

CANDIDA TÜRLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURAN VE PLANKTONİK FORMLARININ ANTİFUNGAL AJANLARA KARŞI İN VİTRO DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASINDA İKİ FARKLI YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI*

COMPARISON OF TWO DIFFERENT METHODS FOR THE INVESTIGATION OF IN VITRO SUSCEPTIBILITIES OF PLANKTONIC AND BIOFILM FORMING CANDIDA SPECIES TO ANTIFUNGAL AGENTS

Fatma KAYNAK ONURDAĞ¹, Selda ÖZGEN¹, Ufuk ABBASOĞLU¹, İsmail Safa GÜRCAN²

¹ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (fkaynak@gmail.com)

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Antifungal ajanların *Candida* türlerine karşı, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)'nu belirlemek için kullanılan mikrodilüsyon yöntemi, bu mikroorganizmaların hem biyofilm hem de planktonik formları için halen laboratuvarlarda kullanılan tek yöntemdir. Bununla birlikte birçok araştırmada, aynı mikroorganizmanın biyofilm ve planktonik formlarının in vitro duyarlılıklarında farklılık olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *Candida* suşlarının biyofilm oluşturan ve planktonik formlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının saptanması, elde edilen verilerin karşılaştırılması ve biyofilmdeki mayaların duyarlılığının saptanmasında kullanılan iki farklı yöntemin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 90028 standart suşları ile birer adet olmak üzere *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *Candida tropicalis* klinik izolatları kullanılmıştır. Planktonik formların duyarlılıklarının saptanmasında mikrodilüsyon yöntemi, CLSI M27-A3 standartlarına göre uygulanmış ve flukonazol, itrakonazol, flusitozin, amfoterisin B ve nistatin için MİK değerleri belirlenmiştir. Çalışmaya alınan suşların biyofilm formlarının duyarlılıkları ise aynı antifungal ilaçlara karşı Calgary biyofilm yöntemi (CBY) ve BioTimer yöntemi (BTY) ile araştırılmış ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) ve minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) değerleri saptanmıştır. Çalışmamızda, MİK ile CBY-MBEK değerleri arasında, CBY-MBEK ile BTY-MBEK değerleri arasında ve CBY-MBEK ile BTY-MBİK değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Genel olarak, CBY-MBEK değerleri MİK değerlerinden daha yüksektir. Ancak biyofilmdeki mikroorganizmaların asıl

* Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (02/2009-17) desteklenmiş ve "Central European Symposium on Antimicrobial Resistance (CESAR)" sempozyumunda (Zadar, Hırvatistan, 2009) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

sayısı tespit edilemediğinden, MBEK değerleri her zaman doğru sonuç vermemektedir. Bununla birlikte çalışmamızda elde edilen BTY-MBİK değerleri de, genellikle MBEK değerlerinden daha düşük ve MİK değerlerinden daha yüksektir. Sonuçlar değerlendirildiğinde yalnızca flusitozin ($p= 0.002$) ve itraconazolün ($p= 0.025$) MBEK değerleri açısından yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Yine flusitozin ($p= 0.001$) ve itraconazol ($p= 0.001$) için, CBY-MBEK ve BTY-MBİK değerleri arasında anlamlı fark tespit edilirken, diğer antifungal ilaçlarda, bu değerler arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p> 0.05$). Bu bulgular, biyofilm oluşturan *Candida* suşlarının da in vitro duyarlılıklarının saptanması gerektiğini desteklerken, ilaçların etki mekanizmalarına ve mikroorganizmaların ilk inokulum konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilecek olan MBEK ve MBİK değerlerinin her zaman MİK değerlerinden daha yüksek olmayabileceğini de göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Candida*, duyarlılık, planktonik, biyofilm, antifungal ajan, Calgary biyofilm yöntemi, BioTimer yöntemi.

ABSTRACT

Microdilution method that determines the minimum inhibitory concentrations (MIC) of antifungal agents against *Candida* spp. is still the only method used in laboratories for both biofilm and planktonic forms. However, it was determined in several studies that there were susceptibility differences between the biofilm and planktonic forms of the same microorganism. The aims of this study were the determination of in vitro susceptibilities of planktonic and biofilm forms of *Candida* strains against antifungal agents, the comparison of the data obtained from planktonic and biofilm forms and the evaluation of two different methods used for the detection of susceptibilities of biofilm forms. *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90028 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used as reference strains together with clinical isolates of one of each *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Microdilution method was used to determine the susceptibilities of planktonic forms of the strains according to CLSI M27-A3 standards, and MIC values of fluconazole, itraconazole, flucytosine, amphotericin B and nystatin were determined. For the detection of antifungal susceptibilities of *Candida* spp. biofilm forms, Calgary biofilm method (CBM) and BioTimer assay (BTA) were used, and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) and minimum biofilm inhibition concentration (MBIC) values of the same antifungals were determined. The difference between MIC and CBM-MBEC, CBM-MBEC and BTA-MBEC, CBM-MBEC and BTA-MBIC values were found statistically significant ($p< 0.05$). In general CBM-MBEC values were found to be higher than MIC values. However, MBEC values were not always very reliable since the exact number of the microorganisms in biofilm can not be determined. BTA-MBIC values were also generally lower than the MBEC values and higher than the MIC values. Statistically significant difference between two methods was determined only for the MBEC values of flucytosine ($p= 0.002$) and itraconazole ($p= 0.025$). For flucytosine ($p= 0.001$) and itraconazole ($p= 0.001$), there was also a significant difference between CBM-MBEC and BTA-MBIC values, however, the difference was not significant ($p> 0.05$) for the other antifungal agents. These findings supported that antifungal susceptibilities of biofilm forming *Candida* strains should also be investigated. However, MBEC and MBIC of the antifungal agents should not always be expected to be higher than the MIC values since the mechanism of action of the specific antifungal agents and the first inoculum concentration of the microorganisms might differ.

Key words: *Candida*, susceptibility, planktonic, biofilm, antifungal agent, Calgary biofilm method, BioTimer assay.

GİRİŞ

“Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”, M27-A3 protokolünde, mayalının antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığını saptamak için standardize bir mikrodilüsyon

metodu tanımlamıştır¹. Ancak mikroorganizmaların planktonik formlarının minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri biyofilm formların MİK değerlerinden oldukça düşük olabilmektedir².

Candida albicans, genellikle klinik bir hastalık oluşturmadan deri ve mukoz membranlarda kolonize olabilen bir mayadır. Bununla birlikte steril vücut bölgelerine ulaşip enfeksiyona yol açtığına tedavi oldukça güç olabilmektedir. *Candida* enfeksiyonları, en sık görülen hastane enfeksiyonları arasında dördüncü sırada yer almasına rağmen, morbidite ve mortalite oranı diğerlerine göre daha yüksektir^{3,4}. Kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda genellikle antifungal tedaviye cevap alınamadığından kateterin çekilmesi gerekebilmektedir^{2,4}. Enfeksiyonlardan en sık izole edilen etken *C.albicans* olmakla birlikte, diğer *Candida* türleri de son yıllarda giderek artan oranlarda izole edilmektedir. *Candida parapsilosis*, insandan en sık izole edilen ikinci fungal patojendir⁵. *Candida* biyofilmlerinin oluşumu, antimikrobiyal tedaviye artan oranda direnç ile seyreden mukozal ve sistemik enfeksiyonların gelişmesi ile ilişkilidir⁶⁻⁸.

Biyofilm, etrafı kendi oluşturduğu polimerik bir matriksle çevrili olarak canlı ya da cansız bir yüzeye tutunan mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmaktadır⁵. Matriks komponentleri; ekzopolisakaritler, proteinler, nükleik asitler ya da planktonik hücrelere kıyasla hücrelerin korunması açısından birçok avantaj sağladığı düşünülen ve ekstrapolimerik maddeler (EPS) olarak tanımlanan diğer bazı maddeler olabilir⁹. Biyofilmler, EPS matriks içerisinde serpiştirilmiş hücre kümelerinden oluşan heterojen hücre katmanlarıdır ve kendi içinde yoğunluk farklılıkları vardır⁹. *Candida* biyofilmleri, bir yüzeye ağ şeklinde bağlanmış olup iki tabakalı, mayalar, hifler ve yalancı hiflerden oluşan yapıdır. Altaki tabaka maya hücrelerinden, daha kalın olan üstteki tabaka ise hiflerden meydana gelmiştir¹⁰. Biyofilm oluşumundaki ilk basamak, maya formunun cisim yüzeyine tutunması ve bunu takip eden 3-7 saat içerisinde germ tüp oluşumunun görülmesidir. Matür biyofilm maya, hif ve psödohif formlarının hepsini içerir⁴.

C.albicans enfeksiyonları, biyofilm ile ilişkilidir. Biyofilm, mikroorganizmanın antifungal duyarlılığını değiştirmesine rağmen, *C.albicans* izolatlarının antifungal ajanlara olan duyarlılıkları genellikle planktonik formlarında incelenmektedir. Planktonik formların MİK değerleri ise biyofilm formların MİK değerlerinden oldukça farklı olabilmektedir². Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların, antibiyotiklere planktonik formlarından daha dirençli oldukları ve planktonik formlara göre saptanan antibiyotik duyarlılıkları ile biyofilm enfeksiyonlarının tedavi edilemediği bilinmektedir¹¹. Bu nedenle, biyofilm oluşturan klinik izolatların in vitro duyarlılıklarının saptanmasının önemi açıktır. Biyofilm oluşturan bakterilerin in vitro duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan bazı yöntemler vardır. "Calgary Biyofilm Yöntemi (CBY)" en popüler olan yöntemdir ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK)'nu saptar^{11,12}. MBEK, bakteriyel biyofilmi yok eden minimum konsantrasyondur¹³. Ancak daha önce bildirilen başka yöntemlerde de olduğu gibi¹³⁻¹⁶ CBY ile mikrobiyal antibiyotik duyarlılık çalışmalarındaki MBEK testleri, biyofilmdeki bakterilerin asıl sayısını tespit edememektedir. İnokulum miktarı da duyarlılık testleri için önemli olduğundan, bu yöntemlerle saptanan MBEK değerleri hatalı olabilir.

mektedir. Pantanella ve arkadaşlarının¹¹, 2008 yılında tanımladıkları “BioTimer Yöntemi (BTY)” ise biyofilm içindeki stafilokokların kolaylıkla sayılmasını sağlayan bir başka yöntemdir. Bu yöntemde, bakterinin metabolizmasına bağlı olarak renk değiştiren fenol kırmızısı indikatör olarak kullanılarak, oluşan renk değişimine bağlı biyofilm tabakada bulunan bakteri sayısı hesaplanmaktadır.

Bu çalışmada, sıklıkla kullanılan CBY ve yeni bir yöntem olan BTY ile biyofilmdeki mayaların antifungal ilaçlara karşı olan duyarlılıklarının saptanması, biyofilm oluşturan ve planktonik maya formlarının duyarlılıklarının karşılaştırılması ve bu yöntemlerin avantajlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. CBY ve BTY, biyofilmdeki mayaların antifungal ilaçlara olan duyarlılıklarının saptanması için kullanılmış, planktonik formların MİK değerleri ise CLSI standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi ile hesaplanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mikroorganizmalar

Çalışmada, *C.albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 90028 standart suşları ve daha önceki çalışmalarımızda^{17,18} kullanılan üç *Candida* klinik izolatu (*C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *Candida tropicalis*) kullanıldı.

Mikrodilüsyon Yöntemi

Flukonazol, itrakonazol, flusitozin, amfoterisin B ve nistatinin stok solüsyonları kullanılarak, 96 kuyucuklu mikropklarda, MOPS ile pH: 7'ye tamponlanmış L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyerinde 4096-0.0625 µg/ml aralığında konsantrasyonları elde edilecek şekilde sulandırıldı. Mikrodilüsyon yönteminde CLSI M27-A3 standartları uygulandı¹. İnokülasyon için, McFarland 0.5 yoğunluğuna ayarlanan maya süspansiyonu 1/100 ve bunu takiben 1/20 oranında seyreltilerek hazırlandı (2.5 x 10³ cfu/ml). Mikropklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi ve üremeyi inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi.

Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Suşlarda biyofilm oluşumunun gösterilmesi için, Abdi-Ali ve arkadaşlarının¹⁹ uyguladığı modifiye bir mikrotitre plak yöntemi kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm suşlar biyofilm oluşumu açısından pozitif. Maya hücreleri, Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinde 35°C'de 48 saat inkübe edilip %5 glukoz içeren SDA besiyerine pasajlandı. İnokübasyonu takiben %5 glukoz içeren Sabouraud Liquid Medium (SLM) içeren sıvı besiyerine aktarıldı. Bir maya suşu için sıvı kültürden 100'er µl alınarak 96 çukurlu mikropkların 6 çukuruna eklendi. İnokübasyondan sonra çukurlar 0.01 M potasyum fosfat tampONU (PBS) ile yıkandı. 150 µl metanol ile 10 dakika fikse edildikten sonra 150 µl kristal viyole eklenerek 20 dakika boyandı. Plaklar musluk suyu ile yıkandıktan sonra 150 µl %33'lük glasiyal asetik asit eklenerek optik okuyucuda okutuldu.

Calgary Biyofilm Yöntemi

Candida suşlarının biyofilm formlarına karşı antifungal ilaçların MBEC değerleri “MBEC Assay™ for High-throughput Screening (HTP)” testi ile üretici firmanın önerilerine göre

(Innovotech Inc, Kanada) tespit edildi. Bu testte kullanılan mikroplaklar iki kısımdan oluşmaktadır. Üst kısım, üzerinde 96 adet çıkıntı olan polistiren bir kapak olup, bu çıkıntılar testin ikinci kısmını oluşturan 96 çukurlu plağa oturmaktadır. Çalışmada, pasajları yapılarak McFarland 1 standardına göre hazırlanan maya süspansiyonu, oluklu plak içerisine steril pipet ile aktarıldı. Plağın çıkıntılı kapak kısmı bu oluklu plağın üzerine yerleştirilerek çalkalayıcı tablada (Rotary shaker) 9-16° eğimde ve dakikada 3-5 kez sallanacak şekilde inkübe edildi. Başka bir 96 çukurlu mikroplakta, MOPS ile pH: 7'ye tamponlanmış, L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde antifungal ilaçların çift kat sulandırılmaları yapıldı. İnkübasyon sonrası oluklu plağın kapak kısmı, antifungal ilaçların sulandırılmalarını içeren plağa geçirilerek 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra kapak kısmı steril serum fizyolojik ile iki kez yıkandı ve antifungal ilaçlar için nötralizan içeren besiyeri bulunan bir başka mikroplağa kapatılarak sonikatörde 30 dakika bekletildi. Nötralizan olarak kullanılan besiyeri üretici firmanın (Innovotech) önerilerine göre hazırlandı. Kısaca; 1.0 g L-histidin, 1.0 g L-sistein, 2.0 g indirgenmiş glutatyon, distile su ile 20 ml'ye tamamlanıp milipor filtre ile sterilize edildi. SLM besiyeri hazırlanıp, 1 L besiyerine 20 g saponin ve 10 g Tween-80 eklendi. Besiyerinin pH'sı 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanıp her 20 ml besiyerine 500 µl nötralizan eklenerek kullanıldı. Daha sonra mikroplağın kapağı çıkarılarak yeni bir kapak takıldı ve 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, makroskobik olarak üremeyi durduran en düşük ilaç konsantrasyonu CBY-MBEK olarak değerlendirildi.

BioTimer Yöntemi

BTY'de, fenol kırmızısı içeren SLM besiyeri ile çalışıldı. Bu yöntemde; mikroorganizmanın metabolizmasına ve dolaylı olarak da konsantrasyonuna bağlı olarak, besiyerindeki fenol kırmızısının renginin kırmızıdan sarıya doğru değişimi için geçen süre ölçülerek, ilk fungal konsantrasyonla arasında ilişki kuruldu. Renk değişimi için gereken süreyi 0. zamandan başlayarak gösteren bir eğri çizildi. Bu eğriyi çizebilmek için, bir gece inkübe edilmiş 0.2 ml taze maya kültürü 1.8 ml fenol kırmızısı içeren SLM besiyerine eklenip, 1 ml fenol kırmızılı SLM besiyeri içerisinde çift katlı sulandırımalarla 24 çukurlu mikroplaklarda sulandırıldı ve eş zamanlı olarak SDA plaklarına pasajlanarak koloni oluşturan birim (KOB) tespit edildi. Mikroplaklar 35°C'de çalkalanmadan inkübe edildi. Fenol kırmızılı besiyerinin rengi dakikada bir kez not edildi ve her sulandırım için besiyerinin renginin değişmesi için gereken süre kaydedildi. Bu aşamadan sonra \log_{10} KOB'a karşı zaman grafiği çizildi.

Mayaların biyofilm içerisinde üremesi için, 37°C'de glukoz içeren SLM içerisinde 5 mm çapında cam boncuk varlığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kolonize olan cam boncuklar steril tuzlu su ile üç kez yıkandı ve 1 ml fenol kırmızılı SLM besiyeri bu boncuklarla inoküle edildi. Besiyeri 35°C'de inkübe edilerek renk değişimi not edildi. Önceden hazırlanmış olan eğri kullanılarak cam boncuktaki biyofilmde bulunan mikroorganizma sayısı hesaplandı. Antifungal ilaçların sulandırılmaları fenol kırmızılı SLM besiyeri ile 24 çukurlu mikroplaklarda yapıldı ve her sulandırım 1 cam boncukla inoküle edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra, renk değişimine neden olmayan en düşük ilaç konsantrasyonu BTY-MBEK olarak saptandı. Cam boncukların antifungal ilaç içermeyen besiyeri içerisine alınarak tekrar bir gecelik inkübasyonunu takiben, renk

değişimine neden olmayan en düşük ilaç konsantrasyonu ise minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) olarak kabul edildi.

Boncukların yüzeyinde biyofilm tabakası oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla cam boncuklar modifiye mikrotitre mikroplak yöntemi çukurlarına atılarak yöntem tekrarlandı ve tüm suşlarda biyofilm oluşumu doğrulandı.

İstatistiksel Analiz

Değişim katsayısının yüzdesi (%CV); standart sapma/aritmetik ortalama x 100 formülü ile hesaplandı. Konsantrasyon değerleri arasındaki farklılık "One-Way ANOVA" ile incelendi; farklılığa neden olan değerler "Tukey" yöntemi ile belirlendi.

BULGULAR

Maya hücrelerinin metabolizmasına ve dolaylı olarak da konsantrasyonuna bağlı olarak besiyerindeki fenol kırmızısının renginin kırmızıdan sarıya doğru değişimi için geçen süreyi ölçerek ilk fungal konsantrasyonla arasında ilişki kurulabilmesi için renk değişimi için gereken süreyi 0. zamandan başlayarak gösteren bir eğri çizilmiştir. Tüm suşlar için zamana karşılık gelen logKOB değerleri, Tablo I'de belirtilen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Örnek olması açısından *Candida albicans* ATCC 10231 için zamana karşı çizilen logKOB grafiği Şekil 1'de gösterilmiştir.

Suşların biyofilm yapma özellikleri modifiye mikrotitre mikroplak yöntemi ile araştırılmış ve biyofilm yapma özelliği pozitif olan suşlar çalışmaya alınmıştır. Resim 1'de biyofilm pozitif ve biyofilm negatif suşların mikroplaktaki görünümleri görülmektedir.

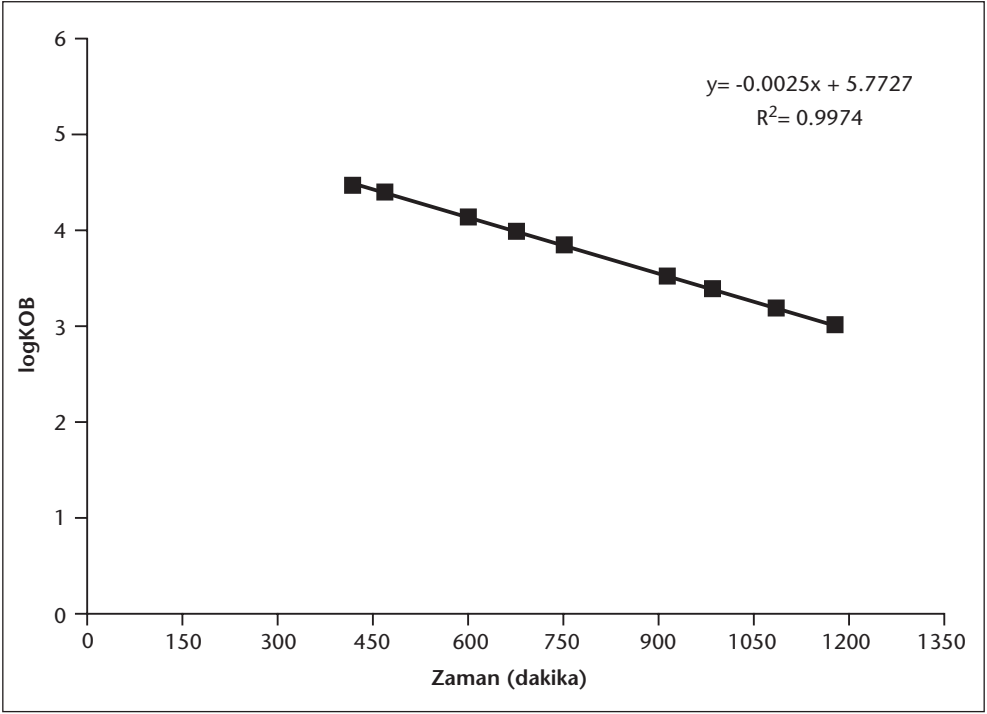
Çalışmaya alınan *Candida* suşları için elde edilen MİK değerleri, CLSI önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiş ve MİK değerleri Tablo II'de verilmiştir.

BTY ile çizilen kalibrasyon eğrilerindeki süre dikkate alınarak, yöntemde kullanılan maların ilk inokulum konsantrasyonları tespit edilmiş ve Tablo III'te sunulmuştur.

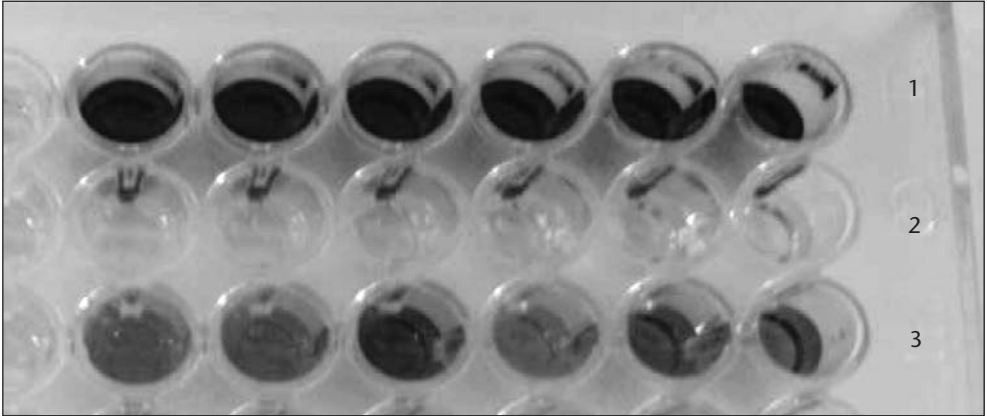
BTY ile saptanan MBEK ve MBİK değerleri ile CBY ile saptanan MBEK değerleri ise Tablo IV'te gösterilmiştir.

Tablo I. Tüm Suşlar İçin Saptanan Denklemler ve Doğrusal Katsayılar

	y değeri	R ² değeri
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-0.0025x + 5.7727	0.9974
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90028	-0.001x + 5.7473	0.9935
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-0.002x + 5.8684	0.9881
<i>C. albicans</i> izolatu	-0.0028x + 5.6025	0.9862
<i>C. tropicalis</i> izolatu	-0.0034x + 5.953	0.9900
<i>C. parapsilosis</i> izolatu	-0.0012x + 6.1935	0.9924



Şekil 1. *Candida albicans* ATCC 10231 için zamana karşı çizilen logKOB grafiği.



Resim 1. Biyofilm pozitif (1 ve 3) ve biyofilm negatif (2) suşların görünümü.

İstatistiksel incelemede, %CV değeri yaklaşık %5 civarında bulunmuş ve denemelerin homojen olduğunu göstermiştir.

Flusitozin için MİK değerleri, CBY-MBEK, BTY-MBEK ve BTY-MBIK değerlerinden düşük olup, MİK ile CBY-MBEK değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

Tablo II. Antifungal İlaçların MİK Değerleri

Suşlar	Antifungal ilaçlar (µg/ml)				
	Flusitozin	Amfoterisin B	Nistatin	Flukonazol	İtrakonazol
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	0.25	8	4	0.5	0.25
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 90028	0.125	1	4	1	0.125
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	2	2	4	32	0.5
<i>C.albicans</i> izolatu	0.25	2	4	64	64
<i>C.tropicalis</i> izolatu	0.25	4	4	64	64
<i>C.parapsilosis</i> izolatu	0.25	2	4	1	0.25

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Tablo III. Biyofilm Formlarının İlk İnokulum Konsantrasyonları (KOB/Cam Boncuk)

Suşlar	Planktonik form		Biyofilm form	
	KOB/ml	Süre (dakika)	KOB/cam boncuk	Süre (dakika)
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 90028	$6.7 \pm 0.16 \times 10^4$	900 ± 0.001	6.54×10^3	1931.67 ± 1.67
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	$5.4 \pm 0.37 \times 10^4$	408 ± 8	1.82×10^1	1805 ± 2.89
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	$6.68 \pm 0.18 \times 10^4$	451.67 ± 1.67	1.78×10^2	1810 ± 2.89
<i>C.albicans</i> izolatu	$2.34 \pm 0.03 \times 10^4$	423 ± 1.155	0.35×10^1	1805 ± 2.89
<i>C.tropicalis</i> izolatu	$2.86 \pm 0.07 \times 10^4$	448.3 ± 1.67	1.53×10^4	520 ± 2.89
<i>C.parapsilosis</i> izolatu	$4.5 \pm 0.26 \times 10^4$	1273 ± 1	1.69×10^4	1640 ± 0.001

($p < 0.05$). İlginç olarak *C.albicans* ATCC 10231 için amfoterisin B'nin MİK değeri, CBY-MBEK değerine eşitken, BTY-MBEK ve BTY-MBİK değerlerinden daha yüksektir. Diğer suşlar için elde edilen MİK değerleri ise CBY-MBEK değerlerinden daha düşüktür. Bununla birlikte, *C.parapsilosis* ATCC 90028 suşu ve *C.parapsilosis* izolatu için elde edilen BTY-MBEK ve BTY-MBİK değerleri de MİK değerinden daha yüksektir. Tüm değerler birbiri ile kıyaslandığında, MİK, CBY-MBEK, BTY-MBEK ve BTY-MBİK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$).

Nistatinin MİK değerleri, tüm suşlar için CBY-MBEK ve BTY-MBEK değerlerinden daha düşüktür. Bununla birlikte, *C.albicans* ATCC 10231, *C.parapsilosis* ATCC 90028 ve *C.albicans* izolatu için, BTY-MBİK değerleri MİK değerlerinden daha düşüktür. CBY-MBEK değerleri BTY-MBEK değerlerine eşit ya da daha düşük iken, *C.parapsilosis* izolatu haricinde-

Tablo IV. Candida Suşlarının Biyofilim Oluşturucu Suşlarına Karşı Elde Edilen MBEK ve MBİK Değerleri (µg/ml)

Suşlar	Flusitozin		Amfoterisin B		Nistatin		Flukonazol		İtrakonazol							
	MBEK*	MBİK	MBEK*	MBİK	MBEK*	MBİK	MBEK*	MBİK	MBEK*	MBİK						
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	32	8	2	8	0.015	0.015	8	8	2	8	1024	1024	8	2	2	0.5
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 90028	512	8	8	32	> 256	4	16	16	0.25	> 512	8	4	> 512	> 256	> 256	0.125
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	> 512	> 64	16	16	1	0.25	16	256	4	> 512	> 2048	64	> 512	8	8	8
<i>C.albicans</i> izolatu	128	256	8	32	1	0.03	8	8	1	> 512	32	4	16	64	8	8
<i>C.tropicalis</i> izolatu	> 512	> 64	4	256	0.125	0.0625	64	> 64	4	> 512	> 64	> 64	> 512	512	256	256
<i>C.parapsilosis</i> izolatu	> 512	256	256	64	8	16	32	64	128	> 512	256	256	> 512	512	512	0.5

* CBY-MBEK değerleri, MBEK: Minimum biyofilim eradikasyon konsantrasyonu, MBİK: Minimum biyofilim inhibisyon konsantrasyonu.

ki tüm suşlar için, BTY-MBİK değerlerinden daha yüksektir. MİK değerleri ile BTY-MBEK değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Flukonazol için MİK değerleri, diğer iki yöntemle elde edilen değerlerden daha düşükken, flukonazole dirençli olan *C. albicans* izolatu için elde edilen MİK değeri, BTY-MBEK ve BTY-MBİK değerlerinden daha yüksektir. Flukonazol için elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$).

İtrakonazolün de *C. albicans* izolatu için elde edilen MİK değeri, CBY-MBEK ve BTY-MBİK değerlerinden daha yüksektir. CBY-MBEK değerleri ile diğer tüm değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Tedaviye direnç gösteren inatçı enfeksiyonların tedavisinde, biyofilm formlarının anti-biyotik duyarlılıklarının saptanması da önemli bir husustur. *Candida* biyofilmleri, antimikrobiyal tedaviye yanıt vermeyen mukozal ve sistemik enfeksiyonlarla ilişkilidir⁹⁻¹¹ ve *Candida* türlerinin hem biyofilm hem de planktonik formlarının antifungal ajanlara duyarlılıklarının saptanmasında bugün hala tek yöntem MİK değerlerini saptayan mikrodilüsyon yöntemidir. Bununla birlikte birçok çalışmada biyofilm ve planktonik formların duyarlılıkları arasındaki farklar bildirilmiştir^{5,6,20-22}.

Biyofilm oluşturan formların in vitro antifungal duyarlılıklarının saptanmasına olan ihtiyaç nedeniyle birçok araştırmacı değişik teknikler kullanarak biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak etkili antimikrobiyal konsantrasyonunu saptamayı amaçlamışlardır. 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) redüksiyon yöntemi, kuru ağırlık ölçümleri ya da radyoizotop kullanılan yöntemler, CBY gibi yeni yöntemler, biyofilm ve planktonik formların duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan farklı yöntemlerdir^{5,12,23}. Bununla birlikte, bu yöntemlerle biyofilm içerisindeki mikroorganizma yoğunluğu saptanamamakta, ancak elektron mikroskopik yöntemlerle biyofilmin kalınlığı ölçülebilmektedir. Pantanella ve arkadaşları¹¹, BTY adı verilen ve biyofilm içerisindeki stafilokokları sayarak, antibiyotiklerin MBEK ve MBİK değerlerinin hesaplandığı yeni bir yöntem önermişlerdir. Çalışmamızda bu yöntem, *Candida* suşları için modifiye edilerek kullanılmıştır.

Hawser ve Douglas²³ değişik kateter yüzeylerinde biyofilm oluşumunu gösteren monitörize bir sistem kullanarak *C. albicans* biyofilmlerinin antifungal ajanlara çok yüksek direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Kuhn ve arkadaşları⁵ *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinin antifungal duyarlılıklarını XTT yöntemi ile araştırmışlar ve lipozomal amfoterisin B'nin *C. albicans* biyofilmleri üzerine, planktonik formların MİK değerlerine benzer inhibitör aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, vorikonazol ve ravukonazolün planktonik formlara karşı inhibitör etki gösterirken biyofilm formları etkilemediği saptanmıştır⁵. Ceri ve arkadaşları¹², CBY ile biyofilm ve planktonik formların antibiyotik duyarlılıkları arasında 100-1000 kat fark bulunduğunu bildirmişlerdir. Shuford ve arkadaşları² da, planktonik MİK₉₀ ve biyofilm MİK₉₀ değerlerini amfoterisin B, vorikonazol ve kaspofungin için sırasıyla 0.25 ve 2, 0.06 ve > 256, 0.5 ve 2 µg/ml olarak bildirmişlerdir.

Bir diğer çalışmada, idrar örneklerinden izole edilen *Candida* suşlarının planktonik ve biyofilm formlarının duyarlılıkları XTT yöntemiyle çalışılmış; *C. albicans*'ın planktonik ve biyofilm formlarının amfoterisin B'ye duyarlılıkları sırasıyla 0.06-0.25 µg/ml ve 0.125-16 µg/ml olarak bulunmuştur²². Chandra ve arkadaşları²⁰, *Candida* biyofilmlerinin erken, orta ve olgun fazlarına karşı amfoterisin B, nistatin, flukonazol ve klorheksidinin in vitro aktivitelerini araştırmış ve MİK değerlerini karşılaştırmışlardır. Bu araştırmacılar, biyofilm formlarının ilaç dirençlerinin, hücrelerin metabolik aktivitesinden çok olgunlaşma fazıyla ilgili olduğunu saptamışlar; *Candida* biyofilmlerine karşı in vitro flukonazol direncini planktonik formundan 256 kat daha fazla olduğunu göstermişler; amfoterisin B ve nistatin için duyarlılıklar karşılaştırıldığında, biyofilm formları için amfoterisin B'de 32 kat, nistatin için 16 kat daha yüksek MİK değerleri bildirmişlerdir²⁰.

Çalışmamızda, tüm suşlar için, flusitozin ve itrakonazol için tespit edilen MİK değerleri, BTY-MBEK ve BTY-MBİK değerlerinden daha düşük ya da eşit bulunmuştur. Bu ilaçlar için saptadığımız MBİK değerleri de, MBEK değerlerinden daha düşük ya da eşittir. MBEK değerleri; biyofilmdeki mikroorganizmanın %100'ünü öldüren ilaç konsantrasyonu olarak tanımlandığından, MBİK değerlerinin MBEK değerlerinden daha düşük ya da eşit olması beklenen bir sonuçtur. Birçok çalışmada²⁰⁻²² belirtildiği gibi MİK değerlerinin MBEK ve MBİK değerlerinden daha düşük olması da çalışma sonuçlarımızla uyumludur.

Amfoterisin B için elde edilen MİK ve CBY-MBEK değerlerine bakıldığında; beklenildiği gibi MBEK değerleri MİK değerlerinden daha yüksek ya da eşit bulunmuştur. Bununla birlikte, BTY-MBEK değerleri ve BTY-MBİK değerleri yalnızca *C. parapsilosis* ATCC 90028 ve *C. parapsilosis* izolatu için MİK değerlerinden daha yüksek bulunmuş, diğer suşlar için elde edilen MİK değerleri MBEK ve MBİK değerlerinden daha yüksek bulunmuştur.

Nistatin için, MBEK değerleri tüm suşlar için MİK değerlerinden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, yalnızca *C. parapsilosis* izolatu için elde edilen MBİK değeri MİK değerinden daha yüksektir. Bu bulgular, diğer bazı araştırmacıların^{2,20,22} sonuçları ile uyumsuz görülmekle birlikte, çalışmamızda farklı suşların biyofilm formlarının farklı antifungal ajanlar için elde edilen duyarlılık sonuçlarının değişkenlik gösterebileceğinin vurgulanması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *C. parapsilosis* standart suşu ve *C. parapsilosis* izolatu için elde edilen sonuçlar, yukarıda bahsedilen araştırmacıların sonuçları ile uyumludur. Zira bu iki suşun BTY ile saptanan inokulum konsantrasyonlarının, planktonik formların inokulum konsantrasyonlarına denk olduğu görülmektedir. Düşük MBİK değerleri, amfoterisin B ve nistatinin her ikisinin de fungal hücre membranının bir komponenti olan ergosterol ile etkileşerek etki göstermesiyle ilişkilendirilebileceği gibi, mayaların inokulum konsantrasyonunun planktonik formlarının inokulum konsantrasyonu ile denk olmasının da önemli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda in vitro antifungal duyarlılık testleri uygulanırken, aynı suşun planktonik ve biyofilm formlarının duyarlılıklarındaki farklılıkların göz ardı edilmemesi gerektiği, ancak planktonik formlarının MİK değerlerinin tespit edilmesinde çok önemli bir aşama olan ilk inokulum konsantrasyonunun belirlenmesinin biyofilm formları için

uygulanan duyarlılık testlerinde de önemli olduğu tespit edilmiştir. İlk inokulum konsantrasyonu (biyofilmdeki maya hücresi sayısı) bilinmeyen CBY ile saptanan MBEK değerlerinin, genel olarak daha yüksek bulunması, ilk inokulum konsantrasyonlarının daha yüksek olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle BTY'nin daha güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçlar arasında biyofilm oluşturan ve planktonik formların ilaç duyarlılıkları arasında farklılıklar olabileceği, bazı ilaçlar için biyofilm formları planktonik formlara göre çok daha dirençliyen, bazı ilaçlar için iki formun duyarlılıkları arasında fark olmayabileceği, hatta biyofilm oluşturan formların daha duyarlı olabileceği görülmüş ve ilacın etki mekanizmasının da hesaba katılarak ileri çalışmalar yapılmasının uygun olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast. Approved Standard, M27-A3. 2008. CLSI, Wayne, Pa.
2. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In-vitro characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 277-81.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial blood stream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
4. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. Biofilms, *Infection and Antimicrobial Therapy*, pp.171-84. In: Hawser S, Islam K (eds), *Candida*. 2006. Taylor and Francis Group, Boca Raton.
5. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1773-80.
6. Ramage G, Walle K, Wickes B, Lopez-Ribot J. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2475-9.
7. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; 11: 160-7.
8. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1539-50.
9. Balaban N, Ren D, Givskov M, Rasmussen TB. Introduction, pp: 1-12. In: Balaban N (ed), *Control of Biofilm Infections By Signal Manipulation*. 2008. Springer, Berlin.
10. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. *İnönü Üni Tıp Fak Derg* 2006; 13: 193-7.
11. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T. Biotimer assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* 2008; 75: 478-84.
12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1771-6.
13. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.
14. Clutterbuck AL, Cochrane CA, Dolman J, Percival SL. Evaluating antibiotics for use a medicine using a poloxamer biofilm model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 15: 6-12.
15. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1915-22.
16. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, et al. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2612-7.

17. Özkan S, Kaynak F, Kalkancı A, Abbasoğlu U, Kuştımur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100: 319-24.
18. Özkan S, Kaynak F, Abbasoğlu U, Gür D. The susceptibility of *Candida* strains isolated from pediatric patients to various antifungal agents. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 253-6.
19. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 196-200.
20. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183: 5385-94.
21. Serefko A, Chudzik B, Malm A. In vitro activity of caspofungin against planktonic and sessile *Candida* spp. cells. Polish J Microbiol 2006; 55: 133-7.
22. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 1697-703.
23. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun 1994; 62: 915-21.