0.05$.

Candida suşlarının amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve kaspofungin için elde edilen MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo III'de gösterilmiştir. *C.albicans* izolatlarında kaspofungine karşı elde edilen MİK değerlerinin, *albicans* dışı *Candida*'lar için elde edilen MİK değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo III). Amfoterisin B'nin gerek *C.albicans* gerekse *albicans* dışı *Candida* izolatlarında oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Tablo III). Flukonazol direnci izolatların 24'ünde (%28), itrakonazol direnci ise 14'ünde (%12) saptanmıştır.

İzole edilen suşların MİK değerleri ile kantitatif biyofilm oluşumları karşılaştırıldığında; sadece amfoterisin B için elde edilen MİK değerleri ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo IV).

Tablo III. *Candida* Türlerinde Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol ve Kaspofungin MIK Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

<i>Candida</i> türleri (n)	Flukonazol			İtrakonazol			Amfoterisin B			Kaspofungin		
	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK aralığı	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK aralığı	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK aralığı	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK aralığı
<i>C.albicans</i> (79)	4	32	0.125->256	0.12	4	0.03->32	0.03	0.06	0.03-1	0.125	0.5	<0.03-1
<i>Albicans</i> dışı <i>Candida</i> spp. (37)	8	>256	0.5->256	0.5	>32	0.03->32	0.06	0.5	0.015-2	0.5	1	<0.03->8
<i>C.glabrata</i> (11)			1->256			0.25->32			0.06-2			0.12-4
<i>C.parapsitosis</i> (9)			0.5->256			0.03-1			0.015-0.12			0.03-1
<i>C.tropicalis</i> (8)			0.5->256			0.06-16			0.03-0.5			0.06-1
<i>C.dubliniensis</i> (4)			32->256			0.5->32			0.06-2			0.12->8
<i>C.krusei</i> (3)			8->256			0.12->32			0.12-1			0.5-4
<i>C.guilliermondii</i> (2)			0.5-4			0.12-0.12			0.015-0.03			0.03-0.06

Tablo IV. Antifungal İlaçların MİK Değerleri ile Biyofilm Oluşumu Arasındaki Korelasyon

Pearson korelasyon (r)	
MİK değeri	Biyofilm Oluşumu
Amfoterisin B	0.272*
Kaspofungin	-0.027
Flukonazol	-0.171
İtrakonazol	0.003

*p<0.05.

TARTIŞMA

Hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmalar içinde *Candida* türleri, katatere bağlı enfeksiyon etkenleri içinde üçüncü, kolonizasyon sıklığında ikinci ve mortalite oranlarında birinci sırada yer almaktadır⁸. *Candida*'ların enfeksiyon oluşturabilmesi için öncelikle konak hücre ve dokularına veya biyomateryallerin yüzeyine tutunması gerekmekte, bunu takiben çoğalma ve hatta bazı suşlarda biyofilm oluşumu meydana gelmektedir.

Biyofilmler içinde yer alan sesil hücrelerin, serbest yaşayan planktonik formlarına göre oldukça farklı yapıda olduğu bilinmektedir^{1,5,8}. Yapılan çalışmalarda, *Candida* türlerinde saptanan biyofilm oranları % 8–85 arasında değişmektedir^{1,2,8,9}. Bu oranlar suşların izolasyon bölgelerine, enfeksiyon etkeni olup olmamasına ve izole edilen *Candida* türüne göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, yatan hastaların çeşitli bölgelerinden izole edilen 116 *Candida* suşundan 33'ünün (%23) biyofilm oluşturduğu saptanmıştır.

Hawser ve Douglas¹⁰ *C.albicans* türünde, *C.parapsilosis*, *C.keyfr* ve *C.glabrata* türlerine göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu saptamışlardır. Shin ve arkadaşları⁹ ise yaptıkları çalışmada özellikle kan kültürlerinden izole edilen *albicans* dışı *Candida*'larda olmak üzere %79 gibi yüksek oranda biyofilm oluşumu saptamışlar, *C.albicans*'larda ise bu oranı %8 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda da *albicans* dışı *Candida*'larda biyofilm oluşumuna *C.albicans* izolatlarına göre daha yüksek oranda saptanmıştır (p<0.05). Bununla birlikte *C.albicans* izolatlarında saptadığımız biyofilm oluşturma oranı da (%23), diğer çalışmalara göre yüksek olarak bulunmuştur. Kantitatif sonuçlar değerlendirildiğinde ise, biyofilm oluşturan *C.albicans*'ların yarısında, *albicans* dışı *Candida*'ların ise sadece %20'sinde zayıf pozitiflik bulunmuştur.

Son yıllarda *C.parapsilosis* ile meydana gelen özellikle kateter ilişkili enfeksiyonların insidansında artış görülmektedir^{4,11,12}. Bu etkenin biyofilm oluşturabilme yetisi, mikroorganizmanın patogeneğinde önemli yer tutmaktadır. Bu çalışmada *C.parapsilosis* ve *C.dublinskiensis* türlerinde biyofilm oluşturma oranları oldukça yüksek (sırasıyla; 4/9 ve 3/4) bulunmuş, ancak çalışmaya dahil edilen tür sayılarının yetersizliği göz önüne alındığında tür düzeyinde karşılaştırma yapılmamıştır.

Yücesoy ve arkadaşları¹⁴ mikroplak yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, *Candida*'ların %16.7'sinin biyofilm oluşturduğunu saptamışlar, *albicans* dışı *Candida*'larda biyofilm oluşumunun *C.albicans*'a göre yüksek olduğunu belirlemişler ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmişlerdir. Dolapçı ve arkadaşları¹⁵ 237 *C.albicans* suşunun 23'ünde (%10) ve 113 *albicans* dışı *Candida* suşunun 30'unda (%27) biyofilm oluşumu saptamışlardır. Bu araştırmacıların elde ettiği oranların bizim bulgularımızdan daha düşük olması, test edilen suşların büyük kısmının boğaz kültürlerinden izole edilmiş olmasından kaynaklanabilir.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmasının araştırmasında, mikroplak ve tüp aderans yöntemleri kullanılmaktadır, ancak bu yöntemlerle elde edilen sonuçlar uyumlu bulunmamaktadır^{13,14,16-19}. Yücesoy ve arkadaşları¹⁴ çalışmalarında her iki yöntemi de kullanmış ancak mikroplak yönteminin değerlendirilmesinin daha objektif ve kantitasyona uygun bir yöntem olması nedeniyle daha geçerli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda kantitasyonu daha standart olan mikroplak yöntemi kullanılmıştır.

Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının, diğer klinik örneklerden izole edilen suşlara göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu bildirilmektedir^{9,16}. Çalışmamızda da, biyofilm oluşturan suşların yaklaşık üçte birinin (11/33) kan kültürü izolatları olduğu ve bu suşların diğer bölgelerden izole edilenlere göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu saptanmıştır [sırasıyla; 11/25 (%44) ve 22/91 (%24)].

Candida biyofilmlerinin flukonazol, amfoterisin B, 5-flusitosin, itraconazol ve ketakonazole 30 ile 2000 kere daha dirençli oldukları bildirilmiştir^{20,21}. Biyofilmlerin antifungal ilaçlara daha dirençli olmasında antifungal ilaçların biyofilm matrisine iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin daha yavaş üremesi ve sesil hücrelerin yüzeyindeki değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir²². Bu da kombine ilaç tedavisinin uygulanımını gündeme getirmiştir²³. Çalışmamızda sadece planktonik hücrelerde MİK değerleri araştırılmış, flukonazole %28 ve itraconazole %12 oranında direnç saptanmıştır. Amfoterisin B için direnç sınır değeri henüz kesinlik kazanmamıştır, ancak direnç sınır değeri 1 µg/ml kabul edildiğinde sadece bir suşta direnç saptanmıştır. Kaspofungin direnç sınırı henüz belirlenmemiş olmasına rağmen, elde ettiğimiz MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerine bakıldığında (Tablo III) özellikle *C.albicans*'a karşı oldukça etkili bir ilaç olduğu görülmüştür. İzole edilen suşların MİK değerleri ile kantitatif biyofilm oluşumları karşılaştırıldığında; sadece amfoterisin B için elde edilen MİK değerleri ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir (p<0.05).

Biyofilm oluşturma oranları yüksek saptanan *Candida* izolatlarının yüksek amfoterisin B MİK değerlerine sahip olması ve bu ilacın biyofilmler üzerindeki etkinliğinin 100 kat daha düşük etkinlik göstermesi göz önüne alınırsa, tedavide önemli bir problem oluşturacağı açıktır. Bachmann ve arkadaşları²⁴ yeni bir antifungal ilaç olan kaspofunginin *C.albicans* biyofilmlerine karşı terapötik dozlarda oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu ilacın MİK değerleri ile biyofilm oluşturma oranları arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Dolayısıyla *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, *Candida* türleri katetere bağlı enfeksiyonlarda önemli bir etken olarak karşımıza çıkmakta ve patogeneizde biyofilm oluşumu önemli bir rol oynamaktadır. *Albicans* dışı *Candida*'ların daha yüksek oranda biyofilm oluşturmaları, özellikle *C.dubliniensis* ve *C.parapsilosis*'in neden olduğu ciddi enfeksiyon oranlarındaki artışı açıklayabilir. Ayrıca artan amfoterisin B MİK değerleri ile biyofilm oluşumu arasında saptanan korelasyonun, sesil hücrelerin planktonik hücrelere göre daha dirençli olduğu göz önüne alındığında, bu ilacın tedavi başarısızlığının bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; 11: 30-6.
2. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. Curr Op Microbiol 2002; 6: 608-11.
3. Emerson RJ 4th, Camesano TA. Nanoscale investigation of pathogenic microbial adhesion to biomaterial. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6012-22.
4. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoun MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 2002; 70: 878-88.
5. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 255-67.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2002, 2nd ed. Approved Standard. NCCLS Document M27-A2. NCCLS, Wayne, Pa.
7. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4538-45.
8. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 163-70.
9. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from non-neutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002; 40: 1244-8.
10. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun 1994; 62: 915-21.
11. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. Clin Infect Dis 1996; 23: 506-14.
12. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 452-6.
13. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2001; 39: 3234-40.
14. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bül 2004; 38: 91-9.
15. Dolapçı İ, Tekeli A. Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktör yapımının araştırılması. Mikrobiyol Bül 2002; 36: 323-8.
16. Hilmioğlu S, İkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeks Derg 1999; 13: 183-6.
17. Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slime aktiviteleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31: 224-6.

18. Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. Detection of slime production among isolates of *Candida albicans*. İnfeks Derg 1996; 10: 267-9.
19. Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Arsoy AS. İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1998; 28: 103-6.
20. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3291-7.
21. Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2146-9.
22. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis 2004; 10: 14-20.
23. Bachmann SP, Ramage G, VandeWalle K, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3657-9.
24. Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3591-6.