



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KANDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBİCANS SUŞLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMUNUN, ANTİFUNGAL AJANLARLA İNHİBİSYONUN VE BİYOFİLM
DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hanni Turan

Ankara, 2014



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KANDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBİCANS SUŞLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMUNUN, ANTİFUNGAL AJANLARLA İNHİBİSYONUN VE BİYOFİLM
DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hanni Turan

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Müge Demirbilek Ekici

Ankara, 2014

**Tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından KA13/150 Proje
Numarası ile Desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince tüm bilgi ve deneyimleri ile yanımda olan ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Jülide Sedef Göçmen'e, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan tez danışmanım değerli hocam sayın Doç. Dr. Müge Demirbilek Ekici' ye,

eğitimime önemli katkıları olan değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Füsün Can'a, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Hande Arslan'a ve Prof. Dr. Özlem Kurt Azap'a, eğitimimde önemli katkıları ve emekleri olan sayın Doç. Dr. Hikmet Eda Alışkan'a ve Doç. Dr. Şule Çolakoğlu' na, eğitimim sürecince desteği ve önemli katkıları olan sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru Bostanoğlu' na, tezimi tamamlamam sırasında istatistik çalışmalarındaki destekleri ve katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Canan Yazıcı' ya,

dostluk ve destekleri için sayın Dr. Pınar Fidan, Dr. Şükran Çopur, Dr. Ulya Keskin, Dr. Ekin Efe ve tüm asistan arkadaşlarıma,

eğitimim süresince birlikte çalıştığım laboratuvar teknisyenleri sayın Murat Ural ve Serdar Kurşunlu'ya,

Başta olmak Mine Öner'e, Ankara ve Adana Başkent Üniversitesi hastanesinde görevli olan tüm laboratuvar çalışanlarına, eğitimim sürecinde emekleri geçen tüm Başkent personeline en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tezimin gerçekleşmesi için etken madde sağlayan Merck (kaspofungin, posakonazol), Astellas (mikafungin) ve Pfizer (anidulafungin) firmalarına teşekkürlerimi iletirim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgi, destek ve fedakârlıklarından dolayı sevgili annem, babam, kardeşlerime, eğitimim süresince her zaman destek olan değerli eşim Haşmet, neşe ve mutluluk kaynağım olan oğlum Mehmet'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Hanni Turan

ÖZET

Kandan İzole Edilen *Candida Albicans* Suşlarında Biyofilm Oluşumunun, Antifungal Ajanlarla İnhibisyonun Ve Biyofilm Duyarlılığının Araştırılması

Son yıllarda artan tıbbi gereç kullanımından dolayı *Candida albicans* biyofilmine bağlı enfeksiyonların artması ve bu biyofilmlerin antifungal ajanlara yüksek direnç gösterebilmesi nedeni ile yeni tedavi protokollerine ve özellikle riskli hastalarda biyofilm oluşumunu engelleyen profilaktik ilaç rejimlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada sıklıkla hastane enfeksiyonlarına neden olabilen *Candida albicans*'ın biyofilm oluşturma oranlarını görmek ve özellikle yoğun biyofilm yapan suşlarda antifungal duyarlılık paternlerini planktonik ve sesil hücre karşılaştırmalı olarak incelemek hedeflenmiş, ayrıca bu suşlarda antifungallerin biyofilm oluşumunu önlemedeki etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Başkent Üniversitesi Ankara, Adana ve İstanbul hastanelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden elde edilmiş, germ tüp oluşumu ve Corn Meal Tween 80 besiyerindeki morfolojilerine göre tiplendirilmiş, 162 *Candida albicans* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm suşlarda Modifiye Christensen 96 kuyucuklu plak yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılıp derecelendirilmiştir. Randomize seçilen 30 yoğun biyofilm yapan klinik izolat, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* ATCC 90028 standart suşu, toplam 32 suş ayrıca iğne kapaklı mikropklarda biyofilm yapma yetenekleri XTT yöntemi ile araştırılmıştır. Bu suşların kaspofungin, mikafungin, anidulafungin flukonazol, voriconazol, posakonazol, itrakonazol, ve amfoterisin B'nin standart toz formları ile CLSI standartlarına uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi (M27-A3) ile antifungal duyarlılıkları çalışmıştır. Sesil formların antifungal duyarlılıkları ise aynı antifungal ajanlara karşı Modifiye Calgary biyofilm yöntemi ile minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyon (MBİK) değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ayrıca iğne kapaklı mikropklarda antifungal ilaçların planktonik hücreleri üzerinde biyofilm oluşumunu inhibe etme etkisi spektrofotometrik olarak ve spot ekimler ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda Modifiye Christensen yöntemi ile 162 suştan %38'i (n=61) orta düzeyde biyofilm yaparken, %29'unun (n=47) zayıf ve %23'ünün (n=37) ise yüksek düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm duyarlılık test sonuçlarına göre

ekinokandinler en düşük MBİK değerlerine sahip olarak terapötik konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Azoller ve amfoterisin B' ye karşı suşların tümü dirençli olarak saptanmıştır. Amfoterisin B'nin en düşük MBİK/ MİK oranı ile sesil hücrelere karşı en etkili olduğu görülse de, MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerleri CLSI'n duyarlılık aralığında bulunmamıştır. Biyofilm oluşumunda inhibisyon etki sonucuna göre itrakonazolün diğer ajanlara göre daha çok suşta inhibisyon (26/32 suş; %81,3) yaptığı saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda ekinokandinler biyofilmlere karşı en etkin grup olarak bulunmuştur. İtrakonazol ise biyofilm oluşumu inhibisyonunda en etkili antifungal olarak görülmüştür. Biyofilm antifungal duyarlılık testleri için, gerece bağlı enfeksiyonların tedavi ve profilaksisinde, standardize yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, biyofilm inhibisyon konsantrasyonu, Modifiye Christensen plak yöntemi, Modifiye Calgary biyofilm yöntemi, biyofilm oluşumu inhibisyonu

ABSTRACT

Biofilm Production By *Candida Albicans* Strains Isolated From Blood Cultures And Effects Of Antifungal Agents On Occured Biofilms And Biofilm Formation

Recently, the infections related to *Candida albicans* biofilms as well as the resistance of these biofilms to antifungal agents increased as a result of excessive use of medical equipments, and prophylactic medication regimes that inhibit formation of those biofilms are needed, particularly in high risk patients.

In this study, we aimed to determine the biofilm formation rate of *Candida albicans* that may frequently cause nosocomial infections, and investigate the antifungal sensitivity patterns in extensively biofilm forming species, comparatively in planktonic and sessile cells. We also aimed to investigate the efficacy of the antifungals for preventing biofilm formation in those species.

A total of 162 *Candida albicans* strains isolated from the blood cultures of Başkent University Ankara, Adana and İstanbul Hospitals' inpatients were included in the study. All strains identified by conventional methods; germ tube formation and corn-meal morphologies. The biofilm formation was investigated and graded using modified Christensen's 96 – well plate method. The biofilm forming capacities of randomly chosen 30 klinical isolates from strongly biofilm foming species, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* ATCC 90028 standart strains were investigated using XTT method in microplates with needle lids. The antifungal susceptibilities of those species for standard powder forms of caspofungin, micafungin, anidulafungin fluconazole, voriconazole, posaconazole, itraconazole, and amphotericin B were studied in accordance with CLSI standards, using broth microdilution method (M27-A3). The sensitivities of the same antifungal agents against sessile cells were studied using Modified Calgary biofilm method, and their minimum biofilm inhibition concentration (MBIC) values were determined spectrophotometrically. In addition, the inhibitory effects of the antifungal agents on biofilm formation of planktonic cells in mikroplates with needle lids were investigated spectrophotometrically and by spot inoculations.

Our study showed that there was moderate biofilm formation in 38% (n=61), weak biofilm formation in 29% (n=47), and extensive biofilm formation in 23% (n=37) of 162 species,

as determined with Modified Christensen method. The biofilm sensitivity results indicated that echinocandins had the lowest MBIC values which were within the therapeutic ranges. All species were resistant to azoles and amphotericin B. The lowest MBIC / MIC rate was determined with amphotericin B, but its MBIC₅₀ and MBIC₉₀ values were over the sensitivity range of CLSI. The inhibitory effect for biofilm formation results showed that itraconazole made inhibition in more species (26/32 species; 81.3%) when compared to the other agents.

In conclusion, echinocandins were found as the most efficient group against biofilms in our study. Itraconazole was the most effective antifungal agent for inhibiting biofilm formation. Standardized methods are needed for biofilm antifungal sensitivity tests in the treatment and prophylaxis of the infections caused by *Candida albicans*.

Key words: *Candida albicans*, biofilm inhibitory concentration, Modified Christensen plate method, Modified Calgary biofilm method, inhibition of biofilm formation.

İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa</i>
Özet	<i>iii</i>
İngilizce özet	<i>v</i>
İçindekiler dizini	<i>vii</i>
Kısaltmalar ve simgeler dizini	<i>ix</i>
Şekiller dizini	<i>xi</i>
Tablolar dizini	<i>xii</i>
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Kandidaların Genel Özellikleri	3
2.1.1. Kandida Enfeksiyonları	3
2.1.2. Kandida Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	5
2.2. Kandidalarda Biyofilm	6
2.2.1. Biyofilm Oluşumu	6
2.2.2. Biyofilm Oluşturma Modelleri	7
2.2.3. Biyofilm Oluşumunun Tespiti ve Kantitasyon Yöntemleri	8
2.2.4. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler	9
2.2.5. Biyofilm Oluşturma Oranları	10
2.3. Kandida Enfeksiyonlarında Kullanılan Antifungal Ajanlar	11
2.3.1. Polyenler	11
2.3.2. Azoller	11
2.3.3. Ekinokandinler	12
2.4. Kandidalarda Antifungal Duyarlılık	13
2.4.1. Antifungal Duyarlılık Testleri	13
2.4.2. Kandidalarda Antifungal Ajanlara Direnç	13
2.5. Kandida Biyofilmlerde Antifungal Duyarlılık	14
2.5.1. Kandida Biyofilm Duyarlılığı ve Direnç Mekanizmaları	14
2.5.2. Kandida Biyofilmlerde Duyarlılık Testleri	16
2.6. Kandida Biyofilm Oluşumunun İnhibisyonu	17

3.	Gereç ve Yöntem	19
3.1.	<i>Candida albicans</i> İzolatları	19
3.2.	Biyofilm Oluşumu	20
3.2.1.	Modifiye Christensen 96 Kuyucuklu Plak Yöntemi (MCY) ile Biyofilm Ölçümü	20
3.2.2.	İğne Kapaklı Plaklarda Biyofilm Ölçümü	22
3.3.	Antifungal Duyarlılık Testleri	24
3.3.1.	Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Testi	24
3.3.2.	Sesil Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Testi	26
3.4.	Biyofilm İnhibisyon Deneyi	28
3.5.	İstatistiksel Analiz	29
4.	Bulgular	30
4.1.	<i>Candida albicans</i> İzolatları	30
4.2.	Biyofilm Oluşumu	31
4.3.	Antifungal Duyarlılık Sonuçları	33
4.3.1.	Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları	33
4.3.2.	Sesil Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları	34
4.3.3.	Planktonik ve Sesil Hücrelerde Antifungal Duyarlılık Test Sonuçlarının Karşılaştırılması (MBİK/MİK Oranı)	35
4.4.	Biyofilm İnhibisyon Deneyinin Sonuçları	37
5.	Tartışma	40
6.	Sonuç	56
7.	Kaynaklar	58

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABLC	Amfoterisin B Lipid Kompleks
ATP	Adenozin 3'-trifosfat
BİK	Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BTY	Bio Timer Yöntemi
CDC	Centers for Disease Control
CDR	Candida Drug Resistance
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CBD	Calgary Biyofilm Gereci
CFU	Coloni Forming Unit
CSLM	Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi
DNA	Deoxyribonucleic acid
erg	Ergosterol
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
KNS	Koagulaz Negatif Streptokok
KV	Kristal Viyole
MBİK	Minumum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon
MBEK	Minumum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyon
MİK	Minumum İnhibitör Konsantrasyon
MCY	Modifiye Christensen 96 Kuyucuklu Plak Yöntemi
MCBY	Modifiye Calgary Biyofilm Yöntemine
MDR	Multidrug resistance
MOPS	Morfolinpropanasulfonik asit
MRD	Modifiye Robbins Gereci
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi

PBS	Fosfat Tamponlu Su
PVC	Polivinilklorür
RİA	Rahim İçi Araç
SDA	Sabouraud dekstroz agar
SE	Silikon Elastomer
SEM	Tarayıcı Elektron Mikroskopi
SVK	Santral Venöz Kateter
XTT	2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide

ŞEKİL DİZİNİ

	<i>Sayfa</i>
Şekil 4.1. <i>Candida albicans</i> ; germ tüp oluşumu mikroskopik görünümü	30
Şekil 4.2. Corn Meal Tween 80 Agar besiyerinde 72 saat sonunda <i>C.albicans</i> 'ın oluşturduğu klamidosporelerin mikroskopik görünümü	31
Şekil 4.3. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikrotiplerde oluşturulan 24 saatlik biyofilmlerin kristal viyole ile boyanmasının makroskopik görünümü	31
Şekil 4.4. <i>C. albicans</i> suşlarında biyofilm oluşturma oranları	32
Şekil 4.5. İğne kapaklarda biyofilm oluşumu. İğne uçlarında 48 saatlik inkübasyon sonrası makroskopik olarak kolonilerin görünümü	32
Şekil 4.6. Biyofilm oluşmuş iğne kapaklarda XTT'nin uygulanması sonrası 96 kuyucuklu plaktaki renk değişiminin görünümü	33
Şekil 4.7. Sonikasyon sonrası direkt ekim ve 1/10; 1/100; 1/1000 dilüsyonlarının spot ekimlerinin görünümü	37

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1.	Planktonik hücrelerin duyarlılığında kullanılan antifungal ajanların konsantrasyonları	25
Tablo 3.2.	Antifungal ajanların duyarlılık aralıkları (CLSI M27-A3 (S4)'e göre)	26
Tablo 3.3.	Sesil hücrelerin duyarlılığında kullanılan antifungal ajanların konsantrasyonları	27
Tablo 4.1.	<i>C. albicans</i> üreyen hastaların kliniklere göre dağılımı	30
Tablo 4.2.	Planktonik (MİK) ve sesil hücrelerin (MBİK) antifungal duyarlılık sonuçları (µg/ml)	34
Tablo 4.3.	Sesil ve planktonik hücrelerin MİK değerlerinin (MBİK/MİK) oranlanması	36
Tablo 4.4.	Otuz <i>C. albicans</i> klinik izolatın ve iki standart suşundaki antifungal ajanların MBİK/MİK oranların dağılımı	36
Tablo 4.5.	Otuz <i>C. albicans</i> klinik izolatın ve iki standart suşundaki antifungal ajanların BİK dağılımı	39

1. GİRİŞ

Kandida türleri en sık izole edilen insan mantar patojenleri arasında yer almaktadır ve yüzeysel mukozal enfeksiyondan ciddi derin sistemik enfeksiyona kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptir (1,2). Artan biyomateryal implantasyonu gibi işlemler, kemik iliği ve solid organ transplantasyonu, immünsüpresif tedavi ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ciddi sistemik hastalıklara neden olmaktadır (2).

Kan yolu ile ilişkili enfeksiyonlarda kandida türleri dördüncü sırada yer almakta, kandideminin mortalite oranları ise %39'a varmaktadır (3, 4).

En önemli virulans faktörlerinden birisi kandida türlerinin farklı yüzeylere yapışması ve matriks ile örtülmüş biyofilm olarak adlandırılan mikrobiyal topluluklar oluşturmalarıdır (1). Kandida türleri farklı derecelerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip ve sıklıkla biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda görülmektedir (1). Özellikle *C. albicans* yoğun biyofilm yapan mantarlar arasında yer almaktadır (5, 6).

Biyofilmin oluşumunu göstermek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Biyofilm yapısı Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi ve Tarayıcı Elektron Mikroskopi gibi mikroskopik yöntemlerle gösterilirken, kuru ağırlık ölçümü, lösün inkorporasyon yöntemi ile radyoaktif madde alımı ya da Christensen yöntemi gibi kolorimetrik yöntemler ile biyofilmin yoğunluğu ve derecesi tespit edilebilmektedir (5, 7-9).

Biyofilmdeki hücreler dış ortam, immün sistem ve antifungal tedaviden korunmakta ve yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç biyofilmin en önemli özelliği olarak görülmektedir (1). *Candida albicans*'a bağlı enfeksiyonların tedavisinde farklı grup antifungaller kullanılmaktadır (9-11). En sık tercih edilen flukonazole karşı *C. albicans* biyofilmleri yüksek direnç göstermektedir (1, 7, 12). Amfoterisin B biyofilimde doza bağımlı aktivite gösterirken (11), ekinokandinler biyofilme karşı in-vitro olarak etkili görülmektedir (1, 13, 14). Yeni azollerin çoğu ise planktonik hücrelere etkili olduğu halde, sesil formlara karşı yeterli düzeyde inhibisyon yapamamaktadır (11, 13, 14).

Kandida türlerinin planktonik formlarının antifungal duyarlılık ölçümü için minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirleyen CLSI sıvı mikrodilüsyon yöntemi halen laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir. Ancak birçok araştırma bir mikroorganizmanın planktonik ve sesil formlarının duyarlılığının farklı olduğunu tespit etmiştir. MİK sonuçlarına göre tedavi stratejileri biyofilme bağlı enfeksiyonlarda başarısızlık ile sonuçlanabilmektedir. Bu yüzden sesil hücrelerin duyarlılığını ölçen standardize yöntemlere gerek duyulmaktadır. Calgary Biyofilm, BioTimer ve 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide (XTT) yöntemi gibi çeşitli yöntemlerin üzerinde çalışılmıştır (15-17).

Onkolojik ve immünsüprese hastaların, implant uygulanmış olan riskli hasta gruplarının artmasına bağlı hayatı tehdit eden biyofilme bağlı enfeksiyonlar sıklıkla görülmekte ve profilaktik tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (18, 19). Antifungallerin sub-inhibitör konsantrasyon dozlarında verilmesinin enfeksiyon profilaksisindeki yararı ve kandida biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisini araştıran kısıtlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmada sıklıkla kan yolu enfeksiyonlarına neden olabilen *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma oranlarının gösterilmesi ve antifungal duyarlılık profilleri planktonik ve sesil hücre karşılaştırmalı olarak incelenmesi hedeflenmiş, ayrıca antifungallerin biyofilm oluşumunu önlemedeki etkinliğini yoğun biyofilm yapan suşlarda araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kandidaların Genel Özellikleri

Kandida türleri normal deri ve mukoza florasında bulunan, 3-6 µm boyutlarında, yuvarlak veya oval mikroorganizmalardır (2). Kandida cinsi yaklaşık 200 kandida türünden oluşmaktadır (10). İnsan patojeni olarak önemli türler arasında *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. kefyr* yer almaktadır. Ayrıca *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvogenesis*, *C. famata*, *C. zeylonoides* ve *C. utilis* de enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (2). *Candida albicans* hasta örneklerden en sık izole edilen tür olarak bilinmekte ve bazı virulans faktörlerine sahip olması hastalık oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır. Virulans faktörlerinin arasında hızlı üreme, integrin benzeri yüzey adezinler, hidrofob özelliği, proteaz üretimi, fenotipik değişim ve hif oluşumu ile epitelyum hücreyi penetre edebilme yer almaktadır (2, 10). İnsan ve hayvan dışında hava, su ve toprakta da bulunmaktadır (20).

2.1.1. Kandida Enfeksiyonları

Kandida türleri normal insan florasında ve özellikle gastrointestinal florada bulunduklarından dolayı enfeksiyonların çoğu endojen kaynaklı olmaktadır. Floradaki hücre sayısının artışı ile kolonizasyonu enfeksiyon izlemektedir. Ekzojen olarak insandan insana; doğum sırasında vajen yolu ile anneden yenidoğana, cinsel yol ile partnere ve el taşıyıcılığı ile sağlık personelinin yatan hastalara geçebilmektedir (2).

Kandidozlar deri ve mukozayı tutan yüzeysel enfeksiyonlar ve iç organları tutan derin enfeksiyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Yüzeysel enfeksiyonlar olarak ağız, deri, genital, kronik muko-kütanöz kandidoz ve onikomikoz görülmektedir. Kandidemi derin veya sistemik enfeksiyonlar izlemektedir. Santral damar kateteri ve cerrahi gibi invaziv işlemler veya gastrointestinal mukoza harabiyetinde kandidemi görülebilmektedir. Kandidemi sağlıklı bireylerde genelde geçici bir durumdur, mantar hücreleri kısa sürede kandan uzaklaştırılmaktadır. Ancak konak savunması normal olmayan ve predispozan faktörü olan hastalarda mantar hücreleri çoğalıp karaciğer, dalak, böbrek, kalp, beyin ve deri gibi organlara yerleşerek enfeksiyon odağı oluşturmaktadır. Predispozan faktörler arasında ise en sık kortikosteroid ve immünsüpresif ilaç tedavisi, ayrıca hematolojik ve kronik granümatöz hastalıklar yer almaktadır (2).

Son yıllarda artan tıbbi girişimler, immünsüpresif tedavi, antibiyotik kullanımı, ayrıca nötropenik ve immünsüprese hastaların artması *albicans* dışı kandidaların; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*; kandidoz etkeni olarak daha fazla görülmesine neden olmaktadır (2). *C. albicans* ise tüm kandidozların en sık etkeni olarak izole edilmektedir. Özellikle invaziv fungal enfeksiyonlarda, kandidemide ve AIDS gibi bağışıklık sistemi bozuk olan hastalarda akut psödomembranöz oral kandidoz olgularında en sık etken olarak bilinmektedir (4, 10, 21).

Kandidemi

Kandidemi klinik açıdan büyük bir sorun teşkil etmektedir. Tedavideki zorluklar nedeniyle kandideminin mortalite oranları %39'lara varmaktadır (3, 4, 22). Ekonomik açıdan yatış süresini uzatarak hospitalizasyona bağlı masrafları da arttırmaktadır (23, 24).

Candida türleri, Amerika Birleşik Devletleri'nde nozokomial kan yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unda etken olarak bilinmekte (4), ayrıca koagülaz negatif stafilokok (KNS), *S.aureus*, *Enterococcus* türlerinden sonra en sık görülen kan yolu enfeksiyonu etkenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (3). Enfeksiyonların %95'i en sık beş türden kaynaklanmaktadır (sırasıyla); *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, ve *C. krusei*. Bunları *C. dubliniensis* ve *C. lusitaniae* izlemektedir (4, 25).

Son üç dekada tür dağılımında değişiklikler olduğu gözlenmektedir. *C. albicans*'ın yerine *albicans* dışı türler majör etken olarak saptanmaktadır. Özellikle *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* kandidemilerinde artış gözlenmektedir (4, 25, 26). Bu değişimin nedeni olarak *albicans* dışı türlerin, özellikle *C. glabrata*'nın, ucuz ve kolayca ulaşılabilen flukonazole karşı daha az duyarlı olması gösterilmektedir (4).

Dağılım değişimlerine rağmen *Candida albicans* dünya çapında kandideminin en sık etkeni olarak izole edilmeye devam etmektedir. Bunun dışında dünya çapında yapılan güncel surveyans çalışmaları kandidemi olgularında birden fazla türün izole edilmesinin %2,1 oranında olduğunu göstermektedir. Birden fazla türün etkin olduğu kandidemilerde *C. albicans* ile birlikte en sık olarak *C. glabrata* izole edilmektedir (4).

2.1.2. Kandida Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Mikroskopi

Kandidoz tanısında, bir klinik örnek öncelikle direkt mikroskopik incelemeye alınmalıdır. Deri ve tırnak kazıntıları inceleme için %10-30'luk potasyum hidroksit ile hazırlanır. Epitel hücrelerinin erimesi ile maya hücreleri ve hifler daha iyi görülmektedir (10). Steril vücut sıvılarında, santrifüj sonrası Gram boya uygulanması ile maya yapılar gram pozitif olarak izlenmektedir (2).

İzolasyon

Kandida türleri ağız ve gastrointestinal floranın normal elemanı olduğundan balgam ve dışkı örneklerinden izolasyonu enfeksiyon tanısını koydurmaz. Steril vücut sıvılarından izolasyonu derin kandidoz u işaret etmektedir. Sistemik kandidoz veya enfekte intravenöz kateter enfeksiyonuna bağlı pozitif hemokültür geçici bir kandidemiye işaret edebilmektedir ve ikisinin ayrımında birden fazla hemokültür perifer damar ve mevcut intravenöz kateterden alınmalıdır (2).

Kandida türlerinin izolasyonunun sağlaması için hasta örnekleri Patates Dekstroz Agar veya Sabouraud Dekstroz Agar gibi rutin üretim besiyelerine ekilebilir. Oda sıcaklığında ve 37°C' de 24 saat içinde tipik, mayamsı kokulu, beyaz-krem renginde yumuşak yapıdaki koloniler görülmektedir (2). Bazı *C. albicans* suşları ise kanlı agarda kenarlarında kısa uzantıları olan 'ayaklı koloniler' oluşturabilmektedir (10).

Tiplendirim

Tomurcuklanarak çoğalan hücreler birbirinden ayrılmayıp yalancı hif oluşturmaktadır. *C. glabrata* dışında tüm türlerde yalancı hif oluşumu görülmektedir. Corn Meal Tween 80 agarda kandida türleri yalancı hif dizilimine göre morfolojik olarak birbirinden ayırt edilebilmektedir. Ayrıca biyokimyasal testler kullanılarak karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon özelliğine göre kandida türleri tiplendirilmektedir (2). Bunun için özellikle *albicans* dışı türlerin tiplendirilmesinde API® 20 C AUX (bioMérieux®, Fransa) gibi yarı otomatize sistemler hastane laboratuvarında sıklıkla uygulanmaktadır. Bazı türleri birbirinden kolayca ayırt etmek için tarama testi olarak kromojenik agarlar (CHROMagar Candida®, BD) kullanılmaktadır (21).

C. albicans serum içinde 2-3 saat içinde germ tüp oluşturmaktadır. Corn Meal Tween 80 agarda oluşturduğu tipik klamidosporeler ve ayrıca germ tüpleri ile diğer türlerden kolayca ayırt edilmektedir (2). Ancak *C. albicans* suşlarının %5'inin germ tüpü negatif olması dikkate alınması gereken bir durumdur (27).

2.2. Kandidalarda Biyofilm

Kandida türlerinin en önemli virülans faktörlerinden birisi farklı yüzeylere yapışması ve 'matriks ile örtülmüş biyofilm' olarak adlandırılan mikrobiyal topluluklar oluşturmalarıdır (1). Endokardit gibi ciddi enfeksiyonlar biyofilm kaynaklı olabilmektedir (28). Bunun dışında biyofilm oluşumuna tıbbi gerece bağlı enfeksiyonlarda sık rastlanılmaktadır. Kandida biyofilmleri farklı kateterlerde (santral venöz kateter (SVK) gibi vasküler, peritoneal-dializ, üriner kateterler), endotrakeal tüp, stent ve şantlar (santral sinir sistem şant), implantlar (kalp kapakçık), pacemaker, protezler (trakeo-özofageal konuşma, eklem, dental protezler) ve rahim içi araç (RİA) gibi çoğu tıbbi gereçlerde görülmektedir (1, 7, 29). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara sıklıkla *C. albicans* neden olmaktadır (1) ve SVK, RİA ve yapay konuşma protezleri gibi tıbbi gereçlerden en sık izole edilen mantardır (30, 31).

2.2.1. Biyofilm Oluşumu

Çalışmalar biyofilm oluşumunun dört farklı basamakta geliştiğini göstermiştir (32):

1. Yüzey adezyonu,
2. Mikrokoloni oluşumu ve hücrelerel organizasyon,
3. Ekstraselüler polimerik maddenin (EPS) salgılanması ve üç boyutlu yapının olgunlaşması,
4. Hücrelerin yayılması.

Candida albicans biyofilmi kompleks, heterojen ve bifazik yapıya sahiptir (7). Oluşumu zamansal olarak üç faza ayrılmaktadır (1, 6, 7):

- Erken faz (0-11 saat); aderens ve blastokonidiya içeren mikrokoloniler ile karakterizedir.
- Orta faz (12-30 saat); bazal blastokonidiya ve hiflerden oluşan çift tabakalı yapı gelişmektedir, ayrıca EPS salgılanmaktadır.

- Matürasyon fazı (31-72 saat); kalın EPS ile kaplanmış yoğun bifazik heterojen ağ yapısı oluşmaktadır.

Kandida türlerinin biyofilm kalınlıkları ile ilgili olarak 25-450 µm arasında değişen veriler bildirilmiştir (33).

2.2.2 Biyofilm Oluşturma Modelleri

Biyofilm oluşumunu araştırmak için hem in-vitro hem in-vivo modeller bulunmaktadır.

İn-vitro modeller statik ve dinamik yöntemlere ayrılmaktadır (29). Statik şartlarda biyofilm oluşturmak için farklı yüzey özelliklerine sahip olan materyaller kullanılmıştır. Bu materyaller arasında

- Mikroplak (genelinde 96 kuyucuklu),
- Kateter disk,
- Dentur akrilik strip,
- Silikon elastomer,
- Polivinilklorür (PVC),
- Cam boncuk

yer almaktadır (16, 29, 34). İlk geliştirilmiş olan kateter disk yöntemi ve ayrıca mikroplak yöntemi en sık kullanılan materyallerdir (29, 34).

Biyofilm oluşumunu akış şartları altında araştırmak için farklı kompleks modeller bulunmaktadır. Dinamik sistemlerin arasında

- Silindirik selüloz filtre,
 - Perfüze biyofilm fermenter,
 - Modifiye Robbins Gereci (MRD),
 - ‘Centers for Disease Control’ (CDC) biyoreaktör sistemler ve
 - Calgary Biyofilm Gereci (CBD)
- yer almaktadır (29, 34).

İn-vitro modellerin biyofilm ve konak immün sisteminin etkileşimini taklit edememesi en önemli sınırlayıcı yönüdür. Bu açıdan in-vivo deneyler önem taşımaktadır. Tavşan, sıçan ve farelerde SVK enfeksiyonunu taklit etmek için modeller geliştirilip, in-vivo oluşan biyofilmlerin yapısal olarak in-vitro biyofilmlere benzediği görülmüştür. *C. albicans*

biyofilm araştırmalarında in-vitro deneyler sıklıkla kullanılmakta, hayvan modelleri ise biyofilm patogenezi araştırmaları için tercih edilmektedir (29).

2.2.3. Biyofilm Oluşumunun Tespiti ve Kantitasyon Yöntemleri

Kandida biyofilmin oluşumunu ve yapısını göstermek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Mikroskopik yöntemler arasında, özellikle biyofilmin yapısını araştırmak için,

- Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi (CSLM),
- Tarayıcı Elektron Mikroskopi (SEM) ve
- Epifloresans Mikroskopi yer almaktadır (5,7).

Bilgisayar programlarının geliştirilmesi ile mikroskopik görünüme göre biyofilm kantitasyonunu yapmak da mümkün olmaktadır (35).

Biyofilm kitle kantitasyonu için sıklıkla

- Christensen boyama yöntemi,
- Safranin boyama yöntemi,
- CFU (Colony Forming Unit) hücre sayımı,
- Kuru ağırlık ölçümleri ve
- Total protein miktar ölçümleri kullanılmaktadır (8, 9, 35-39).

Bunun dışında moleküler yöntemler olarak

- DNA miktarının ölçümü ve
- Gerçek zamanlı PCR uygulanabilmektedir (8).

Ayrıca canlı sesil hücrelerin metabolik aktivitesini ölçerek biyofilm kantitasyonu yapılabilir. Bu yöntemler arasında

- 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT),
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT),
- BioTimer,
- Lösin inkorporasyon (yaşayan sesil hücrelerin radyoaktif madde alımı) ve
- Adenozin 3'-trifosfat (ATP) biyoluminesans (yaşayan sesil hücrelerin ATP varlığında ışık yayılımı) bulunmaktadır (5, 16, 36, 37, 40).

Modifiye Christensen Yöntemi

Bu yöntemde biyofilm oluşumu için düz tabanlı 96 kuyucuklu plakların kullanılması önerilmektedir (37, 39). Biyofilm hücrelerini boyaması için kullanılan kristal viyole bazik bir boyadır ve negatif yüklü yüzey moleküllerine ve ekstraselüler maddenin polisakkaritlerine bağlanarak hem yaşayan hem de ölü hücreleri boyamaktadır (9, 37). Çözeltiler ile hücrelerin boyadan ayrılması sağlanıp spektrofotometrik olarak optik dansite (OD) değeri ölçülerek hücre yoğunluğu tespit edilmektedir (41). Bu kolorimetrik yöntem ilk Christensen ve arkadaşları tarafından 1985'de 96 kuyucuklu mikropiğin tabanında koagülaz negatif stafilokokların oluşturduğu biyofilmin yoğunluğunu ölçmek için geliştirilmiştir (42). Daha sonra Stephanovic ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş ve boyanın çözülmesi sağlanarak doğruluğu arttırılmıştır (41). Sıklıkla bakterilerde uygulanan yöntem (39), *C. albicans* biyofilm kantitasyonu için de kullanılmaktadır (8, 9, 36, 37).

XTT Yöntemi

Bu yöntem ile biyofilmde yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesi ve dolaylı olarak yoğunluğu ölçülmektedir. Maya hücrelerinin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi XTT maddesini redükte etmesiyle suda çözünebilir renkli formazan ürünü oluşmaktadır (9). Spektrofotometrik olarak elde edilen OD değeri yaşayan hücre sayısı ile orantılıdır (12, 43). *C. albicans* in-vitro biyofilm çalışmalarında XTT yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (6, 8, 9, 36, 37, 44).

2.2.4. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Birçok araştırmada kandida türlerinde biyofilm oluşumunun çevresel faktörlere ve türe bağlı değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların farklı deney şartlarına bağlı olduğu bilinmektedir.

1. Besin kaynağı:

Çeşitli karbonhidratların biyofilm oluşumu üzerinde farklı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Calgary biyofilm gerecinde *C. albicans* için en fazla biyofilm oluşturan karbonhidratlar sırasıyla süktroz > maltoz > glukoz > fruktoz > laktoz olarak bildirilmiştir (45). Ayrıca polivinilklorür (PVC) kateterlerde yüksek galaktoz konsantrasyonunun *C. albicans* suşlarında biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (5).

2. Yüzey Yapı:

Materyallerin yüzey yapı özelliklerinin biyofilm oluşumunu etkilediği bilinmektedir. En fazla biyofilm oluşumunu destekleyen materyal yüzeyleri sırasıyla: lateks ve silikon elastomer (lateks core) > PVC > poliüretan ve %100 silikon olarak bulunmuştur (5).

3.Yüzey Pre-İnkübasyon:

In-vivo şartlarda kateter ve başka implantlar hızlı şekilde konak proteinlerini absorbe ederek biyofilm oluşumunu destekleyen bir film oluşturmaktadır. Aynı şekilde in-vitro deneyler PVC kateter disklerin fibrinojen veya kollajen ile preinkübasyonunun *C .albicans* biyofilm oluşumunu arttırdığını göstermiştir (34). Ayrıca dentur akrilik yüzeylerde salyanın biyofilm arttırıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür (46).

4. Akış /Statik şartlar:

Araştırmalar akış altında biyofilm oluşumunun hızlandığını, EPS ve hücre yoğunluğunun arttığını göstermektedir. Akış şartları altında sekiz saatlik *C. albicans* biyofilminin kompleks yapısının statik şartlardaki 24 saatlik biyofilmdekine benzediği görülmüştür (47).

5. Tür:

Biyofilm oluşturma yeteneği açısından türler arasında farklılıklar bilinmektedir. Bu konu takip eden bölümde daha ayrıntılı şekilde anlatılmaktadır.

2.2.5. Biyofilm Oluşturma Oranları

Araştırmalar çeşitli kandida türlerinin farklı derecelerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak çalışmalar birbiriyle çelişkili sonuçlar doğurmuştur. Bunun nedenleri arasında özellikle önceki bölümde belirtilen deney şartlarının farklılığı yer almaktadır.

Biyofilm oluşturma oranları izolasyon bölgesine göre de farklılıklar göstermiştir. Kan yolu enfeksiyonlarında *albicans* dışı izolatlar, özellikle *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, başka bölgelere nazaran daha yüksek oranda biyofilm oluşturmaktadır (38). Buna karşın başka bir araştırmada *C. albicans* 'ın (%39,3 biyofilm pozitif) *albicans* dışı türlere göre (%37,79 biyofilm pozitif) daha yüksek oranda biyofilm yaptığı bildirilmiştir (48). Ayrıca araştırmalar *C.albicans* 'ın diğer türlere göre daha yoğun biyofilm yaptığını göstermiştir (5, 6).

Kandidemili hastaların kan kültürlerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının kendi içindeki biyofilm oluşturma oranları için farklı sonuçlar bildirilmiştir. İsveç'te yapılan bir çalışmada 243 izolatın %40,3'ü biyofilm pozitif bulunurken (44), Kore'de yapılan çalışmada nötropenik hastaların kanından izole edilen 30 *C. albicans* suşunun sadece %7'si biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir (38). Türkiye'de yapılan iki çalışmada farklı bölgelerden izole edilen *C. albicans* suşlarının %23'ü (18/79) ve %39,9'u (94/239) biyofilm pozitif olarak görülmüştür (48, 49).

2.3. Kandida Enfeksiyonlarında Kullanılan Antifungal Ajanlar

Kandida enfeksiyonlarının tedavisinde farklı grup antifungal ajanlar kullanılmaktadır. Özellikle azol türevi bileşikler, ekinokandinler ve polyenler antifungal ilaçlar arasında yer almaktadır (10). Ağır fungal enfeksiyonların ilaçla tedavisinde altın standart olan amfoterisin B' ye alternatif olarak yeni geliştirilen posakonazol gibi geniş spektrumlu azoller ve ekinokandinler kullanıma girmiştir.

2.3.1. Polyenler:

Amfoterisin B ve lipid formülasyonları polyen bileşiklerdir. Ergosterole bağlanarak fungal membranda por oluşturmak suretiyle permeabilityi artırıp ozmotik bütünlüğü bozarak fungusit etkiye neden olurlar. Geniş spektrumlu bir ilaç olarak başlıca sistemik kandidoz tedavisinde kullanılmaktadır. Emilim özelliklerinden dolayı sadece parenteral formu mevcuttur. Nefrotoksik yan etkilerinden dolayı lipid formülasyonları (lipozomal amfoterisin B, amfoterisin B lipid kompleks) geliştirilmiştir. Bunlar az toksik ve güvenilir olup iyi tolere edilmektedir (10).

2.3.2. Azoller:

Azoller, lanosterolden ergosterol sentezinde yer alan sitokrom P450 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek mantar hücre membranının sentezini sonlandırırlar. Genelde fungistatik etkiye sahiptirler. Bu bileşikler iki alt gruba ayrılır: *imidazol* ve *triazoller* (10).

İmidazol

- *Ketokonazol*, imidazol türü bir bileşiktir. Sistemik ve kutanöz kandidoz tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Ancak hepatik ve gastrik toksisitesinden dolayı ve daha az toksik alternatif ilaçların klinik kullanımda olması nedeniyle nadir kullanılmaktadır (10).

Triazoller:

- *Flukonazol*, kandidoz tedavisinde ve ayrıca transplant olgularının profilaksi ve kronik supresyon tedavisinde kullanılan bir ajandır. Gastrik, hepatik ve endokrinolojik yan etkilerinin düşük olması ve beyin omurilik sıvısına (BOS) iyi geçmesi avantajlarıdır. Flukonazol birçok kandida türüne etkilidir, ancak *C. krusei* flukonazole karşı doğal direnç sergilemektedir (10).
- *İtrakonazol*, geniş spektrumlu antifungal etkili bir ilaçtır. En önemli avantajı *Aspergillus* spp.'ye de antifungal etki gösteriyor olmasıdır. Kandidoz tedavisinde kullanılmakta, özellikle diğer azollere yanıt vermeyen olgularda, örneğin flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarının bir kısmına etkili olabilmektedir. Kök hücre transplantasyonun uzun dönem profilaksisinde ise flukonazole göre üstünlük gösteren bir ilaçtır (10).

Yeni triazoller:

- *Vorikonazol* ve *posakonazol* geniş antifungal etki spektrumuna sahip olarak birçok kandida türüne etkilidir. İnvaziv fungal enfeksiyonlarda kullanılmaktadır ve flukonazole ve itrakonazole karşı dirençli olan kandida türlerinin bazılarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir. İkisinin arasındaki majör fark posakonazolün ayrıca *Zygomycetes* spp.'ye karşı da etkili olmasıdır (10, 50).

2.3.3. Ekinokandinler:

Ekinokandinler 1,3- β -D-glukan sentezini inhibe edip mantar hücre duvar sentezini durdurarak fungistatik etki sergilemektedir. Bu grupta kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin yer almaktadır. Sadece parenteral formları mevcuttur ve minimal düzeyde toksisiteye yol açan güvenli bileşiklerdir. Geniş antifungal etki spektrumuna sahip olmakla beraber amfoterisin B ve flukonazole dirençli kandida türlerine de etkili olmaları en önemli avantajlarından birisidir. Kullanım endikasyonlarının arasında özellikle özofageal kandidoz ve kandidemi yer almaktadır. Bunun dışında kaspofungin antibakteriyel tedaviye yanıt vermeyen febril nütropenide ampirik tedavi olarak kullanılmaktadır. Mikafungin ise hematopoetik kök hücre transplantasyon olgularında flukonazolden daha üstün olup antifungal profilakside kullanılmaktadır (10).

2.4. Kandidalarda Antifungal Duyarlılık

2.4.1. Antifungal Duyarlılık Testleri

İn-vitro duyarlılık testleri rutin laboratuvarlarda ve ayrıca epidemiyolojik araştırmalarda sık kullanılmaktadır. Laboratuvarların rolü, klinisyeni tedavi seçiminde ve antifungal tedavi monitorizasyonunda yönlendirmektir (51).

Antifungal duyarlılık testleri sıvı dilüsyon (mikro- ve makrosıvı dilüsyon CLSI M27-A3 belgesi, EUCAST E.DEF7.1 belgesi) ve disk-difüzyon metodları (CLSI M44-A belgesi) olarak mayalarda etkili olan birçok antifungal ajan için standardize edilmiştir (51, 52). Mikroplak sıvı dilüsyon yöntemi, Minimal İnhibitör Konsantrasyon değerinin (MİK; üremeyi durduran en düşük antifungal konsantrasyon) belirlenmesinde sık kullanılmaktadır (51).

Klinik ve Laboratuvarı Standart Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST), bu yöntemin uygulamasında mikroplak (U tabanlı/düz), besiyeri, inokulum ayarı, inkübasyon süresi ve okuma yöntemi seçiminde (göz/spektrofotometrik) farklı uygulamalar önermektedir (53). Ticari olarak edinilebilen yöntemler arasında Sensititre® Yeast One™ (Trek Diagnostik Systems Inc. ABD) mikrodilüsyon yöntemi, ATB Fungus® (bioMérieux®, Fransa) yarı otomatize yöntemi, Vitek®2 (bioMérieux®, Fransa) otomatik mikrodilüsyon yöntemi, Etest® (AB Biodisk, İsveç) agar difüzyon yöntemi yer almaktadır (51).

2.4.2. Kandidalarda Antifungal Ajanlara Direnç

Global, ülke bazında veya çok merkezli sürveyans çalışmaları kandida türlerinin tanımlanmasını ve antifungal duyarlılığını araştırmakta ve tür dağılımındaki değişim paternlerini, az duyarlı ve nadir suşların ortaya çıkmasını net bir şekilde göstermektedir (21).

SENTRY Antimikrobial Sürveyans Programı 1997'den beri birçok mantarın global duyarlılığını yeni ve kullanımda olan antifungal ajanların etkinliğini takip etmektedir. Son açıklanan 2013 raporunda Kuzey Amerika, Latin Amerika, Avrupa ve Asya Pasifik bölgelerinde invaziv mantar enfeksiyonu geçiren hastalardan elde edilen 1405'i *C. albicans* olmak suretiye toplam 3107 klinik kandida izolatının yeni ekinokandinleri ve

azolleri de kapsayan birçok antifungal ajana karşı duyarlılığı değerlendirilmiştir. Yaygın kandida türleri çoğunlukla triazollere ve ekinokandinlere karşı duyarlı bulunmaktadır (21). Coğrafik bölgelere bağlı *C. albicans*ise ekinokandinlere karşı düşük düzeyde (%0,0- 0,6) direnç göstermiştir. Anidulafungine karşı direnç görülmemişken, Avrupa'da mikafungine ve kaspofungine aynı düzeyde (%0,4), Asya-Pasifik bölgesinde ise kaspofungine karşı düşük düzeyde (%0,6) direnç tespit edilmiştir. Tüm bölgelerde *C. albicans*'ın flukonazole ve vorikonazole karşı direnci benzer şekilde düşük bulunmuştur (%0,0- 0,6). Posakonazol için özellikle Avrupa (%8,3) ve Latin Amerika'da (%6,5) azalan duyarlılık gösterilmiştir (total %4,4) (21).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 ve 2010 arası sürdürülen iki merkezli bir surveyans çalışmasında, kandidemiye neden olan 877 *C. albicans* ve toplamda 2329 kandida izolatının duyarlılığı için önceki araştırma ile benzer sonuçlar elde etmiştir. Ekinokandinlere karşı toplam direnç kaspofungin ve mikafungin için %1,0 ve mikafungin için %1,1 olarak düşük düzeyde bulunmuştur. Azollerde flukonazole karşı %7,3 ve itrakonazole karşı %21,1 değeri ile yüksek düzeyde direnç tespit edilmiştir. Ekinokandin ve iki azolde yüksek direnç oranının özellikle *C. glabrata* kaynaklı olduğu da bildirilmiştir. Yeni azollerde vorikonazole karşı direnç %1,0 değeri ile düşük düzeyde olup ve posakonazol için türlerin çoğunda MİK₉₀ ≤0,5 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Amfoterisin B için dört *albicans* dışı izolatta 2 µg/ml MİK değeri tespit edilmiştir. *C. albicans* suşları ekinokandinlere karşı düşük düzeyde direnç göstermiştir. Anidulafungin ve mikafungin için direnç oranları %0,3 olarak saptanmış ve suşların %0,5'inde kaspofungine karşı direnç gözlenmiştir. Flukonazolün yüksek oranda etkili olduğu bulunup (%2,3 direnç), eski yıllardaki çalışma ile kıyaslandığında direnç düzeyinin stabil olduğu bildirilmiştir. İtrakonazol ve vorikonazole karşı %1,6 ve %0,9 oranında direnç görülmüş, posakonazolün ve amfoterisin B'nin MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,25 µg/ml ve 0,19 µg/ml olarak tespit edilmiştir (4).

2.5. Kandida Biyofilmlerinde Antifungal Duyarlılık

2.5.1. Kandida Biyofilm Duyarlılığı ve Direnç Mekanizmaları

Biyofilmdeki hücreler dış ortamdan, immün sistem ve antifungal tedaviden korunmaktadır. Yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç biyofilmin en önemli özelliği olarak görülmektedir

(12, 54). Biyofilm direnci multifaktoriyel ve kompleks bir olay olarak gerçekleşmektedir (11).

Biyofilm duyarlılık araştırmaları için çoğunlukla *C. albicans* kullanılmıştır. Çalışmalar *C. albicans* biyofilmlerinin flukonazole karşı yüksek düzeyde dirençli olduğunu (1, 7), hatta planktonik hücrelere nazaran > 1000 kat daha dirençli olabildiğini göstermiştir (12, 54). Aynı zamanda vorikonazol, ravukonazol ve posakonazol gibi yeni azollerin çoğu *C.albicans*'ın planktonik hücrelerine etkili olduğu halde, sesil formlarına yeterli düzeyde inhibisyon yapamamaktadır (11, 13, 14). Azol direncinin bazı genlerin ekspresyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Üç farklı efluks pompası, CDR1, CDR2 ve MDR1, ilaçları mantar hücresinin dışına atmaktan sorumludur. Bunlar özellikle *C.albicans*' ın planktonik hücrelerinde erken biyofilm fazında flukonazol direncinden sorumlu kabul edilirken, orta ve geç biyofilm fazlarında görev almamaktadır (55). Ayrıca bazı *erg* genlerinin ekspresyonu; membran sterol kompozisyonunun değişmesine neden olmakta, özellikle daha sonraki biyofilm oluşum fazlarında ergosterol seviyesinin azalması azol direncinde sebep olarak gösterilmektedir (55).

Ekinokandinlerin, kaspofungin, anidulafungin ve mikafunginin, *C. albicans* biyofilmine karşı in-vitro olarak etkili olduğu görülmektedir (1, 11, 13, 14). Klinik kullanımı için silikonlu tıbbi gereçlerde biyofilm oluşumu ve kontrolünde ekinokandinlerin faydalı olduğu bildirilmektedir (1). Ancak ekinokandinlerin paradoks olarak MİK değerinin üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu tetikleyebilmesi, hem profilaktik uygulanmasını hem de tedavide kullanımını kısıtlayan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (1, 13).

Amfoterisin B'nin standart formülasyonu *C.albicans*'ın planktonik hücrelerine etki ederken biyofilme karşı etkisi azalıp doza bağımlı aktivite göstermektedir (7, 11). Ekstraselüler maddenin antimikrobiyal ajanların penetrasyonunu fiziksel bariyer olarak önlemesinin başta amfoterisin B için önemli bir direnç mekanizması olabileceği tartışılmaktadır (1). Yeni geliştirilmiş lipid formülasyonlarının, lipozomal amfoterisin B ve amfoterisin B lipid kompleks (ABLC), biyofilme daha etkili olduğu görülmüştür (14), ancak etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (1). Amfoterisin B lipozomal formunun kateter kilit tedavisinde *C. albicans* biyofilm eradikasyonunda başarılı olduğu belirtilmiştir (56).

Biyofilmin antifungal direncinde ayrıca üreme hızının ve metabolik aktivite değişimlerinin de etkili faktörler olduğu tartışılmaktadır (1). Bunun dışında *C. albicans* biyofilmlerinde ‘persisten hücreler’ olarak bilinen hücreler bulunup çoklu ilaç direncine neden olan bir sub-popülasyon oluşturmaktadır (57).

2.5.2. Kandida Biyofilmlerinde Duyarlılık Testleri

Planktonik MİK değerleri baz alarak biyofilme bağlı enfeksiyonların tedavileri başarısızlıkla sonlanabilir. Başarılı bir tedavi sürdürmek için biyofilm duyarlılığını ölçen metodlara gereksinim duyulmaktadır. Kandida biyofilm duyarlılığını ölçmek için çeşitli modeller geliştirilmiştir. Ancak laboratuvarlar içil ve laboratuvarlar arası uygulamalarda farklılık göstermeyen standardize yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

XTT Yöntemi

Son zamanlarda kandida türlerinin biyofilm, yoğunluk, üreme ve antifungal duyarlılık çalışmalarında kolorimetrik XTT yöntemi popüler, hatta en sık kullanılan yöntem haline gelmiştir (17). Antifungal etkinlik tespiti için biyofilmdeki yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesi ve böylece yoğunluğu ölçülmektedir. Üreme kontrolüne göre optik dansite (OD) değerinin %50 azalması ‘biyofilm MİK’ olarak tanımlanmıştır (1, 17, 58). Yöntemin 96 kuyucuklu mikropiplaklarda uygulanması ile hızlı, birçok suşun ve antifungal ajanının tek seferde çalışılabilmesi, bu yöntemin verimli ve buna bağlı olarak maliyetinin nispeten düşük olmasını sağlamaktadır. Bu yöntemin, antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu üzerinde yoğun çalışmalar sürmektedir. Farklı protokoller uygulanıp değişik parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Test edilmiş faktörler arasında maya inokulum konsantrasyonu, biyofilm oluşumunun süresi, XTT konsantrasyonu ve inkübasyon şartları yer almaktadır (12, 17, 59 - 61).

Calgary Biyofilm Yöntemi

Bakteriyel biyofilm hücrelerinin antibiyotik duyarlılık taramaları için ‘Calgary Biyofilm Yöntemi’ sıklıkla kullanılmaktadır (62). Bu yöntem ‘Calgary Biofilm Gereç (CBD) sistemi’ olarak ilk olarak 1996’da Ceri ve arkadaşları tarafından Calgary Üniversitesinde geliştirilmiştir (62, 63). Calgary Biyofilm sistemi 96 iğne çıkıntılı kapak ve kanallar içeren bir alt plaktan oluşmaktadır. ‘Rokin table’ üzerinde kanalların içindeki besiyeri sürekli akış altında olup kesme kuvvetinden dolayı tüm iğne çıkıntılarının yüzeyinde aynı oranda biyofilm oluşmaktadır (15, 29). İğne kapağı sonikasyon işlemine alınarak, çıkıntıların

üzerindeki sesil hücreler koparılıp, ekimler ile hücre sayımı yapılabilmekte veya plağı inkübe ederek spektrofotometrik olarak üreme değerlendirilebilmektedir (15, 29, 63). Özellikle ‘Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu’ (MBEK) saptanarak hızlı ve tekrarlanabilen güvenilir sonuçlar vermektedir (15, 62). Ayrıca bu yöntem birçok amaçla kullanılmaktadır: Planktonik ve biyofilm hücrelerin simültan kültürasyonu, biyofilm oluşumunun ve morfolojisinin araştırılması, popülasyonun üreme eğrilerinin araştırılması, biyosit etkinliği aralığının tespiti ve yeni anti-biyofilm maddelerin yüksek sayıda test edilmesi (62).

BioTimer Yöntemi

Biyofilm antifungal duyarlılık çalışmalarında kullanımda olan Bio Timer yöntemi ise Berlutti ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda dayalı olarak Pantanella ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. BioTimer yöntemi, hücre manipulasyonu yapılmaksızın biyofilmde yaşayan bakteri hücrelerinin metabolizmasını ölçerek sesil hücrelerin sayısını dolaylı tespit etmektedir (64, 65). Başlangıç hücre sayısı ise duyarlılık sonuçlarını etkilediği için önemli bir husustur (66). İndikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı sesil hücrelerin metabolizması sonucu belirlenen sürelerde renk değiştirmektedir. Süreyi baz alarak korelasyon grafikleri ile biyofilm içindeki başlangıç mikroorganizma sayısı hesaplanıp inhibisyon oranları belirlenebilmektedir. Korelasyon eğrilerinin belirlenmesinde ise planktonik hücrelerin renk değişiminin süresine karşın eş zamanlı olarak CFU/ml olarak belirlenen hücre sayısı kayıt edilmektedir. Bio Timer yöntemi ayrıca güvenilir, duyarlı ve hızlı sonuç verip kolay uygulanabilen bir yöntemdir (16, 65).

2.6. Kandida Biyofilm Oluşumunun İnhibisyonu

Tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonlar sıklıkla görülmekte ve profilaktik tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (18, 19). Biyofilm oluşumunu inhibe etmek için bazı araştırmalarda tıbbi gereçlerin polimer fizyo-kimyasal yüzey yapısını değiştirerek mikroorganizmaların adezyonunun engellenmesi hedef alınmıştır (29). Örneğin gümüş nanopartikül ile işlenmiş kateterlerin *C. albicans* biyofilm oluşumu üzerinde %84’ün üzerinde antifungal etki oluşturduğu gösterilmiştir (67). Nistatin içeren silikon disklerin ise *C. albicans* biyofilm oluşumunda, statik şatlarda MRD flow sistemine göre daha iyi inhibisyon sağladığı bildirilmiştir (68). Ayrıca amfoterisin B, nistatin ve klorheksidin ile kaplanmış dış materyallerin, *C. albicans* biyofilm oluşumunda sırasıyla %50–60, %70–80 ve %98’e varan düzeylerde inhibisyon sağladığı saptanmıştır (69).

İşlenmiş yüzeyler bir süre sonra in vivo biyofilm oluşumunu kolaylaştıran filmler ile maskelenerek fonksiyonunu kaybedebildiğinden, daha etkin ve özellikle anti-polimikrobiyal ve non-toksik özelliğe sahip olan materyallerin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır (29).

Değişik konsantrasyonlardaki antifungal ajanların kandida biyofilm oluşumu üzerindeki inhibe edici etkisinin araştırılması farklı bir yaklaşım olmaktadır. Bu konuda kandida türlerini kapsayan kısıtlı sayıda yayın mevcuttur. Bir yaklaşım pre-inokulumu antifungal sub-inhibitör konsantrasyonlara bir süre maruz bırakıp, antifungal ajanı uzaklaştırıp ve antifungal yokluğunda hücrelerin biyofilm oluşumu üzerinde etkisini araştırmak olmuştur (14). Başka bir yaklaşım ise *C. albicans* hücrelerini eş zamanlı olarak antifungalın sub-inhibitör konsantrasyonu ile inkübe edip biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini araştırmaktır (18, 70).

Sub-inhibitör konsantrasyonların yarattığı değişikliklerin ve özellikle biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması önemli bir hedef olmakta ve bu konudaki çalışmalar klinisyenin özellikle profilaksi yaklaşımı için önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 30.07.2013 tarihinde onaylanmıştır (Proje no: KA13/150) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

3.1. *Candida albicans* İzolatları

Başkent Üniversitesi Ankara, Adana ve İstanbul hastanelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 162 *Candida albicans* suşu çalışmaya dahil edildi. Hastaların cinsiyet, yaş, yattığı servis gibi demografik bilgileri kayıt edildi. Suşlar çalışılncaya kadar ‘Skim Milk’ besiyeri içeren mikrosantrifüj tüplerinde - 80 °C’de saklandı. *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart suşları kalite kontrol amacıyla ve ayrıca *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşlar çalışmaya dahil edildi.

Tüm suşlar çalışma öncesinde germ tüp oluşumu ve Corn Meal 80 besiyerindeki morfolojilerine göre tiplendirildi. Sabouraud Dekstroza Agardaki (SDA) 24 saatlik taze pasajlarından birkaç koloni 500 µl insan plazması içeren bir tüpte süspanse edilerek 2-3 saat 37°C etüvde inkübe edilip nativ preparat hazırlanarak germ tüp (başlangıç noktasında boğumlama yapmaksızın filament oluşumu) açısından değerlendirildi. Germ tüp pozitif izolatlar Corn Meal Tween 80 Agara pasajlandı (Kutu 3.1.). Çizgi ekim yapılmış alana lamel kapatılarak oda ısısında 72 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda x10 ve x40 objektif ile incelemede psödohiflerin ucunda iri, küre şeklinde klamidospor görülmesi *Candida albicans* suşu olarak tanımlanmasını sağladı.

Kutu 3.1. Corn Meal Tween 80 Agar besiyerinin hazırlanması.

Formül:

- | | |
|--|-------------|
| • Corn Meal Agar (BBL-BD, 211132, Fransa) | 17 g |
| • Tween 80 (Polyoxyethylenesorbitanmonooleate, Sigma, P-4780) | 10 ml (%1) |
| • Steril distile su | 1000 ml |
| • pH | 6,0 +/- 0,2 |

Besiyerinin Hazırlanması:

- ✓ Corn Meal Agar tartıldı.
- ✓ 1 l distile suda çözüldü.
- ✓ 10 ml Tween 80 eklendi (%1).
- ✓ İçeriği homojenize edilip ısıtıcı manyetik karıştırıcıda eritildi.
- ✓ Besiyerinin tamamen çözülmesi için 1 dakika kaynatıldı.
- ✓ pH 6,0 +/- 0,2 ayarlandı.
- ✓ 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve steril netri nlaklara döküldü.

3.2. Biyofilm Oluşumu

Yüzatmışiki *C. albicans* klinik izolat, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları ‘Modifiye Christensen 96 Kuyucuklu Plak Yöntemi (MCY)’ ile biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşturma derecesi açısından test edildi. Bu yöntem ile toplam 32 suşun, randomize seçilen 30 yoğun biyofilm yapan suş ve iki standart suş, iğne kapaklı mikropaklarda biyofilm yapma yeteneği ayrıca XTT Yöntemi ile araştırıldı.

3.2.1. Modifiye Christensen 96 Kuyucuklu Plak Yöntemi (MCY) ile Biyofilm Ölçümü

Otuziki suşlar SDA besiyerindeki 24 saatlik taze pasajlarından Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco) sıvı besiyerine alındı (Kutu 3.2.). Falkon tüplerdeki bu süspansiyonlar bir gece 37°C’de orbital çalkalayıcı’da (Roto MIX 50800, Barnstead Int.,ABD) düşük hızda inkübe edilerek maya hücreleri tomurcuklanma fazına ulaştırıldı.

Kutu 3.2. YNB besiyerinin hazırlanması

Formül:

• YNB base (Difco, BD, 239210)	3,35 g
• D-(+)-Glucosemonohydrate (Merck, 1.08342)	2,5 g
• Steril distile su	500 ml
• pH	5,4+/-0,2

Besiyerinin Hazırlaması:

- ✓ YNB base ve D-(+)-Glucose tartıldı.
- ✓ 50 ml distile suda çözüldü (hafif ısıtarak).
- ✓ Membran filtreden (0,22 µm por çapı, Sartorius stedim, Almanya) geçirildi.
- ✓ 450 ml steril distile su eklendi.
- ✓ Kullanıma hazır besiyeri 2-8°C’de kullanıma kadar saklandı.

Daha sonra vortekslenen tüpler 5 dakika 5000 g’de santrifüj edildi. Elde edilen pelet tekrar steril fosfat tamponlu su (PBS, pH 7,4; Sigma, P4417, Almanya) ile çözülüp aynı şekilde santrifüj edildi. Bu şekilde iki kere yıkanan maya hücreleri spektrofotometre (Phoenix Spec, BD, 440919, ABD/İrlanda) kullanılarak YNB sıvı besiyeri ile $1-3 \times 10^7$ CFU/ml standart bulanıklığına ayarlandı (45, 71).

Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropaklara (Costar 3599, ABD) hazırlanan maya süspansiyonlarından her suş için 3 kuyucuğa olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. Plaklar 24 saat 37°C’de statik şartlarda inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlandı.

Biyofilm oluşumunun gösterilmesi

İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra plaklar 250 µl PBS (pH 7,4) ile üç kez yıkandı. Her kuyucuğa 150 µl metanol (Merck, 1.06008) aktarılıp, 10 dakika süre ile oluşmuş biyofilm sabitlendi. Metanol dökülüp kurutulan plaklar, tam kuruması için 40°C etüvde 15 dakika bekletildi. Ardından her kuyucuğa 100 µl %1'lik kristal viyole (Merck, Cİ42555) aktarılıp 20 dakika süre ile boyandı (37).

Musluk suyu ile üç kez yıkayıp kurumaya bırakıldıktan sonra, 150 µl %20'lik aseton-etanol (Tekkim, Türkiye; Alkokim, Pakistan) her kuyucuğa dağıtıldı. Biyofilm yoğunluğunu ölçmek için ELx800 (Bio-Tek Instruments INC, ABD) mikropalak okuyuculu spektrofotometre kullanıldı ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik OD değerleri belirlendi. Her suş üçer kuyucukta, negatif kontroller (blank) ise en az altı kuyucukta çalışıldı. Tüm deneyler en az iki kere tekrarlandı.

Biyofilm oluşumunun kantitatif değerlendirilmesi

Suşların biyofilm oluşumunun kantitatif değerlendirilmesi için yoğunluk kategorileri belirlendi. Bunun için öncelikle cut-off değeri (OD_c) hesaplandı.

Negatif kontrollerin ortalama değeri (ortalama OD_{nc}) ve negatif kontrollerin üç standart sapmasının ($3 \times SD_{nc}$) toplamı cut-off değerini (OD_c) belirlemektedir:

$$OD_c = OD_{nc} \text{ ortalaması} + 3 \times SD_{nc}$$

Cut- off değerine göre dört biyofilm yoğunluk kategorisi belirlendi:

$$OD \leq OD_c = \text{biyofilm negatif}$$

$$OD_c \leq OD < 2 \times OD_c = \text{zayıf düzede biyofilm pozitif}$$

$$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c = \text{orta düzede biyofilm pozitif}$$

$$4 \times OD_c \leq OD = \text{yoğun düzeyde biyofilm pozitif}$$

Her suş için ortalama OD değeri hesaplanıp kategorilere göre biyofilm yoğunluk dereceleri belirlendi (41, 42). Planktonik ve sesil hücrelerin antifungal duyarlılık ve biyofilm inhibisyon deneyleri için MCY ile yoğun düzeyde biyofilm yapan suşlardan randomize 30 suş seçildi. *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları testlere dahil edildi. Toplan 32 suşun biyofilm oluşumu hem MCY ile tekrar kontrol edilip hem de iğne kapaklı plaklarda biyofilm oluşumu XTT yöntemi uygulanarak araştırıldı.

3.2.2. İğne Kapaklı Plaklarda Biyofilm Ölçümü

MCY ile seçilen 30 yoğun derecede biyofilm yapan suşun ve daha önce belirtilen iki *C. albicans* standart suşun, toplam 32 suşun 'Modifiye Calgary Biyofilm Yöntemine' (MCBY) göre biyofilmleri oluşturuldu. İğne kapaklı 96 kuyucuklu U tabanlı polistiren mikropaklarda (Nunc, Danimarka) biyofilm oluşturma yeteneği XTT yöntemi ile araştırıldı.

Maya süspansiyonların hazırlamasında, 50 mM glukozlu YNB besiyeri (Kutu 3.3.) ve 100 mM sükrozlu YNB sıvı besiyeri hazırlandı (Kutu 3.4.).

Kutu 3.3. 50 mM glukozlu YNB besiyerinin hazırlanması.

Formül:

- | | |
|---|--------|
| • YNB base (Difco, BD, 239210) | 3,35 g |
| • D-(+)-Glucosemonohydrate (Merck, 1.08342) | 4,95 g |
| • Steril distile su | 500 ml |

Besiyerinin hazırlaması:

- ✓ YNB base ve D-(+)-Glucose tartıldı.
- ✓ 50 ml distile suda çözüldü (hafif ısıtarak)
- ✓ Membran filtreden (0,22 µm por çapı, Sartorius stedim, Almanya) geçirildi.
- ✓ 450 ml steril distile su eklendi.
- ✓ Kullanıma hazır besiyeri 2-8°C'de kullanıma kadar saklandı.

Kutu 3.4. 100 mM sükrözü YNB besiyerinin hazırlanması.

Formül:

• YNB base (Difco, BD, 239210)	3,35 g
• D-(+)-Glucose monohydrate (Merck, 1.08342)	2.5 g
• Sucrose (Merck,1.07651)	17,12 g
• Steril distile su	500 ml

Besiyerinin hazırlaması:

- ✓ Sükröz tartıldı ve 450 ml distile suda çözüldü.
- ✓ 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.
- ✓ YNB base ve D-(+)-Glucose monohydrate tartıldı.
- ✓ 50 ml distile suda çözüldü (hafif ısıtarak)
- ✓ Membran filtreden (0,22 µm por çapı, Sartorius stedim, Almanya) geçirildi.
- ✓ 450 ml sükrözü distile su eklendi.
- ✓ Kullanıma hazır besiyeri 2-8°C'de kullanıma kadar saklandı.

Seçilen 32 *C. albicans* suşunun SDA besiyerindeki 24 saatlik taze pasajlarından 50 mM glukozlu YNB besiyerine alındı. Maya hücreleri bir gece 37°C'de orbital çalkalayıcıda düşük hızda inkübe edilerek tomurcuklanma fazına ulaştırıldı. Vorteksledikten sonra 5000g'de santrifuj edilip PBS ile yıkandı. Bu aşama tekrarlanıp 100 mM sükrözü YNB besiyerinde $1-3 \times 10^7$ CFU/ml olacak şekilde Phoenix Spec (BD, Fransa) yardımı ile spektrofotometrik olarak ayarlandı.

Biyofilm oluşturmak için steril Thermo-Nunc markalı iğne kapaklı (TSP-screening, Cat. No 445497, Danimarka) 96 kuyucuklu U-tabanlı mikrolaklar (Cat. No 262162) kullanıldı. Hazırlanan maya süspansiyonundan 200 µl üzer kuyucuğa dağıtılıp iğne çıkıntılı kapak üzerine kapatılıp 37°C'de 48 saat orbital çalkalayıcıda düşük hızda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra iğne kapak iki ayrı 200 µl fosfat tamponlu su (PBS, pH 7,4) içeren 96 kuyucuklu mikrolakta 1-2 dakika hafif çalkalanarak yıkanıp tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı.

Ayrı bir 96 kuyucuklu mikrolakta 300 mg /L XTT (Applichem, Almanya) ve 0.13 mM menadion (Sigma) son kuyucuk konsantrasyonu olacak şekilde dağıtıldı (72). Hazırlanan XTT-Menadion-PBS solüsyonundan 200 µl her kuyucuğa eklenip üzerine oluşturduğumuz biyofilmli iğne kapak yerleştirildi. İki saat 37°C'de statik şartlarda karanlıkta inkübe edildi. İğne kapağı kaldırılıp ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc, ABD) mikrolak okuyuculu

spektrofotometre kullanılarak 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapıldı ve ayrıca çıplak göz ile renk değişimi kayıt edildi.

3.3. Antifungal Duyarlılık Testleri

3.3.1. Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Testi

Toplam 32 suşun, 30 yoğun biyofilm yapan suş ve *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları, planktonik hücrelerin antifungal duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI'nın M27-A3 kriterlerine uygun olarak in vitro şartlarda yapıldı (73). Antifungal ajanlar olarak kaspofungin (Merck), mikafungin (Astellas), anidulafungin (Pfizer), flukonazol (Sigma, F8929), voriconazol (Sigma, PZ0005), posakonazol (Merck), itrakonazol (Sigma, I6657) ve amfoterisin B (Sigma, A9528) çalışıldı. *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 kalite kontrol amacıyla her teste dahil edildi (73).

Duyarlılık çalışması için morfolinpropanasulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış L-glutamin içerikli RPMI 1640 besiyeri hazırlandı (Kutu 3.5.).

Kutu 3.5. MOPS tamponlanmış RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması.

Formül:

• RPMI 1640 tozu (Sigma,R6504)	10,4 g
• MOPS buffer (0,165 M morfolinpropanasulfonik asit) (Applchem, Almanya, A2947)	34,5 g
• Steril distile su	1000 ml
• pH	7,0 +/-0,1

Besiyerinin hazırlaması:

- ✓ RPMI tartıldı ve 900 ml distile suda çözöldü.
- ✓ MOPS buffer tartılıp eklendi.
- ✓ Karışımın pH'sı 7,0 olarak ayarlandı.
- ✓ Toplam hacim steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- ✓ 0,22 çaplı membran filtreden (Sartorius stedim, Almanya) süzerek steril edildi.
- ✓ Kullanıma hazır besiyeri 2-8°C'de kullanıma kadar saklandı.

Antifungal stok solüsyonların hazırlanmasında antifungallerin standart toz formları kullanıldı. Stok solüsyonlar Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, D8418)'da hazırlanıp testler yapılancaya kadar – 86 °C'de saklandı.

Standart protokole uygun şekilde 96 kuyucuklu U tabanlı steril mikropiplaklarda (Citotest, Çin) MOPS ile tamponlanmış RPMI besiyerinde antifungal stok solüsyonlar sulandırıldı. Solüsyonlar 100'er µl olarak dağıtıldı. Antifungal ajanların çift kat seri dilüsyonları yapıldı. Çalışılan konsantrasyon aralığı Tablo 3.1'de belirtildi. Her sırada son kuyucuk üreme kontrolü olarak bırakıldı.

Tablo 3.1. Planktonik hücrelerin duyarlılığında kullanılan antifungal ajanların konsantrasyonları

Antifungal ajan	Konsantrasyon aralığı (µg/ml)
Kaspofungin	0,008-8
Mikafungin	0,008-8
Anidulafungin	0,008-8
Flukonazol	0,125-128
Voriconazol	0,015-16
Posakonazol	0,015-16
İtrakonazol	0,015-16
Amfoterisin B	0,015-16

Saklamadan canlandırılan suşlar iki kere SDA'ya pasajlandıktan sonra serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland standart bulanıklığına Phoenix Spec (BD, Fransa) yardımı ile spektrofotometrik olarak ayarlandı. Antifungal içeren plakların tüm kuyucuklarına 100'er µl maya süspansiyonu dağıtıldı.

Plakların 37 °C'de inkübasyonu sonrasında sonuçlar CLSI'nin M27-A3 kriterlerine uygun şekilde görsel olarak değerlendirildi (73). Amfoterisin B için 24 saat inkübasyon sonunda üremenin olmadığı konsantrasyonlar 'Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu' (MİK) olarak kabul edildi. Ekinokandinler ve flukonazol 24 saat, diğer azoller 48 saat inkübasyon süresinin sonunda değerlendirildi. Üreme kontrollerine göre üremeyi belirgin azaltan konsantrasyon ($\geq$ 50 azalma) MİK değeri olarak kabul edildi. CLSI standartlarında belirtilen referans değerlerine göre suşların duyarlılık durumu ajana bağlı olarak Tablo 3.2.'ye göre belirlendi.

Tablo 3.2. Antifungal ajanların duyarlılık aralıkları (CLSI M27-A3 (S4)'e göre)

Antifungal ajan	Duyarlı	Dirençli
kaspofungin	$\leq 0,25$	$> 0,5$
mikafungin	$\leq 0,25$	$> 0,5$
anidulafungin	$\leq 0,25$	$> 0,5$
vorikonazol	$\leq 0,125$	$> 0,5$
itrakonazol	$\leq 0,125$	$> 0,5$
flukonazol	≤ 2	> 4
posakonazol	Referans değeri yok	
amfoterisin B	≤ 1	> 1

3.3.2. Sesil Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Testi

Otuz yoğun biyofilm yapan suşun, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşlarının sesil formlarının antifungal duyarlılıkları testi MCBY kullanılarak yapıldı. Tüm antifungal ajanlar çalışıldı. Duyarlılık çalışması öncesinde 3.2.2. bölümünde tarif edildiği gibi iğne kapaklı plaklarda biyofilm oluşturuldu. Maya süspansiyonunun ve besiyerlerinin hazırlanışı ile inkübasyon şartları aynı şekilde uygulandı.

Duyarlılık çalışması için 100 mM sükrözlu YNB besiyeri hazırlandı. Antifungal ajanların standart toz formları stok solüsyonların hazırlamasında kullanıldı. Tüm stok solüsyonlar DMSO'da hazırlandı ve testler yapılancaya kadar $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Biyofilm duyarlılık çalışması için 100 mM sükrözlu YNB besiyerinde antifungal stok solüsyonlar sulandırıldı. İlk sütuna 100'er μl dağıtıldı. Antifungal ajanların iki kat seri dilüsyonları yapıldı. Tüm kuyucuklara 200'er μl hacme ulaşmak için 100'er μl 100 mM sükrözlu YNB besiyeri eklendi. Çalışılan konsantrasyon aralığı Tablo 3.3.'de belirtildiği şekilde ayarlandı. Her sıradaki 11. kuyucuk sterilite kontrol ve 12. kuyucuk üreme kontrol olarak bırakıldı.

Tablo 3.3. Sesil hücrelerin duyarlılığında kullanılan antifungal ajanların konsantrasyonları.

Antifungal ajan	Konsantrasyon aralığı (µg/ml)
Kaspofungin	0,06-32
Mikafungin	0,06-32
Anidulafungin	0,06-32
Flukonazol	4-2048
Voriconazol	1-512
Posakonazol	0,5-256
İtrakonazol	0,25-128
Amfoterisin B	0,25-128

İğne kapak iki ayrı 200 µl PBS içeren mikropakta 1-2 dakika hafif çalkalanarak yıkanıp, antifungal içeren 96 kuyucuklu mikropolağa yerleştirildi ve 37 °C’de 24 saat statik şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda iğne kapak tekrar iki kez PBS ile yıkanıp 200 µl taze sükrözlu YNB besiyeri içeren mikropolağa aktarıldı. Beş dakika yüksek şiddette (Ultrasonic Cleaner, Daihan Scientific Co., Kore) sonikasyon işlemine alındı. Böylece iğne çıkıntısının üzerinde oluşan sesil hücreler koparak sıvıya geçmiş oldu. İğne kapak uzaklaştırılıp steril polistiren plak üstü şeffaflar (Thermo-Nunc, Danimarka, NC-236366) ile plağın üzeri kapatıldı. Plak 37 °C’de 24 saat statik şartlarda inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonunda sonuçlar görsel ve ELx800 (Bio-Tek Instruments Inc, ABD) mikropak okuyuculu spektrofotometre kullanılarak 630 nm dalga boyunda spektrofotometrik değerlendirildi. Amfoterisin B için üremenin olmadığı konsantrasyonlar ‘Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyon’ (MBİK) değeri olarak kabul edildi. Ekinokandinler ve azoller için üreme kontrollerine göre üremeyi belirgin azaltan ($\geq 50\%$) konsantrasyon MBİK değeri olarak kabul edildi. Otuz suşun, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşlarının planktonik formlarının MİK değerleri ve sesil formlarının MBİK değerleri birbiriyle kıyaslanıp sesil hücrelerin duyarlılık artışı hesaplandı.

3.4.Biyofilm İnhibisyon Deneyi

Antifungal ajanların kandida hücrelerinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Otuz yoğun biyofilm yapan suş, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları iğne kapaklı plaklar kullanılarak test edildi. Tüm antifungal ajanlar çalışıldı. Maya inokulumu ve antifungal ajan aynı anda plaklara dağıtılıp inkübe edildi.

Antifungal ajanların standart toz formları stok solüsyonların hazırlanmasında kullanıldı. Tüm stok solüsyonlar DMSO'da hazırlanıp testler yapılabileceği kadar – 86 °C'de saklandı. Her bir suş için antifungal stok solüsyonu ayrı ayrı hazırlandı. Bunun için CLSI referans yöntemi ile tespit edilen MİK değerinin 4 katı ilk kuyucuk konsantrasyonu olarak belirlendi.

Antifungal stok solüsyonlar ilk kuyucuk konsantrasyonuna ulaşılacak şekilde 100 mM sükrözlü YNB besiyerinde sulandırılıp birinci kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. Antifungal ajanların çift kat seri dilüsyonları yapıldı. Her sıradaki 11. kuyucuk sterilit kontrol ve 12. kuyucuk üreme kontrol olarak bırakıldı.

Maya süspansiyonların hazırlanmasında, 50 mM glukozlu YNB besiyeri (Kutu 3.3.) ve 100 mM sükrözlü YNB sıvı besiyeri hazırlandı (Kutu 3.4.).

Maya süspansiyonu için pre-inokulum hazırlanışı, yıkama işlemleri ve standart bulanıklığın ayarlanması bölüm 3.2.2. tariflendiği gibi yapıldı. Hücre yoğunluğu 10^7 CFU/ml olan maya süspansiyonundan 100'er µl tüm kuyucuklara dağıtıldı.

İğne kapaklar mikropiğin üzerine yerleştirilip 37 °C'de 48 saat akış şartları altında orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda iğne kapak 2 kez PBS ile yıkayıp 200 µl taze sükrözlü YNB besiyeri içeren mikropiğe aktarıldı. Yüksek şiddet ayarında 5 dakika sonikasyon işlemine alındı. Kuyucuklardan dilüsyonlar yapıldı ve SDA'ya spot ekimler yapıp 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Ayrıca iğne kapak uzaklaştırıldı ve plak üstü şeffaflarla piğin üzeri kapatılıp 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Sonuçlar görsel ve ELx800 mikropalak okuyuculu spektrofotometre (Bio-Tek Instruments Inc, ABD) kullanılarak spektrofotometrik olarak 630 nm dalga boyunda değerlendirildi. Spot ekimlerde üreyen kolonilerin CFU/ml değerleri hesaplandı. Ajana bağlı her bir suş için üremeyi tamamen inhibe eden konsantrasyon ‘Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu’ (BİK) olarak belirlendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Veri seti SPSS programı (SPSS version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Grup ortanca değerlerinin karşılaştırılması amacıyla Friedman testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma, ortanca değer, çeyrekler arası değişim ve geometrik ortalama olarak ifade edilmiştir. Oranların karşılaştırılması amacıyla iki oran z testi kullanılmıştır. Sonuçlar n ve % olarak ifade edilmiştir. Antifungal ajanlar arası ilişkilerin yönü ve derecesi Spearman rho korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir. $p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

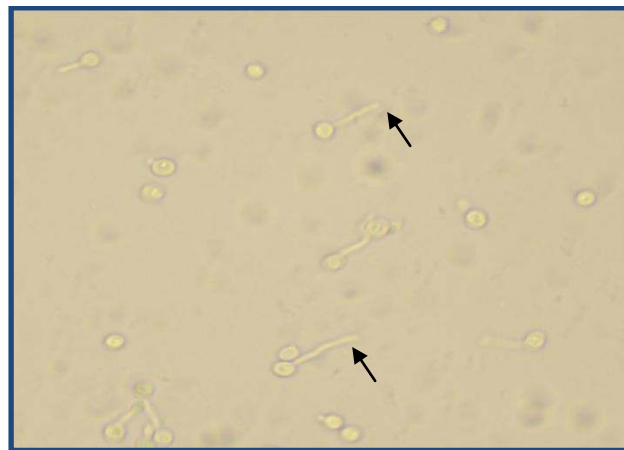
4.1. *Candida albicans* İzolatları

Başkent Üniversitesi Ankara, Adana ve İstanbul hastanesinin çeşitli ünitelerinde yatan kandidemili hastaların kan kültürlerinden toplam 162 *Candida albicans* suşu izole edildi. Seksen beşi kadın ve 77'si erkek olmak üzere toplam 162 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı 43,9 (0-94) idi. Tedavi gördükleri kliniklere göre hastaların dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. *C. albicans* süreyen hastaların kliniklere göre dağılımı

Klinik	Suş (n)
Dahiliye	45
Cerrahi	32
Pediyatri	41
Yoğun Bakım	37
Acil	7
Toplam	162

Aynı hastada bir aydan kısa sürede *Candida albicans* üremesi saptanmışsa izolat çalışmaya dahil edilmemiştir. Tüm suşların germ tüp (Şekil 4.1.) ve klamidospore (Şekil 4.2.) oluşturduğu tespit edildi.



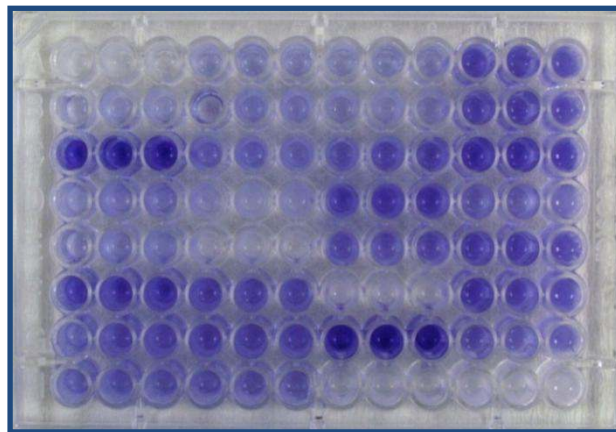
Şekil 4.1. *Candida albicans*; germ tüp oluşumunun mikroskopik görünümü; 40x objektif



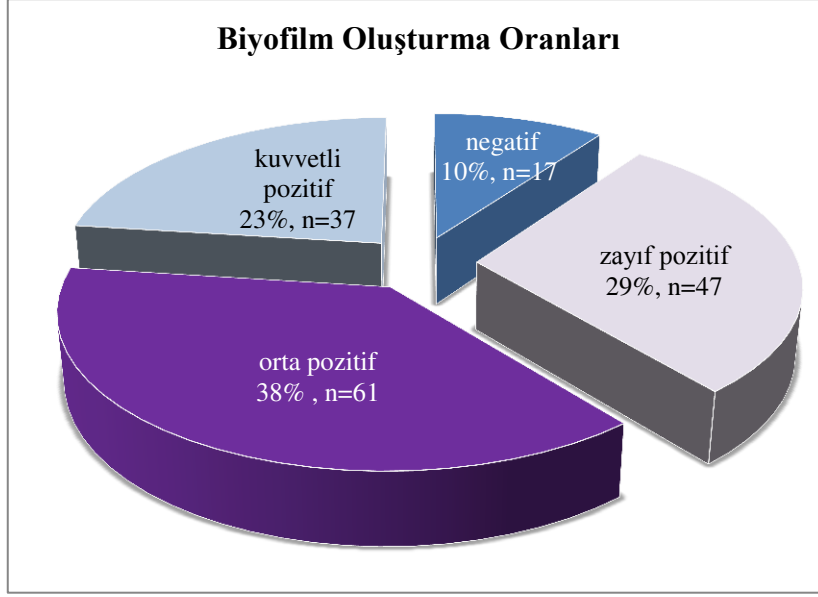
Şekil 4.2. Corn Meal Tween 80 Agar besiyerinde 72 saat sonunda *C.albicans*'ın oluşturduğu klamidosporların mikroskopik görünümü; 40x objektif

4.2. Biyofilm Oluşumu

Üçlü gruplar halinde MCY ile test edilen *Candida albicans* suşlarının biyofilm oluşumu Şekil 4.3.'de, biyofilm oluşturma oranları ise Şekil 4.4.'de görülmektedir. Çalışmaya dahil edilen 162 suşun % 38 (n=61,) orta düzeyde biyofilm oluşturdu. Tüm suşların 47'si zayıf düzeyde (%29) ve 37'si yoğun düzeyde (%23) biyofilm saptanırken, suşların 17'si (%10) biyofilm oluşturmadi (Şekil 4.4.). Çalışmaya dahil edilen standart suşlarından *C. albicans* ATCC 10231' in yoğun düzeyde, *C. albicans* ATCC 90028' in ise zayıf düzeyde biyofilm yaptığı tespit edildi.



Şekil 4.3. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikrolaplarda oluşturulan 24 saatlik biyofilmlerin kristal viyole ile boyanmasının makroskopik görünümü. Her suş üçer kuyucukta çalışıldı. Sol üst ve sağ alt köşe negatif kontroldür.



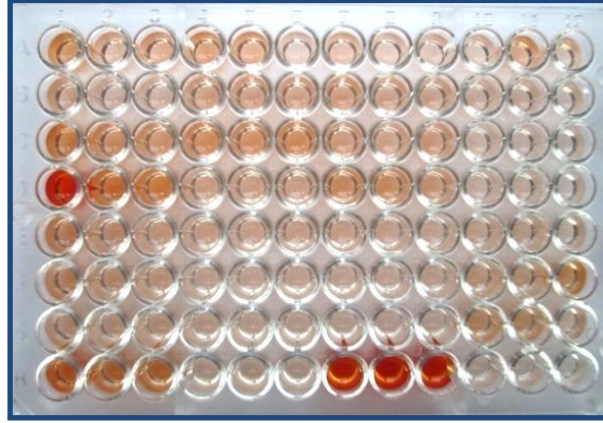
şekil 4.4. *C. albicans* suşlarında biyofilm oluşturma oranları

MCY ile belirlenen 37 yuşsek dzuşeyde biyofilm yapan suşdan 30 suş randomize seşilip, *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşlar şalışmaya dahil edilerek toplam 32 suşun iğne kapaklı mikroplaklarda biyofilm oluşturma yeteneği araştırıldı (şekil 4.5.).



şekil 4.5. İğne kapaklarda biyofilm oluşumu. İğne uçlarında 48 saatlik inkubasyon sonrası makroskopik olarak kolonilerin gduşnümü. Sağdan ikinci sıra negatif kontrolduş (blank).

Kolorimetrik XTT yuşntemi ile sesil huşrelerin metabolik aktivitesini gduştererek iğne uçlarındaki biyofilm oluşumu tespit edildi (şekil 4.6.). Otuziki suşun iğne kapaklı mikroplaklarda da biyofilm yaptığı hem gduşz hem de spektrofotometrik olarak gduşzlendi.



Şekil 4.6. Biyofilm oluşmuş iğne kapaklarda XTT'nin uygulanması sonrası 96 kuyucuklu plaktaki renk değişiminin görünümü. Her suş üçer kuyucukta çalışıldı. Sağ alt köşe negatif kontroldür.

4.3. Antifungal Duyarlılık Sonuçları

4.3.1. Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Antifungal duyarlılık testleri ekinokandinler, amfoterisin B, flukonazol için 24 saatlik ve diğer azoller için 48 saatlik inkübasyonun sonunda değerlendirildi. Gözle görülebilir belirgin azalmanın olduğu kuyucuk MİK değeri olarak alındı. Amfoterisin B için ise üreme olmayan kuyucuk MİK değeri olarak kabul edildi. Suşların MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralık değerleri her bir antifungal için ayrı ayrı hesaplandı (Tablo 4.2.).

Tüm deneylere eklenen *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 kalite kontrol suşlarının MİK değerleri standart CLSI kriterlerinin belirtilen sınırları içinde bulundu.

Otuz suşun, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* ATCC 90028 suşun MİK değerleri CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (Tablo 3.2). Bu değerlendirme sonucunda tüm suşlar ekinokandinlere, amfoterisin B'ye ve azollere karşı duyarlı bulundu. İtrakonazol için ise 30 suşun 25'i (83,3%) ve *C. albicans* ATCC 90028 suşu duyarlıyken, beş suş (%16,7) ve *C. albicans* ATCC 10231 suşu doza bağlı duyarlı olarak tespit edildi.

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi tüm ekinokandinlerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri birbirine benzer bulundu. MİK₅₀ hepsinde $\leq 0,008$ µg/ml iken, MİK₉₀ kaspofungin ve anidulafungin için $\leq 0,008$ µg/ml olarak, mikafungin için bir dilüsyon fark ile 0,015 µg/ml olarak tespit edildi.

Amfoterisin B'nin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 0,5 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu. Azollerde vorikonazol ve posakonazol için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90} \leq 0,015 \mu\text{g/ml}$ olarak aynı değeri verdi. İtrakonazol ve flukonazolün $MİK_{50}$ değerleri sırasıyla 0,06 $\mu\text{g/ml}$ ve $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$, $MİK_{90}$ değeri ise ikisi için 0,25 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi.

Tablo 4.2. Planktonik ($MİK$) ve sesil hücrelerin ($MBİK$) antifungal duyarlılık sonuçları ($\mu\text{g/ml}$)

	Kaspofungin		Mikafungin		Anidulafungin		Amphoteresin B	
	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$
$MİK_{50}$	$\leq 0,008$	2	$\leq 0,008$	4	$\leq 0,008$	2	0,5	8
$MİK_{90}$	$\leq 0,008$	8	0,015	8	$\leq 0,008$	4	0,5	16
$MİK$ aralığı	$\leq 0,008 - 0,03$	0,125 - 16	$\leq 0,008 - 0,03$	$\leq 0,06 - 32$	$\leq 0,008 - 0,03$	0,125 - 4	0,25 - 1	4 - 128

	Vorikonazol		İtrakonazol		Posakonazol		Flukonazol	
	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$	$MİK$	$MBİK$
$MİK_{50}$	$\leq 0,015$	>512	0,06	8	$\leq 0,015$	32	$\leq 0,125$	>2048
$MİK_{90}$	$\leq 0,015$	>512	0,25	64	$\leq 0,015$	256	0,25	>2048
$MİK$ aralığı	$\leq 0,015 - 0,03$	32 - >512	0,03 - 0,25	1- >128	$\leq 0,015 - 0,25$	0,5- >256	$\leq 0,125 - 0,25$	2048 - >2048

4.3.2. Sesil Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Otuz suşun, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* ATCC 90028 suşlarının $MBİK$ ‘Minimal Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyon’ ($MBİK$) değerleri görsel ve spektrofotometrik olarak belirlendi. Amfoterisin B için üremenin olmadığı kuyucuktaki konsantrasyon, ekinokandinler ve azoller için ise üreme kontrollerine göre üremenin belirgin olarak azaldığı konsantrasyon $MBİK$ değeri olarak kabul edildi. Suşların $MBİK_{50}$, $MBİK_{90}$ değerleri ve $MBİK$ aralığı Tablo 4.2’de verilmiştir.

Ekinokandinlerin $MBİK_{50}$ (kaspofungin ve anidulafungin 2 $\mu\text{g/ml}$, mikafungin 4 $\mu\text{g/ml}$) ve $MBİK_{90}$ (anidulafungin 4 $\mu\text{g/ml}$, kaspofungin ve mikafungin 8 $\mu\text{g/ml}$) değerleri grup içinde bir dilüsyon fark ile birbiriyle yakın şekilde bulundu.

Amfoterisin B’nin $MBİK_{50}$ 8 $\mu\text{g/ml}$ ve $MBİK_{90}$ 16 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi.

Azoller içinde itrakonazol en düşük $MBİK_{50}$ ve $MBİK_{90}$ (8 $\mu\text{g/ml}$ ve 64 $\mu\text{g/ml}$) değerleri sergiledi. İkinci sırada posakonazolün $MBİK_{50}$ ve $MBİK_{90}$ değerleri sırasıyla 32 $\mu\text{g/ml}$ ve 256 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu. Vorikonazolün $MBİK_{50}$ ve $MBİK_{90}$ değerleri >512 $\mu\text{g/ml}$ ve flukonazolünki ise >2048 $\mu\text{g/ml}$ olarak gözlemlendi.

4.3.3. Planktonik ve Sesil Hücrelerde Antifungal Duyarlılık Test Sonuçlarının Karşılaştırılması (MBİK/MİK Oranı)

Otuz suşun ve iki *C. albicans* standart suşlarının MBİK/MİK değerleri arasındaki oranları belirlendi. MBİK/MİK oranının ortalama, ortanca, standart sapma değeri, artış aralığı ve çeyrekler arası değişim Tablo 4.3. verildi.

Otuziki suşunda antifungallerin MBİK değerleri MİK değerlerinin üzerinde bulundu (Tablo 4.2.). Antifungallerin 32 suşdaki MBİK/MİK oranları Tablo 4.3.'de gösterildi.

MBİK/MİK oranlarının ortanca değerlerini birbiriyle kıyasladığımız zaman amfoterisin B için diğer antifungallere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) en düşük MBİK/MİK oranı (16) görüldü.

İkinci sırada itrakonazol için MBİK/MİK oranı 64 olarak izlendi. Anidulafungin ile itrakonazol ve ayrıca kaspofungin arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Mikafunginde ise MBİK/MİK oranı 384 ile daha önce belirtien antifungallere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı ($p<0,05$).

Azoller içinde posakonazolün MBİK/MİK oranı flukonazol ve vorikonazole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) daha düşük değerde (1536) bulundu. Vorikonazolün ve flukonazolün MBİK/MİK oranı ise >32768 ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) en yüksek değerde görüldü.

Sonuç olarak amfoterisin B en düşük MBİK/MİK oranına sahip olarak biyofilm hücrelerine en etkiliyken, takiben itrakonazol, anidulafungin ve kaspofungin, ardından mikafungin etkin olarak bulundu. Vorikonazol ve flukonazol ise aynı oranda en yüksek oran ile sesil hücrelere en az etkiliyken, posakonazol daha düşük MBİK/MİK oranına sahip olarak daha etkili bulundu.

Tablo 4.3. Sesil ve planktonik hücrelerin MİK değerlerinin (MBİK / MİK) oranlanması

	Kaspofungin	Mikafungin	Anidulafungin	Amphoteresin B
Ortalama	339,75	492,25	188	24,25
Ortanca	256	384	128	16
St.sapma	417,2932	701,49403	152,60322	43,36715
Minimum	8	8	16	8
Maksimum	2048	4096	512	256
Çeyrekler arası değişim (Interquartile range, IQR)	480	256	192	0
Geometrik ortalama	148,9568	273,1879	125,2572	16,7084

	Vorikonazol	İtrakonazol	Posakonazol	Flukonazol
Ortalama	38016	419,25	4745	26368
Ortanca	32768	64	1536	32768
St.sapma	21065,79006	998,40773	9376,42182	8511,94567
Minimum	2048	8	32	8192
Maksimum	65536	4096	32768	32768
Çeyrekler arası değişim (Interquartile range, IQR)	32768	224	3072	16384
Geometrik ortalama	29404,5135	92,4916	1327,9637	24726,1500

Tablo 4.4. MBİK/MİK oranın suşlardaki dağılımını göstermektedir. Kaspofungin, mikafungin, itrakonazol ve amfoterisin B en düşük düzeyde minimum MBİK/MİK (8) oranına sahipti. Vorikonazol için 25 suшта, flukonazol için ise 20 suшта MBİK/MİK oranı ≥ 32768 (maksimum düzeyde) olarak bulundu. MBİK/MİK oranının esas dağılımı Amfoterisin B için 24 suшта 16 iken, mikafungin için 24 suшта ile 256- 512 değerinde görüldü.

Tablo 4.4. Otuz *C. albicans* klinik izolat ve iki standart suşdaki antifungal ajanların MBİK/MİK oranlarının dağılımı

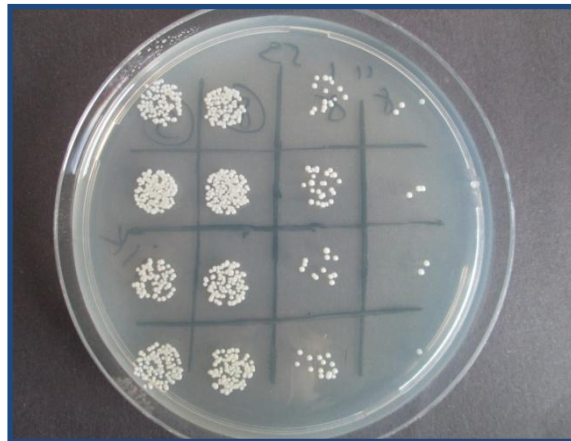
Katsayı	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	≥ 32768
Kaspofungin	1	3	6	2	2	6	9	2	1	0	0	0	0
Mikafungin	1	2	1	1	0	11	13	2	0	1	0	0	0
Anidulafungin	0	2	5	3	8	10	4	0	0	0	0	0	0
Amfoterisin B	5	24	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Vorikonazol	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	3	25
İtrakonazol	3	3	5	8	3	4	2	2	2	0	0	0	0
Posakonazol	0	0	1	0	2	4	4	5	8	3	2	3	3
Flukonazol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	20

Antifungallerin MBİK/MİK oranının korelasyonunu incelediğimizde kaspofunginin, mikafungin (Spearman $\rho=0,572$, $p<0,001$) ve ayrıca anidulafungin (Spearman $\rho=0,414$, $p<0,05$) ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde korelasyon gösterip 32 suş üzerinde benzer etkili olduğu bulundu. Posakonazol ise vorikonazol (Spearman $\rho=0,402$, $p<0,05$) ve ayrıca itrakonazol (Spearman $\rho=0,684$, $p<0,001$) ile yüksek düzeyde korelasyon gösterdi. Amfoterisin B ve flukonazolün ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğer antifungaller ile korele olmadığı tespit edildi. Sonuç olarak antifungaller kendi grupları içinde suşlar üzerinde etki benzerliği gösterirken, gruplar (ekinokandinler, azoller ve amfoterisin B) arasında etki korelasyonu bulunamadı.

4.4. Biyofilm İnhibisyon Deneyinin Sonuçları

Tüm antifungal ajanların biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin araştırılması için otuz yoğun biyofilm yapan klinik izolat ile *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşları test edildi.

Sonuçlar mikropakta görsel ve spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Ayrıca kuyucukların dilüsyonlarından yapılan spot ekimlerde üreyen koloni sayılarının CFU/ml değerleri hesaplandı (Şekil 4.7.). Ajana bağlı her bir suş için hem ekimde hem de kuyucukta üremeyi tamamen inhibe eden konsantrasyon ‘Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu’ (BİK) olarak belirlendi.



Şekil 4.7. Sonikasyon sonrası direkt ekim ve 1/10; 1/100; 1/1000 dilüsyonlarının spot ekimlerinin görünümü

Tablo 4.5. antifungaller için BİK sonuçlarını ve 32 *Candida albicans* suşundaki dağılımı göstermektedir. Antifungaller için BİK aralığı ve ayrıca en yüksek ve en düşük BİK değerindeki suş sayısı tespit edildi.

Ekinokandinlerde BİK aralığı sırasıyla kaspofungin için 0,0001-0,004 µg/ml, mikafungin için 0,001-0,004 µg/ml, anidulafungin için 0,001-0,008 µg/ml olarak bulundu. Kaspofunginin 32 suşun 9'unda inhibisyon yaptığı görüldü. Bunların dördü MİK/2 ve üçü MİK/64 değerinde inhibe oldu. Mikafungin için suşların dördünde inhibisyon görüldü. BİK değerleri iki suşta MİK/2 ve birinde MİK/16 düzeyinde tespit edildi. Anidulafungin için ise sekiz suşta inhibisyon görülüp, BİK değerleri beşinde MİK/2 ve birinde MİK/16 düzeyinde saptandı.

Amfoterisin B'nin BİK aralığı 0,03-0,25 µg/ml bulundu ve yedi suşun inhibe olduğu görüldü. BİK değerleri iki suşta MİK/2 ve birinde MİK/16 düzeyinde bulundu.

Azollerde BİK aralığı sırasıyla vorikonazol, itraconazol, posakonazol ve flukonazol için 0,0005 -0,008 µg/ml, 0,06-0,015 µg/ml, 0,002-0,008 µg/ml, 0,004-0,06 µg/ml olarak tespit edildi. Vorikonazolün 32 suştan 11'inde inhibisyon yaptığı, beşinin MİK/2'de ve birinin MİK/64'de inhibe olduğu görüldü. Posakonazolün dördü MİK/2 ve ikisi MİK/16'da olmak üzere suşların 7'sini inhibe ettiği saptandı. İtraconazolün suşların 26'sında biyofilm oluşumunu engelleyip, yedisini MİK/2 ve 4'ünü MİK/32'de inhibe ettiği saptandı. Flukonazolün ise suşların 10'unda inhibe edici etkiye sahip olduğu, MİK/2 konsantrasyonunda beş ve MİK/64 konsantrasyonunda bir suşun biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görüldü.

Sonuç olarak itraconazolün diğer ajanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) daha çok suşta inhibisyon yaptığı tespit edildi. Mikafungin için ise; kaspofungin, itraconazol, vorikonazol ve flukonazole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) daha az inhibisyon yaptığı saptandı.

Tablo.4.5. Otuz *C. albicans* klinik izolatu ve iki standart suşdaki antifungal ajanların BİK dağılımı

Antifungal	İnhibe olmayan suş, n (%)	İnhibe olan suş, n (%)	Konsantrasyona bağlı inhibe olan suş, n (%)					
			MİK/2	MİK/4	MİK/8	MİK/16	MİK/32	MİK/64
Kaspofungin	23 (71,9)	9 (28,1)	4 (12,5)	1 (3,125)	0	1 (3,125)	0	3 (9,375)
Mikafungin	28 (87,5)	4 (12,5)	2 (6,25)	1 (3,125)	0	1 (3,125)	0	0
Anidulafungin	24 (75,0)	8 (25,0)	5 (15,625)	2 (6,25)	0	1 (3,125)	0	0
Amfoterisin B	25 (78,1)	7 (21,9)	2 (6,25)	3 (9,375)	1 (3,125)	1 (3,125)	0	0
Vorikonazol	21 (65,6)	11 (34,4)	5 (15,625)	3 (9,375)	2 (6,25)	0	1 (3,125)	0
İtrakonazol	6 (18,8)	26 (81,3)	7 (21,875)	6 (18,75)	4 (12,5)	5 (15,625)	4 (12,5)	0
Posakonazol	25 (78,1)	7 (21,9)	4 (12,5)	0	1 (3,125)	2 (6,25)	0	0
Flukonazol	22 (68,8)	10 (31,3)	5 (15,625)	2 (6,25)	0	1 (3,125)	1 (3,125)	1 (3,125)

Ekimlerdeki üremelerin değerlendirilmesinde bazı suşlar dalgalı seyirde inhibe oldu. Tüm antifungal gruplarında bu dalgalı seyir gözlemlendi. Ancak amfoterisin B ve azoller için bu durum çok belirgin değilken, ekinokandinler ve posakonazolde daha çok gözlemlendi. Özellikle posakonazol, 4 suşta, MİK/ 2 ve MİK/8 arasında, üreme kontrollerine geçecek şekilde biyofilm oluşumuna sebep oldu. Buda biyofilm oluşumunu indükte ettiğini düşündürür.

5. TARTIŞMA

Nozokomial kandida enfeksiyonların yarısının gerece bağlı enfeksiyonlardan kaynaklandığı bildirilmekte (29) ve ‘Center for Disease Control and Prevention’ (CDC) tarafından yapılan araştırmada bu enfeksiyonların %60’ının biyofilm kaynaklı olduğu gösterilmektedir (63).

İmplant gereçlerde biyofilm oluşumu ciddi problemlere sebep olabilmekte ve ölümcül sepsise kadar giden komplikasyonlar görülebilmektedir (18). Gerece bağlı ve biyofilm ilişkili nozokomial enfeksiyonlar sıklıkla karşılaşılan ve tedavi zorlukları gösteren klinik tablolardır. *C. albicans*, santral venöz kateter gibi tıbbi gereç kaynaklı enfeksiyonlarda birinci sıradaki fungus olmasının yanı sıra kandidemilerde en sık izole edilen türdür (1, 30, 31). Bu nedenle çalışmamız kan kültürlerinden izole edilen *C. albicans* türü üzerine kurgulanmış ve 162 klinik izolatta çalışılmıştır.

Biyofilmin eradikasyonu ayrıca komplike bir sorun olarak karşımıza çıkmakta (18), sesil hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik formlara nazaran daha yüksek direnç göstermekte ve biyofilm oluşmuş gereci çıkartmadan tedavi etmek çoğunlukla mümkün olmamaktadır (7). İntravasküler kataterlerin uzaklaştırılması nispeten kolay iken, implante kataterlerin ya da enfekte yapay kalp kapakçıklarının çıkartılması zor ve problemlidir (11). Son yıllarda yaygın medikal gereç kullanımına bağlı enfeksiyonlar artmaktadır (18) ve tıbbi gereci çıkarmak zorunda kalmadan yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın biyofilm oluşturma oranlarını değerlendirdiğimizde 162 suşun %90’ının biyofilm pozitif olduğu bulunmuştur. Suşların %38’i orta düzeyde biyofilm oluştururken, %29’unun zayıf ve %23’ünün ise yoğun düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Başka çalışmalara göre daha yüksek oranda biyofilm pozitifliği tespit edilmiştir.

İsveç’te yapılan bir çalışmada Pannanusom ve arkadaşları 243 *C. albicans* izolatının %40,3’ünün biyofilm pozitif olduğunu tespit etmiştir (44). Kore’de Shin ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada ise nötropenik hastaların kanından izole edilen 30 *C. albicans* suşunun sadece %7’sinde biyofilm pozitifliği görülmüştür. Ayrıca kan ve kan dışı izolatların biyofilm oluşum sıklığı açısından *C. albicans* için fark bulunamamıştır (38).

Bu bilgiler ışığında biyofilm oluşturma oranlarını, izolasyon bölgelerini ayırt etmeksizin, incelediğimiz zaman, sonuçlarımızın yine de yüksek olduğu görülmüştür. Ülkemizde yapılan iki çalışmada, farklı vücut bölgelerinden elde edilen *C.albicans*'ların %23'ünün ve %39,9'unun biyofilm pozitif olduğu tespit edilmiştir (48, 49).

Biyofim pozitiflik oranımızın yüksek olmasının yöntemsel nedenlerle ve hasta popülasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Hastalarımızın birçoğu yoğun bakım hastasıdır ve santral venöz kateter gibi invazif girişimlere maruz kalmıştır. Bu şartlar biyofilm ve kandidemi oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Altta yatan hastalıklar ve hemato-onkoloji, transplant ve yanık hastalarının baskılanmış immün sistemi veya çocuk hastaların immün sisteminin gelişmekte olması bu durumu ayrıca desteklemektedir.

Biyofilm varlığının taranması için tercih ettiğimiz MCY hem ucuz hem de kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Ancak kullanılan kristal viyole boyası hem ekstraselüler maddenin polisakkaritlerini, hem de canlı ve ölü hücreleri ayırt etmeksizin tüm sesil hücreleri boyayarak yüksek OD değerlerine sebep olmaktadır (9, 37). Mikroplak kuyucuklarındaki tutunmayan olmayan hücrelerin ve fazla boyanın uzaklaştırılması için manuel pipetaj ile yapılan yıkama işlemi düzgün yapılmadığı zaman yüksek OD değerlere sebep olmaktadır.

Çalışmamızda farklı günlerde yapılan deney tekrarları değişken sonuçlar vererek yöntemin kısmen iyi tekrarlanabilme özelliğine sahip olduğunu ancak standardizasyon açısından sorun yaratabileceğini göstermiştir. Blank OD'lerin farklılığı baz alındığında, sorunun yıkama işleminden kaynaklandığı düşündürmüştür. MCY ile elde ettiğimiz yüksek oranda biyofilm pozitifliği ayrıca başka yöntemsel nedenlere bağlı olabilmektedir. Besiyeri farklılığı, gereç yüzeyi, biyofilm oluşturma süre ve şartları biyofilm oluşumunu etkilemektedir (5, 45, 47).

Bu nedenle MCY ile en az üç tekrarda da +3 düzeyinde biyofilm yapan otuz suş 'yoğun biyofilm yapan suş' olarak tanımlandı ve biyofilm oluşturma yetenekleri iğne kapaklı mikroplaklarda XTT yöntemi ile ayrıca teyit edilmiştir. XTT yöntemi hem kolay uygulanabilen hem de iki saat içinde hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Tutunan biyofilm hücreleri yüzeyden koparma işlemi gerektirmediğinden tutarlı sonuçlar vermektedir (8).

Çalışmamız 30 yoğun biyofilm yapan suşun ve iki standart suşun XTT yöntemi ile farklı metabolik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Bu yöntem ile biyofilm kantitasyonunda suşların +1-3 arası farklı derecelerde biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Böylece biyofilm kantitasyonu için kullanılan farklı yöntemlerin farklı sonuçlar verebileceği çalışmamızda tespit edilmiştir (8). Çalışmamızda MCY ve XTT yöntemi biyofilm oluşumunda kullanılan gereç ve besiyeri özellikleri farklıdır, ayrıca yıkama, statik ve akış şartları için farklı prosedürler uygulanmıştır. Bundan dolayı sonuçlardaki farklılığın hangi parametrelerden kaynaklı olduğunu söylemek ve böylece yöntemler arasında direkt kıyaslama veya korelasyon yapmak mümkün olmamıştır.

XTT yöntemi ile vital hücre metabolizma ölçümü üzerinden biyofilm kantitasyonunda SEM görüntüleri ile uyumlu olarak daha doğru tespitler yapıldığı bildirilmiştir (8, 12). Ancak olgun biyofilmler kompleks bir yapı olarak farklı metabolik aktiveye sahip olan hücreler içermektedir (1). Bundan dolayı sesil hücre metabolik aktivitesi ve hücre sayısının korele olup olmadığı tartışılmaktadır (6,12, 43,58).

Metabolizma farklılığı türler arasında beklenen bir sonuç olmaktadır, ancak aynı tür içinde de farklılık görülmektedir. Bu yüzden çoklu suş biyofilm taramalarında sadece metabolik aktiviteyi baz alarak hücre kantitasyonu yapmanın doğru bir yaklaşım olmadığı düşünülmektedir. XTT yönteminin bir suşun üreme kontrolüne göre kendi içindeki değişikliklerin tespitinde, örneğin biyofilm antifungal testlerindeki gibi, daha uygun olduğu savunulmaktadır (58). Bu bilgiler ve kendi sonuçlarımız sadece kantitasyonunda değil, biyofilm varlığının tespitinde de farklı çalışmaların sonuçlarının kıyaslanmasının doğru olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir.

Bu nedenlerle çalışmamızda XTT yöntemi biyofilm kantitasyonu için değil, iğne kapaklarındaki biyofilm oluşumunun teyidi için kullanılmıştır. MCY ile seçilen yoğun biyofilm yapan suşların iğne uçlarında biyofilm oluşturma yeteneği gösterilmiştir ve böylece MCBY antifungal duyarlılık testlerinde uygulanabilinmiştir.

Birçok dinamik sistem birkaç biyofilmden fazla oluşturmazken, iğne kapaklı plaklar aynı anda çok sayıda biyofilm oluşturmaya mümkün kılmaktadır. Kontaminasyon riskinin düşük

olması ve iğne uçlarında gelişen biyofilmlerin mikroskopik görüntüsünün alınabilmesi avantaj sağlamaktadır (74).

İğne kapaklı plaklar bakterilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak iğne uçlarında biyofilm oluşturma zorluğu nedeni ile kandida suşlarında sık uygulanmamaktadır. Calgary yöntemi için 1/30 x McFarland 1 (bakterilerde 10^7 CFU/ml tekabül etmektedir) ayarlanmasını önerilmektedir (63). Bu değer bakterilerde uygun olmakla birlikte kandidalarda biyofilm oluşumu için gerekli olan maya hücre sayısının çok altında bulunmuştur. Maya hücrelerinin büyüklüğünden dolayı McFarland ayarı bakteri hücre sayısının yaklaşık 30 kat daha az yoğunluğuna denk gelmektedir (75).

Bir çalışmada bir biyofilm pozitif *C. albicans* suşun 1/30 x McFarland 1 standart bulanık ayarıyla CBD' nin iğne uçlarında biyofilm oluşturmadığı bildirilirken (76), başka çalışmalar biyofilm oluşumunu tespit etmiştir. Onurdağ ve arkadaşları aynı hücre konsantrasyonu ile, Harrison ve arkadaşları ise *C.albicans*'ın MF 1 yoğunluğu ile iğne uçlarında biyofilm oluşturabilmiştir (77,78).

Araştırmalar kandida biyofilm oluşumu için optimal hücre sayısının 10^7 CFU/ml olduğunu tespit etmiş ve sükrozun iğne çıkıntılarının üzerinde *C. albicans* biyofilm oluşumunu belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir (6,45). Çalışmamızda Parahitiyawa ve arkadaşlarının protokolü uygulanmış ve şartlar optimize edilerek XTT yöntemi ile iğne uçlarında belirgin biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (45).

Calgary yönteminin avantajı yıkama işleminin kolaylığı ve standardize edilebilmesidir. Ancak iğne kapakların pahalı olması ve mikropalak gibi daha uygun alternatiflerin varlığı bu yöntemin tercih edilmemesinin bir nedeni olabilir. Ayrıca biyofilm antifungal duyarlılık çalışmalarında '96 kuyucuklu mikropalak XTT yöntemi' standart yöntem olarak kabul görerek daha sık kullanılmaktadır. Metabolik yöntemlere karşın Calgary yönteminin limitasyonu iğne uçlarında ne kadar yaşayan adherent hücre olduğunu gösterememesidir (65).

Hücre sayımı için yapılan sonikasyon işlemi ise tutarsız sonuçlara neden olabilmektedir (8, 16). Kısa süreli sonikasyon hücrelerin iğne uçlarından ayrılmamasına, uzun süreli sonikasyon ise hücrelerin zarar görmesine neden olmaktadır (74).

Çalışmamızda XTT yöntemi ile tekrarlanabilen şekilde iğne kapaklarda biyofilm oluşumu gösterilmiş, yıkama kolaylığından ve yöntemin iyi standardize edilebilmesinden dolayı iğne kapakların antifungal duyarlılık çalışması için kullanılmasına karar verilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar *C. albicans* suşlarının birçok antifungale karşı düşük düzeyde dirençli olduğunu göstermiştir (4,21).

Çalışmamızda 30 yoğun biyofilm yapan klinik izolatın ekinokandinler, amfoterisin B ve azollere karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Beş klinik izolatın ise itrakonazole karşı doza bağlı duyarlı (%16,7) olduğu tespit edilmiştir. Suşlar ekinokandin ve azollere karşı diğer epidemiyolojik çalışmalardaki gibi beklenen şekilde duyarlı bulunmuştur (4, 21). Tüm suşlarımızda amfoterisin B MİK değerlerinin duyarlılık sınırında olduğu ancak literatürden farklı olarak yüksek MİK değerlerinde (MİK₉₀ 0,5 µg/ml) olduğu tespit edilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 ve 2010 arası sürdürülen iki merkezli bir surveyans çalışmasında, kandidemiye neden olan 877 *C. albicans* izolatın amfoterisin B E-test ile MİK₉₀ değeri 0,19 µg/ml olarak bulunmuştur (4). Aynı şekilde Erciyes Üniversitesi'nde 2009-2011 yıllarında kandidemili hastalardan izole edilen 66 *C. albicans* suşun E-test ile MİK₉₀ değeri 0,125 µg/ml olarak düşük düzeyde tespit edilmiştir (79).

Çalışmamızda ayrıca tüm ekinokandinler için çok düşük MİK değerleri tespit edilmiştir. MİK₅₀ değeri hepsinde ≤0,008 µg/ml olarak tespit edilmişken, kaspofungin ve anidulafungin için MİK₉₀ değeri ≤0,008 µg/ml, mikafungin için ise 0,015 µg/ml olarak bulunmuştur. Lockhart ve arkadaşları kaspofungin ve mikafungin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerini çalışmamıza göre daha yüksek düzeyde saptamıştır (4).

Kalite kontrol suşların doz aralıklarında olması yöntemsel kaynaklı bir sorun olmadığını, daha çok izolat, hastane veya coğrafik nedenlerin farklı MİK düzeylerinin elde edilmesinin sebebi olduğunu düşündürmüştür.

Doksanaltı kuyucuklu mikropalak XTT yöntemi kandida sesil hücrelerinin duyarlılık testi için en çok tercih edilen metot olarak görülmektedir. Calgary yöntemi ise kandida biyofilm duyarlılık araştırmaları için kısıtlı sayıda kullanılmıştır. Literatür taramalarında, bu suş sayısında Calgary yöntemi kullanılarak sekiz farklı antifungal ajan ile kandida biyofilm duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Calgary yöntemi; biyofilm oluşturulması, tutunmayan hücrelerin yıkanarak uzaklaştırılması, ayrı bir plakta antifungallerin dilüsyonlarının hazırlanması ve göz veya spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi gibi birçok noktada yöntemsel kolaylık sağlamaktadır. Standardizasyonu kolay olmakla birlikte sonikasyon işlemi iş yükünü arttırmakta ve tekrar inkübasyona bırakmak zaman kaybına neden olmaktadır. Calgary yönteminin başka bir limitasyonu ise iğne uçlarında ne kadar başlangıçta tutunan yaşayan hücre olduğunu gösterememesidir (16). Başlangıç hücre sayısı, duyarlılık testlerinin sonuçlarını etkilediğinden önemli olmaktadır (66).

Bio Timer yöntemi gibi metabolik aktiviteyi ölçen yöntemler ise canlı hücre sayısını tespit etmektedir (16). XTT yöntemi benzer şekilde oluşturulmuş biyofilmi manipüle etmeden, metabolik aktiviteyi ölçüp canlı hücre yoğunluğunu tespit edebilen, tekrarlanabilen, hatasız ve verimli sonuçlar sergileyen ve ayrıca farklı materyallerde test edilebilen çok yönlü bir yöntemdir. Bunun dışında 2–3 saat içinde hızlı sonuç vermesi, iş yükünün düşük ve uygun maliyette olması avantaj sağlamaktadır. Sesil MİK değerlerinin tanımlamasında metabolik aktivitenin % 50 azalması baz alınmaktadır (7, 8).

Birçok araştırma duyarlılık testleri için 96 kuyucuklu mikropalaklarda XTT yöntemini kullanmıştır. Bundan dolayı sonuçlarımız çoğunlukla XTT yöntemini uygulayan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda biyofilm antifungal duyarlılık sonuçlarımız kuyucuklardaki bulanıklığa göre MBİK olarak tanımlanmıştır. MBEK olarak tanımlamak için koloni sayıları ile doğrulama gereklidir, ancak çalışmamızda kuyucuklardan spot ekimler yapılmamıştır.

Birçok çalışma flukonazolün etkisini sesil kandida hücreleri üzerinde araştırmış ve *C. albicans* suşlarında flukonazol için MBİK aralığını 4->1024 µg/ml olarak tespit etmiştir (7, 12, 54, 60, 77, 80). Çalışmamızda flukonazolün için beklenen şekilde yüksek ve genelde diğer çalışmalar ile uyumlu MBİK değerleri bulunmuştur. Testleri daha yüksek

konsantrasyon seviyelerinde başlattığımızdan dolayı flukonazolün MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değeri ≥ 2048 µg/ml olarak daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Ancak hiçbir suşun MBİK değeri 2048 µg/ml'den daha düşük bulunmamıştır.

Kısıtlı sayıda çalışma itrakonazolün etkisini sesil hücrelerde test edip MBİK aralığını 0,5–128 µg/ml olarak bulmuştur (60, 77, 81). Çalışmamızda azoller içinde itrakonazolün en düşük MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerlerine sahip olduğu görülmüş, ancak tüm suşların MBİK değerleri CLSI'a göre direnç sınırlarında saptanmış ve MBİK aralığımız 1- 128 µg/ml olarak diğer çalışmalara benzer bulunmuştur.

Onurdağ ve arkadaşları Calgary ve BioTimer yöntemi ile farklı antifungal ajanları kandida türlerinde test etmiştir (77). Calgary yöntemi ile *C. albicans* ATCC 10231 standart suşunda flukonazol MBİK değerini (8 µg/ml) çalışmamıza göre çok düşük düzeyde tespit etmişken, BioTimer yöntemi ile bizim çalışmamızdakine yakın bulmuşlardır. İlginç olarak itrakonazol için tam tersi olarak Calgary MBİK değeri (8 µg/ml) bizim sonucumuza (16µg/ml) yakın, BioTimer MBİK değeri (0,5 µg/ml) ise daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak hem kullanılan yöntemle hem de antifungale bağlı olarak aynı suş için bile sonuçlar değişebilmektedir.

Çalışmamızda sesil hücreler vorikonazol ve posakonazole karşı beklediğimiz gibi dirençli bulunmuştur. Çalışmalarda vorikonazol için MBİK aralığı 0,5- >265 µg/ml olarak bulunmuştur. Kısıtlı sayıda çalışma posakonazolün sesil hücreler üzerindeki etkinliğini araştırmıştır (13, 60, 82). Shuford ve arkadaşları 28 kan ve kan dışı kaynaklardan elde edilen *C. albicans* suşlarının vorikonazol MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerlerini 1 ve >256µg/ml (MBİK aralık: 0.5 – >256 µg/ml) olarak tespit etmiştir (82). Katragkou ve arkadaşları SE disklerde oluşturulanan *C. albicans* sesil hücrelerini vorikonazol (MBİK >256 µg/ml) ve posakonazole (MBİK>64 µg/ml) karşı dirençli bulmuştur (13). Vorikonazol ve posakonazole karşı saptanan bu yüksek düzeydeki direnç çalışmamızın MBİK aralığı (32 - >512 µg/ml ve 0,5- >256 µg/ml) ile de uyumluluk göstermiştir.

Çalışmalar *C. albicans* suşlarında amfotersis B için MBİK aralığını 0,015- 32 µg/ml olarak bulmuştur (7, 77, 80, 82). Çalışmamızda suşlar amfoterisin B'ye karşı beklenen şekilde dirençli bulunmuştur, ancak MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerleri (8 ve 16 µg/ml) ve

MBİK aralığımız (4–128 µg/ml) diğer çalışmalara göre genelde daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Shuford ve arkadaşları 28 kan ve kan dışı bölgelerden izole edilen *C. albicans* suşlarında amfoterisin B için MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerlerini 1 ve 2 µg/ml (MBİK aralık 0.5–8 µg/ml) olarak tespit etmiştir (82). Harrison ve arkadaşları Calgary yöntemini kullanarak kandida suşlarının metaller ve amfoterisin B'ye karşı duyarlılığını test etmiştir. Bir *C. albicans* suşunda amfoterisin B için minimal letal konsantrasyon 2 µg/ml olarak MBİK aralımıza göre düşük ama yakın düzeyde bulunmuştur (78). Onurdağ ve arkadaşları Calgary yöntemi ile bizim çalışmada da kullanılan *C. albicans* ATCC 10231 standart suşu için amfoterisin B MBİK (8 µg/ml) değerini MBİK değerimiz ile aynı değerde bulmuştur (77). Amfoterisin B için MBİK aralığını Ramage ve arkadaşları yedi *C. albicans* suşunda 0,25- 0,5 µg/ ml, Choi ve arkadaşları ise 12 *C. albicans* suşunda 0,5 -1 µg/ ml olarak tespit etmiştir. Adı geçen araştırmalarda çalışmamıza göre belirgin şekilde daha düşük direnç düzeyi gözlenip, CLSI'nin verdiği duyarlılık aralığında bulunmuştur.

Sonuçlarımızın diğerlerinden yüksek bulunması ve CLSI'nin verdiği duyarlılık aralığını geçmesi birçok faktöre bağlı olabilmektedir. Ramage'ın planktonik duyarlılık düzeyleri ve biyofilm oluşturma süresi bizim çalışmamızla aynı iken, yöntemsel değişkenler (96 kuyucukta XTT/Calgary Yöntemi, antifungaller ile inkübasyon süresi 24/48 saat) veya izolata bağlı faktörler (kan izolatu olması veya biyofilm oluşturma yeteneği) farklılığa neden olabilmektedir.

Birçok araştırma ekinokandinleri sesil hücrelere karşı etkili bulmuştur. Çalışmalar MBİK aralıklarını kaspofungin için 0,03-4 µg/ml (13, 14, 80, 82, 83), mikafungin için ≤0,03-2 µg/ml (14, 80, 83, 84) ve anidulafungin için 0,015-16 µg/ml olarak bulmuştur (13, 83, 85). Çalışmamızda ise kaspofungin ve mikafungin için MBİK aralıkları, sırasıyla 0,125 – 16 µg/ml ve ≤0,06 – 32 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu değerler önceki çalışmalarla kısmen örtüşürken maksimal değerlerimiz daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Anidulafungin için MBİK aralığımız 0,125 - 4 µg/ml olarak diğer çalışmalar ile uyumlu saptanmıştır.

Aynı iki *C. albicans* suşunda MBİK değerlerini Kuhn ve arkadaşları kaspofungin için 0,5 µg/ml (14), Katragkou ve arkadaşları ise 0,03 ve 0,06 µg/ml olarak belirgin şekilde daha düşük tespit etmiştir (13). İki çalışma aynı suşları çalıştığı halde Katragkou kaspofungin için belirgin şekilde daha düşük değerler gözlemiştir. Her iki çalışmada da SE disklerde

XTT yöntemi ile biyofilm oluşum süresi aynı olup (48 saat), antifungale maruz kalma süresi (24/48 saat) ve besiyeri farklılığı (RPMİ/YNB) değişken sonuçlar alınmasında faktör olarak önem taşımıştır. Ayrıca bu çalışmalarda mikafungin (0,25 ve 0,25 µg/ml), anidulafungin (0,12 ve 0,5 µg/ml) ve kaspofungin için MBİK değerleri birbirine yakın ve yeni CLSI duyarlılık aralığında tespit edilmiştir (13, 14).

Çalışmamızda da ekinokandinlerin MBİK değerleri grup içinde birbiriyle yakın bulunmuştur. Yeni CLSI duyarlılık aralığına (M27 A3-S4) göre suşlarımızın MBİK₅₀ değerleri kaspofungin ve anidulafunginin için bir dilüsyon (2 µg/ml) fark ile, mikafungin için ise iki dilüsyon fark ile (4 µg/ml) dirençli bulunmuştur. Otuz iki suşun biyofilmlerinin 11'i kaspofungine, dokuzuu anidulafungine ve beşi mikafungine karşı duyarlı bulunmuştur.

Cocuaud ve arkadaşları silikon kateter materyallerde farklı matürasyon fazlarında olan 15 *C. albicans* biyofilmine karşı kaspofunginin etkinliğini araştırmıştır. Planktonik MİK düzeyinde kaspofungin minimal etki göstermişken, 2 µg/ml olan terapötik konsantrasyonunda biyofilmlere karşı daha etkin bulunmuştur (86). Ramage ve arkadaşları ise kaspofunginin daha düşük terapötik konsantrasyonlarının (0,125 ve 1 µg/ml) bile sesil hücreleri %99 oranında öldürdüğünü göstermiştir (87). Çalışmamızda ekinokandin MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ sonuçları CLSI'nın verdiği duyarlılık aralığında saptanmamıştır. Ancak Cocuaud ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde çalışmamızda kaspofunginin MBİK₅₀ değeri (2 µg/ml) terapötik konsantrasyon aralığında bulunarak klinik izolatların % 50' sine karşı etkili olduğu görülmüştür.

Üç farklı çalışmada mikafungin, anidulafungin ve kaspofunginin, farklı vücut bölgelerinden izole edilen aynı 28-30 *C. albicans* izolatının sesil hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kaspofunginin ve mikafunginin MİK₅₀ sonuçları CLSI duyarlılık sınırlarında iken (0,25 ve 0,5 µg/ml), MİK₉₀ değerleri (2 ve 1 µg/ml) duyarlılık sınırını geçmiştir (82, 84). Anidulafunginde ise en düşük MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ (<0.03 µg/ml) değerleri saptanarak CLSI'nın belirlediği duyarlılık sınırlarında görülmüştür (85). Çalışmamızda da anidulafungin için en düşük MBİK₉₀ değeri (4 µg/ml) tespit edilmiştir. Planktonik hücrelerde ekinokandin MİK değerlerimiz daha düşük olduğu halde, MBİK₅₀ ve

MBİK₉₀ değerleri (kaspofungin: 2 ve 8 µg/ml; mikafungin: 4 ve 8 µg/ml, anidulafungin: 2 ve 4 µg/ml) belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur.

Calgary Yöntemi ile oluşturduğumuz 48 saatlik biyofilmlerin duyarlılık düzeylerini özetlediğimiz zaman ekinokandinler diğer antifungallere göre en düşük MBİK değerlerine sahip olmuştur. Ekinokandinler içinde MBİK değerleri birbiriyle yakın düzeyde bulunmuştur. Anidulafungin için bir dilüsyon fark ile en düşük MBİK₉₀ değeri tespit edilmiştir. Amfoterisin B'nin MBİK₅₀ değeri itraconazolünki ile aynı düzeydeyken, MBİK₉₀ değeri iki dilüsyon fark ile daha düşük bulunmuştur. Azoller içinde itraconazol en düşük MBİK değerlerine sahip olup, posakonazolün ise MBİK₅₀ ve MBİK₉₀ değerleri iki dilüsyon fark ile daha yüksek olarak saptanmıştır. Daha sonra sırasıyla vorikonazol ve flukonazol en yüksek MBİK değerlerine sahip olarak bulunmuştur.

MBİK değerlerimiz birçok çalışmaya göre yüksek (7, 12, 77, 78, 80-82, 84, 85), bazı çalışmalarla ise uyumlu bulunmuştur (12, 14, 60, 77, 81). MBİK sonuçlarımızın genelde yüksek düzeyde görülmesi suşlarımızın 48 saatlik biyofilm oluşturma sürecine karşılık sadece 24 saat antifungale maruz bırakılmasına ayrıca suşlarımızın yoğun düzeyde biyofilm oluşturmaya bağlı olabilir.

Tüm çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında farklı yöntemler, biyofilm fazlar ve antifungaller ile inkübasyon sürelerinin farklılığının kandida duyarlılık çalışmalarında aynı tür hatta aynı suş için bile değişken sonuçlara neden olabileceği görülmüştür. Bu durum laboratuvarlar arası standardizasyonunun önemini ve buna olan gereksinimi göstermektedir.

Çalışmamızda antifungallerin MBİK/MİK oranlarını birbiriyle kıyaslayarak biyofilm üzerindeki etkinliğinin, etki benzerliliğinin ve korelasyonun araştırılması amaçlanmıştır. Kısıtlı sayıda çalışma MBİK/MİK oranlarını bildirmiştir.

Tobudik ve arkadaşları kan ve SVK'tan izole edilen 23 *C. albicans* suşunun duyarlılık testlerinde amfoterisin B için 24 saatlik biyofilmlerinde daha yüksek ($\geq 32 \times \text{MİK}$), 72 saatlik biyofilmlerinde ise daha düşük MBİK/MİK oranı ($4 \times \text{MİK}$) elde etmiştir. Kırksekiz saatlik biyofilmlerinde ise MBİK/MİK oranı >128 olarak bulunmuştur (11). Çalışmamızda

ise tüm suşların 48 saatlik biyofilmlerinde ortanca MBİK/MİK oranı 16 olarak tespit edilmiştir. Amfoterisin B için istatistiksel olarak anlamlı şekilde en düşük MBİK/MİK oranı saptanmıştır.

MBİK/MİK oranı planktonik MİK değerlerini baz almaktadır. Çalışmamızda amfoterisin B için tespit edilen yüksek planktonik MİK değerleri düşük MBİK/MİK oranına sebep olmuştur. MBİK/MİK oranı ne kadar düşük bulunmuşsa da amfoterisin B'nin MBİK değerleri CLSI'nın verdiği duyarlılık aralığını geçmektedir. Terapötik konsantrasyonlarda etkili olmaması ve yüksek dozlara bağlı toksisite amfoterisin B içi en önemli kısıtlayıcı faktördür (87).

Çalışmamızda itraconazol için MBİK/MİK oranı 64 olarak bulunmuştur. Bir azolün bu kadar etkili olabileceği beklenmeyen bir sonuç olmuştur. Bazı suşların planktonik formları doza bağımlı duyarlı olmasına rağmen, MBİK/MİK oranı düşük düzeyde tespit edilmiştir. Ancak amfoterisin B'ye benzer şekilde itraconazolün MBİK değerleri CLSI duyarlılık aralığını geçmektedir.

Çalışmamızda ekinokandinlerin MBİK/MİK oranları anidulafungin için 128 ve kaspofungin için 256 değerinde saptanmıştır, mikafunginde ise 384 ile diğer ekinokandinlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Genelde çalışmalar ekinokandinleri ve özellikle anidulafungini sesil hücrelere karşı en etkili olarak bulmuştur. Çalışmamızda her ne kadar MBİK/MİK oranları yüksek olsa da ekinokandin MBİK değerleri duyarlılık sınırına en yakın olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda azollerin sesil hücrelere daha az etkili olmaları beklenen bir sonuçtu. Ancak özellikle flukonazol ve vorikonazolün >32000 kat artışı beklenenin üstünde yüksek düzeyde bulunmuştur. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında düşük planktonik MİK ve yüksek MBİK değerlerimiz bu duruma neden olmuştur. Ayrıca daha yüksek konsantrasyonlarda çalışılması daha yüksek değerlerin bulunmasına olanak sağlamıştır. Posakonazol için MBİK/MİK değeri 1536 ile itraconazolü takip etmiştir. Tobudic ve arkadaşları posakonazolün *C. albicans*'ın tüm biyofilm fazlarına karşı azalmış etkisini benzer şekilde tespit etmiştir (11).

Antifungallerin MBİK/MİK oranların korelasyonunu incelediğimizde kaspofunginin mikafungin ve ayrıca anidulafungin ile, posakonazolün ise vorikonazol ve ayrıca itrakonazol ile yüksek düzeyde korelasyon gösterdiği ve böylece suşlar üzerinde benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Gruplar içinde korelasyonun görülmesi aynı etkinlik mekanizmasından dolayı beklenen bir sonuç olmuştur.

Çalışmamızda ekinokandinlerin planktonik MİK değerlerinin çok düşük bulunması amfoterisin B'ye göre daha yüksek MBİK/MİK oranlarına sebep olmuştur. Bu nedenle amfoterisin B'ye göre ekinokandinlerin sesil hücreler üzerinde daha az etkiye sahip olduğunu söylemek yanıltıcı olabilir. MBİK/MİK oranları planktonik ve sesil hücreler arasındaki etkinlik farkını ve böylece ajanın kendi içindeki etkinlik gücünü yansıtmaktadır. Ancak eğer bir ajan, amfoterisin B gibi, dar bir güvenlik penceresine sahip ise, MİK artışı ne kadar düşük olsa ve ajan ne kadar güçlü görünse de, terapötik dozda verilememesi ajanın klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yüzden CLSI duyarlılık sınırında bulunan bir suşun MBİK değeri klinisyen için daha çok önem taşımaktadır.

Riskli hasta gruplarının artması ile hayatı tehdit eden biyofilme bağlı enfeksiyonlar da sıklıkla görülmekte ve profilaktik tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Klinikte bazı riskli hasta gruplarına antifungal ilaçların enfeksiyonun tedavisi veya profilaksisinde daha uzun süre ve daha düşük dozlarda verilmesi gündemdedir. Dolayısıyla kan seviyeleri klinik subinhibitör konsantrasyon ya da in vitro MİK değerlerinin altına düşmektedir (18, 19).

Antimikrobiyallerin düşük dozda verilmesinin ne kadar önleyici olduğunu araştıran çalışmalar sürdürülmüştür. Çalışmalar azitromisinin sub-MİK konsantrasyonunun kistik fibrosis hastalarında azitromisin dirençli suşlarda bile *Pseudomonas* biyofilm oluşumunu azalttığını ve düşük doz tedavinin klinik faydasını göstermiştir (88).

Düşük doz ile sistemik profilaksi ve kateteter yüzeylerin antimikrobiyeller ile kaplanmasının klinik uygulanabilirliği açısından ileri in-vitro ve in-vivo araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdiye kadar kısıtlı sayıda çalışma antifungallerin kandida biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmıştır. Biyofilm inhibisyonunu test etmek için farklı deneysel yaklaşımlar uygulanmıştır. Bir yaklaşım maya süspansiyonunu antifungale maruz bıraktıktan sonra antifungalden arındırıp biyofilm oluşturmak (14),

diğeri ise hücreleri antifungal ajan ile eş zamanlı inkübe ederek biyofilm oluşumuna maruz bırakmaktır (18, 70).

Çalışmamızda *C. albicans* hücreler aynı anda antifungallerin MİK/2 – MİK/128 sub-MİK'leri ile inkübe edilmiştir. İğne uçlarındaki biyofilm oluşumunu %100 durduran konsantrasyon 'Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu' (BİK) olarak belirlenmiştir. Daha düşük düzeydeki inhibisyonlar dikkate ve değerlendirmeye alınmamıştır.

Sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ajanların çoğu birbiriyle benzer oranda inhibisyon yapmışken, itrakonazol ve kısmen mikafungin diğer antifungallere göre farklılık göstermiştir. İtrakonazolün diğer ajanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha çok suşta tam inhibisyon yaptığı gözlenmiştir. Otuziki suşun 26'sında (%81,3) MİK/2-MİK/32 (0,06–0,015 µg/ml) aralığında tam inhibisyon tespit edilmiştir. İnhibe olan suşların yarısı MİK/8-MİK/32 arasında inhibe olmuştur. Mikafunginin ise; kaspofungin, itrakonazol, vorikonazol ve flukonazole göre anlamlı şekilde daha az inhibisyon yaptığı görülmüştür. Sadece dört suşta MİK/2 ve MİK/4'te tam inhibisyon tespit edilmişken, diğer suşlarda daha az düzeyde tespit edilmiştir veya hiç inhibisyon gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmalar ağırlıklı flukonazol ve amfoterisin B'nin inhibe edici etkisi üzerinedir. Bruzual ve arkadaşları flukonazolün etkisini hem duyarlı hem de dirençli *C. albicans* suşlarında test etmek için hastada kan seviyelerine ulaşılabilen son kuyucuk konsantrasyonunu 8 mg/L düzeyinde belirlemiştir. MİK değerlerinin altındaki ilaç düzeylerinde dirençli suşların adezyonu tespit edilmişse de, hücre proliferasyonu ve biyofilm oluşumu inhibe olmuştur (70). Ghannoum ve arkadaşları flukonazol ve amfoterisin B'nin MİK/2 konsantrasyonunda *C. albicans* hücrelerinin endotel hücre adezyonunu %22 ve %91 düzeyinde engellediğini göstermiştir (89).

Çalışmamızda çoğunlukla MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonunda flukonazol ve amfoterisin B'nin sırasıyla suşların 10 (%31,3) ve yedisinde (%21,9) tam inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca flukonazolün bir suşta MİK/64'de bile tam biyofilm inhibisyonu yaptığı görülmüştür.

Henriques ve arkadaşları *C. albicans* hücrelerini flukonazol ve amfoterisin B sub-inhibitör konsantrasyonlarında (MİK/2) simültan inkübe ederek biyofilm oluşumu üzerindeki

etkisini araştırmıştır. Denenmiş iki suşun biyofilm oluşumu flukonazol tarafından %21 ve %31 ve amfoterisin B tarafından %20 ve %22 düzeyinde inhibe olmuştur. Aynı tür olduğu halde flukonazolün iki suşta farklı düzeylerde inhibisyon yaptığı ve inhibisyonun böylece sadece ajana bağlı olmadığı, aynı zamanda suşa bağlı faktörlerin de rol oynadığı gösterilmiştir (18). Aynı şekilde çalışmamızda da aynı sub-M K konsantrasyonunun farklı suşlarda farklı derecede inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antifungaller için genellenme yapmanın mümkün olmadığı g r lm ştir.

Kuhn ve arkadaşları *C. albicans* pre-inokulumunu 1/4 M K sub-inhibitör konsantrasyondaki farklı antifungallere maruz bıraktıktan sonra, antifungal yokluğunda hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneğini araştırmıştır. Sonuç olarak amfoterisin B ve kaspofunginin biyofilm oluşturmak için yeterli maya hücresi bırakmadığı ve vorikonazolün biyofilm oluşumunu belirgin şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir (14). Benzer şekilde çalışmamız ağırlıkla M K/2 düzeylerinde kaspofungin (4/9 suş) ve vorikonazolün (5/11 suş) tam inhibisyon yaptığını tespit etmiştir. Ayrıca kaspofungin ile     suşta M K/64'de bile tam biyofilm inhibisyonu gözlenmiştir.

Deneyin başında antifungallerin doğrusal etkisini var sayarak her bir sub-M K için biyofilm oluşumunda 'yüzde inhibisyonunun' bulunması amaçlanmıştı. Ancak yöntemsel olarak zorluklar ile karşılaşıldı. Bazı suş-antifungal kombinasyonları için hem kuyucuk hem spot ekimlerinde dalgalı üreme yoğunluğu tespit edilmiştir. Değerlendirme zorluğundan dolayı sadece %100 inhibisyon yapan konsantrasyonun tespiti hedeflendi ve B K olarak tanımlandı. B K altı konsantrasyonlarda oluşan dalgalı üreme seyrinden dolayı daha düşük düzeyde inhibisyonlar değerlendirmeye alınmamıştır. Genel olarak M K'e yakın (M K/2 ve M K/4) konsantrasyonlarda tam inhibisyon g r lm ştir. Ancak bazı suşlarda M K'e yakın düzeylerde biyofilm oluşumunun inhibe olmadığı hatta bazen arttığı tespit edilmiştir.

 lk defa 1988 yılında Schadow ve arkadaşları bakterilerde sub-M K konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu arttırdığını rifampin ve *S. epidermidis*  alışmasında tarif etmiştir (88, 90). Takip eden çalışmalarda birçok bakteri-antibiyotik kombinasyonu için bu etki tespit edilmiştir (88). Bir etken maddenin 'doz -cevap etkinliği' eğriler ile tariflenebilir. Genelde doz-cevap eğrisi bifazik özelliğe sahiptir ve düşük dozda biyofilm oluşumu, yüksek dozda

biyofilm inhibisyonu ile karakterizedir. Bazı antibiyotikler biyofilm oluşumu üzerinde düşük dozlarda antagonist, yüksek dozlarda agonist ve daha yüksek dozlarda yine antagonist olarak etkinlik göstermektedir. Birçok kimyasal madde, ilaçlar, hormonlar ve fiziksel stres U-şeklinde ya da multifazik doz cevap ilişkilerine sahiptir. Uyarıcı cevabın maksimum amplitüdü ve uyarıcı etkinin doz aralığı antibiyotik ve bakteriler arasında değişmektedir. Birçok antibiyotik için maksimum biyofilm indüksiyonu $\leq 1/2$ MİK konsantrasyonunda tespit edilmiştir (88).

Çalışmamızda aynı şekilde bazı suş-antifungal kombinasyonunda düşük sub-MİK düzeylerinde biyofilm inhibe olurken, özellikle $1/2$ MİK ve $1/4$ MİK gibi daha yüksek konsantrasyonlarda üreme daha az inhibe olmuştur. Bu dalgalı üreme şekli birçok suş-ekinokandin kombinasyonunda görülmüşken, amfoterisin B ve azollerin çoğunda belirsiz düzeyde veya nadir bulunmuştur. Özellikle posakonazol ile dalgalı üreme sık görülmüş ve 4 suшта biyofilm indükleyici etki tespit edilmiştir. Ancak deneyin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasından dolayı bu konuda daha ayrıntılı ve yoğun çalışmalar yapılmalıdır.

Bu etki tüm suşlarda görülmediği için suşa bağlı faktörlerin de rol oynayabileceği düşüncesini akla getirmiştir. Antimikrobiyal ajanın sub-inhibitör konsantrasyonu mikroorganizmada morfolojik değişikliklere, enzim veya toksin üretiminin stimülasyonu veya inhibisyonu gibi değişikliklere sebep olmaktadır (18, 19, 91, 92). Walker ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmada ekinokandinlerin sub-inhibitör konsantrasyonunun *C. albicans* suşlarının planktonik formlarındaki etkisi araştırılmıştır (92). Kaspofungin kalsinörin ve proteinaz C'yi up-regüle ederek kitin oluşumunu arttırıp kaspofungin direncinin artmasına sebep olmuştur (92). Simitsopoulou ve arkadaşları kaspofunginin MİK üzeri konsantrasyonlarında *C. albicans* suşlarında paradoksal şekilde artan biyofilm oluşumunu bildirmiştir (83). Walker'ın çalışmasını baz alarak biyofilm yapının içinde ekinokandinlerin sub-inhibitör konsantrasyonlara ulaşip kitin oluşumunu indükleyerek dirence neden olabileceği tartışılmaktadır (83).

Mayalarda da antifungal sub-MİK konsantrasyonların biyofilm oluşumunu artırıcı etkiye sahip olabileceğini varsayarak ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Enfeksiyon tedavisinde bir antimikrobiyal ajanın seçiminde anti-biyofilm etkisi önemli bir rol oynayabilir. Ancak sub-MİK konsantrasyonlar ile oluşabilen yan etkiler,

mikroorganizmada artan direnç durumuna neden olabilme endişesi ve ayrıca yetersiz klinik deneyim sorun teşkil etmektedir (18). Bundan dolayı enfeksiyon profilaksisi stratejilerinde antifungallerin sub-MİK dozlarındaki kullanımı için ileri in-vitro ve in-vivo araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Kandida türleri, özellikle *C. albicans* sıklıkla biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda görülmektedir. Birçok biyofilm kantitasyon yöntemi *C. albicans* 'ın yoğun biyofilm yapan mantarlar arasında yer aldığını göstermektedir. Son yıllarda biyofilme bağlı enfeksiyonlar artmakta ve yeni tedavi ve profilaksi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın sonuçları ekinokandinlerin biyofilme bağlı enfeksiyonların tedavisinde uygun olduğunu göstermiştir ve itrakonazolün biyofilm oluşumunun profilaksisinde alternatif bir ajan olarak yer alabileceğini düşündürmüştür.

6. SONUÇ

Bu çalışmada hemokültürlerden izole edilen 162 *C. albicans* suşunun MCY ile biyofilm yapma dereceleri değerlendirildi ve ayrıca toplam 32 suşun, 30 yoğun biyofilm yapan klinik izolat ve *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 10231 standart suşları, iğne kapaklı mikropaklarda biyofilm yapma yetenekleri XTT yöntemi ile araştırıldı. Planktonik ve sesil formların antifungal duyarlılıkları sekiz farklı antifungal ajana karşı mikrodilüsyon ve MCBY ile tespit edildi. Ayrıca antifungal ilaçların biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı.

1. Çalışmamızın biyofilm oluşturma sonuçlarına göre 162 suş beklenenin üstünde biyofilm pozitif (%90) olarak bulundu. Suşların %38'i orta düzeyde biyofilm yaparken, %29'u zayıf ve %23'ü ise yüksek düzeyde biyofilm oluşturdu.
2. MCY yöntemi kolay uygulanabilen bir yöntem olmakla birlikte yıkama işlemindeki standardizasyon sorunundan dolayı düşük tekrarlanabilme özelliğine sahiptir. MCY ile yoğun biyofilm oluşturan otuz suşun (+3) iğne kapaklı mikropaklarda da biyofilm yaptığı XTT yöntemi ile izlendi. Bu 32 suşun XTT yöntemi ile farklı metabolik aktivite göstererek farklı derecelerde (+1—+3) biyofilm oluşturduğu tespit edildi.
3. Planktonik MİK değerlerine göre suşlar tüm antifungallere karşı duyarlı olarak bulundu. Ancak itrakonazol için klinik izolatların 25'i (%83,3) ve *C. albicans* ATCC 90028 standart suşu duyarlıyken, beş suş (%16,7) ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşu doza bağlı duyarlı olarak tespit edildi. Ekinokandinlerin MİK değerleri çok düşük düzeyde saptanmışken ($MİK_{90} \leq 0,008-0,015 \mu g/ml$), amfoterisin B'nin MİK değeri ($MİK_{50}$ ve $MİK_{90} 0,5 \mu g/ml$) yüksek olarak bulundu.
4. Biyofilm duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre ekinokandinlerin $MBİK_{50}$ ve $MBİK_{90}$ değerleri tüm antifungaller içinde en düşük düzeyde bulundu. $MBİK_{50}$ değerleri (kaspofungin ve anidulafungin: $2 \mu g/ml$, mikafungin: $4 \mu g/ml$) CLSI duyarlılık sınırına yakın ama üzerinde tespit edildi. Sesil formunda olan suşların 11'i kaspofungin, dokuzu anidulafungin ve beşi mikafungine karşı duyarlı olarak saptandı. Ekinokandinlerin sesil hücrelere en etkili ve biyofilme bağlı enfeksiyonların tedavisinde en uygun seçenek olduğu görüldü.
5. Amfoterisin B'nin $MBİK/MİK$ oranı en düşük düzeyde bulunmuş ise de, $MBİK$ sonuçlarına göre tüm suşlar dirençli sınırlarda bulundu. İtrakonazol ise azoller

- içinde en düşük MBİK değerlerine sahip olmasına rağmen, tüm suşlar tüm azollere karşı direnç bulundu.
6. Ortanca MBİK/MİK oranı sonuçlarına göre amfoterisin B'nin en düşük değere (16) sahip olduğu tespit edildi. Azoller içerisinde itraconazol (64) ve ekinokandinlerde ise anidulafungin (128) için en düşük MBİK/MİK oranı saptandı. Mikafungin için ise diğer ekinokandinlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek MBİK/MİK oranı (384) bulunmuştur ($p<0,05$).
 7. Çalışmamızda XTT yöntemine göre nadir kullanan MCBY yönteminin, uygulama ve sonuç okuma kolaylığından dolayı *C. albicans* türünün biyofilm antifungal duyarlılık testleri için uygun olduğu bulundu. Ancak iğne kapaklı plakların pahalı olması ve sonikasyon sonrası plakların bir gün inkübasyonuna bağlı olarak sonucun gecikmesi yöntemin limitasyonudur. XTT yöntemine göre daha ucuz olan ve hücre metabolizmasını ölçen bir yöntemin (örn. BTY) MCBY yöntemi ile kombinasyonunun test sonucunun daha erken çıkmasını sağlayabileceğini ve tedavide yol gösterici olabileceğini düşündürmüştür.
 8. Biyofilm inhibisyon etkinliği açısından itraconazolün diğer ajanlara göre daha çok suşta tam inhibisyon (26/32 suş; %81,3) yaptığı gözlemlendi, mikafunginin ise kaspofungin, itraconazol, vorikonazol ve flukonazole göre daha az suşta tam inhibisyon (4/32 suşta) yaptığı saptandı.
 9. Kandida biyofilm inhibisyonunun araştırılması amacıyla iğne kapaklı mikropalakların kullanılması ilk defa bu çalışmada denenmiştir. Ancak yöntem, uygulama kolaylığı olsa da düşük tekrarlanabilme özelliği ve dalgalı üremeye bağlı okuma zorluğundan dolayı özellikle çoklu suş taramaları için bu haliyle uygun bulunmamıştır ve yöntemin metabolizma ölçen veya mikroskobik yöntemlerle kombine edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Biyofilme bağlı enfeksiyonların, gerek tedavi gerekse profilaksisinde, antifungal ajanların biyofilm oluşum inhibisyon ve biyofilm eradikasyon özellikleri hekimin ilaç seçiminde yardımcı olacaktır.

7. Kaynaklar

1. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* 55(3):199–204, 2012.
2. Ustaçelebi Œ, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tünmay E, Mete Ö. *Candida* türler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1081-86, 1999.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3):309–17, 2004
4. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 50(11):3435–42, 2012.
5. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 62(3):915–21, 1994.
6. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70(2):878–888, 2002.
7. 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* 183 (18):5385–5394, 2001.
8. Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol* 50(2):214–8, 2012.
9. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72(2):157–65, 2008.
10. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Emel Tümbay. *Candida*, *Cryptococcus* ve tıbbi önemli olan diğer mayalar. Klinik Mikrobiyoloji. Dokuzuncu baskı, cilt 2, 1762-89, 1949-60, Ankara, Atlas Kitapçılık, 2010.
11. Tobudic S, Lassnigg A, Kratzer C, Graninger W, Presterl E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. *Mycoses* 53(3):208–14, 2009.
12. Ramage G, Walle KVA, Wickes BL, Lo L. Standardized Method for In Vitro Antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45(9):2475–2479, 2001.

13. Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Roilides E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1):357–60, 2008.
14. 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* 46(6):1773–1780, 2002.
15. 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* 37(6):1771–6, 1999.
16. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* 75(3):478–484, 2008.
17. Nett JE, Cain MT, Crawford K, Andes DR. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *J Clin Microbiol* 49(4):1426–33, 2011.
18. Henriques M, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm formation in indwelling medical devices. *Int J Artif Organs* 28(11):1181–1185, 2005.
19. Hazen KC, Mandell G, Coleman E, Wu G. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 183(1):89–94, 2000.
20. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Macir İlkit. Yüzeyel ve kutanöz mikozlar. Mikrobiyoloji. Altıncı Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık, 715-74, 2010.
21. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol* 151(8):2571–81, 2013.
22. Nguyen, MH, Peacock JE, Tanner DC, Morris AJ, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Yu VL. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch Intern Med* 155:2429–2435, 1995.
23. Hassan I, Powell G, Sidhu M, Hart WM, Denning DW. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. *J Infect* 59(5):360–5, 2009.

24. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Andre N, White SH, Wilcox S, Harrison LH, Seaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch SM. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: A case – control study using data from population – based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26(6):540–547, 2005.
25. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20(1):133–63, 2007.
26. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* 49(1):396–9, 2011.
27. Winn Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The laboratory identification of yeasts. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition, New York, Lippincott Williams and Wilkins, 1216-43, 2006.
28. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2):167–193, 2002.
29. Coenye T, De Prijck K, Nailis H, Nelis HJ. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. *Open Mycol J* 5:9–20, 2011.
30. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5(6):608–11, 2002.
31. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33(8):1387–92, 2001.
32. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 14(7):582–90, 2008.
33. Öztürk SB. *Kandida ve Biyofilm*. *Bamçağ Bült* 2: D 28-32, 2011.
34. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11(1):30–6, 2003.
35. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol* 54(11):1052–60, 2009.
36. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci* 63(1):5–11, 2006.
37. Li X. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149(2):353–362, 2003.

38. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 40(4):1244–1248, 2002.
39. Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, Peixe L, Fonseca AP. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* 84(2):167–73, 2011.
40. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* 49(10):789–98, 2004.
41. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40(2):175–9, 2000.
42. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, BeacheyEH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6):996–1006, 1985.
43. Hawser S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J Med Vet Mycol* 34:407–410, 1996.
44. Pannanusorn S, Fernandez V, Römbling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* 56(3):264–72, 2013.
45. Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Ye J, Tsang PWK, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS* 114(4):298–306, 2006.
46. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 80(3):903–908, 2001.
47. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Lopez-Ribot JL. Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. *Mycopathologia* 168(3):101–9, 2009.
48. Dag I, Kiraz N, Oz Y. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical *Candida* isolates. *African J Microbiol Res* 4(24):2763–2768, 2010.
49. Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap Ö. Hastane Kaynaklı *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu Ve Antifungal Duyarlılık Paternleri. *Mikrobiyol Bült* 41:261–269, 2007.

50. Fera MT, LA Camera E, De Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(8):981–98, 2009.
51. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*.7(1),107-119,2009.
52. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 50(9):2846–56, 2012.
53. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol* 49(3):845–50, 2011.
54. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 53(2):383–5, 2004.
55. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 71(8):4333–4340, 2003.
56. Schinabeck MK, Long LA, Mohammad A, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA, Hossain MA, Mohamed S. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: Liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1727–1732, 2004.
57. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50(11):3839–46, 2006.
58. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol* 41(1):506–508, 2003.
59. Tellier R, Krajden M, Grigoriew G, Campbell I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 36(8):1619–25, 1992.
60. Nweze EI, Ghannoum A, Chandra J, Ghannoum MA, Mukherjee PK. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 67(1):149–53, 2012.

61. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley Jr FL, Ramage G, Lopez-ribot JL. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 3(9):1494–1500, 2008.
62. Allan ND, Omar A, Harding MW, Olson ME. A rapid, high-throughput method for culturing, characterizing and biocide efficacy testing of both planktonic cells and biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Formatex, 864-871, 2011. Erişim: (<http://www.formatex.info/microbiology3/book/864-871.pdf>) Erişim tarihi 06/07/2014
63. Harrison H. Applications D. Instructions. The MBEC, High-throughput (HTP) Assay. *Innovotech* 1–16. Erişim: (http://www.innovotech.ca/MBEC_HTPInstructions_Rev1.pdf) Erişim tarihi: 06/07/2014
64. Pantanella F, Berlutti F, Passeri D, Sordi D, Frioni A, Natalizi T, Terranova ML, Rossi M, Valenti P. Quantitative evaluation of bacteria adherent and in biofilm on single-wall carbon nanotube-coated surfaces. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2011:1–9, 2011.
65. Frioni A, Natalizi T, Tendini M, Fraveto A, Pantanella F, Berlutti F, Pietropaoli M, Passeri D, Terranova ML, Rossi M, Valenti P. Biotimer assay for counting bacterial biofilm. *Proc a CIBS Minisymph* (June):1–9, 2010.
66. Egervärn M, Lindmark H, Roos S, Huys G, Lindgren S. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 51(1):394–6, 2007.
67. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet J-B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 61(4):869–76, 2008.
68. De Prijck K, De Smet N, Honraet K, Christiaen S, Coenye T. Formation by antimycotics released from modified polydimethylsiloxane. *Mycopathologia*; 169: 167-74, 2010.
69. Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 107:669–672, 2009.
70. Bruzual I, Riggle P, Hadley S, Kumamoto CA. Biofilm formation by fluconazole-resistant *Candida albicans* strains is inhibited by fluconazole. *J Antimicrob Chemother* 59(3):441–450, 2007.
71. Krzyşciak P. Quantitative evaluation of biofilm formation in yeast nitrogen base (YNB) broth and in bovine serum (BS) of *Candida albicans* strains isolated from mucosal infections. *Wiadomoşci Parazyto* 157(2):107–10, 2011.

72. Soustre J, Rodier M-H, Imbert-Bouyer S, Daniault G, Imbert C. Caspofungin modulates in vitro adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. J Antimicrob Chemother 53(3):522–5, 2004.
73. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard—Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
74. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. Nat Protoc 5(7):1236–54, 2010.
75. Grant-bio, Densitometer, DEN-1 Operating instructions, Version 3 - April 2011. Erişim:(<http://www.ankyralab.com/images/products/DEN1en.pdf>). Erişim tarihi:06/07/2014
76. Thys S. Effect of biosurfactants isolated from endophytes on biofilm formation by *Candida albicans*. Eerste Master in de Farmaceutische Zorg, Universite Gent, Lab voor Farm Microbiol, Novara, 2009.
77. Onurdağ FK, Özgen S, Abbasoğlu U, Gürcan İS. Planktonik formlarının antifungal ajanlara karşı İn vitro duyarlılıklarının araştırılmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült 44:619–631, 2010.
78. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. FEMS Microbiol Lett 272(2):172–81, 2007.
79. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. Selçuk Tıp Dergisi, 28(3): 149–151, 2012.
80. Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee Se J, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. Antimicrob Agents Chemother 51(4):1520–1523, 2007.
81. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother 39 (9):2128–31, 1995.
82. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 57:277–281, 2007.
83. Simitopoulou M, Peshkova P, Tasina E, Katragkou A, Kyrpitzis D, Velegraki A, Walsh TJ, Roilides E. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less

- common bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 57(6):2562–70, 2013.
84. Jacobson MJ, Steckelberg KE, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of micafungin against planktonic and sessile *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6):2638–9, 2009.
 85. Jacobson MJ, Piper KE, Nguyen G, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of anidulafungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 52(6):2242–3, 2008.
 86. Cocuau C, Rodier M-H, Daniault G, Imbert C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 56(3):507–12, 2005.
 87. Ramage G, Vandewalle K, Bachmann SP, Wickes BL, Lo L. In Vitro Pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11):3634–3636, 2002.
 88. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 34(9):737–51, 2011.
 89. Ghannoum MA, Filler SG, Ibrahim AS, Fu Y, Jr JEE. Modulation of interactions of *Candida albicans* and endothelial cells by fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 36(10):2239–2244, 1992.
 90. Schadow KH, Simpson WA, Christensen GD. Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J Infect Dis* 157(1):71-77, 1988.
 91. Wu Q, Wang Q, Taylor KG, Doyle RJ, Wu Q, Wang QI. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* 177(5), 1399–1401, 1995.
 92. Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NAR. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* 4(4):e1000040, 2008.