

Üriner *Candida* İzolatlarının Biyofilm Yapabilme Özelliğinin Üriner Kateter Kullanımı ile İlişkisinin Araştırılması ve Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Durumunun Değişimi*

Investigation of the Correlation Between Biofilm Forming Ability of Urinary *Candida* Isolates with the Use of Urinary Catheters and Change of Antifungal Susceptibility in the Presence of Biofilm

Hacer ASLAN, Dolunay GÜLMEZ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş (Proje Kodu: 014 D02 101 008-456) ve çalışma verilerinin bir kısmı 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri'nde (1-3 Nisan 2016, İstanbul) sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 05.02.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.03.2016

ÖZ

İdrar yolu enfeksiyonlarında etken olan *Candida* türlerinin sıklığı artış göstermekte, bu durum yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere nozokomiyal idrar yolu enfeksiyonlarında öne çıkmaktadır. Mantarın virülansına katkıda bulunan biyofilm oluşturma yeteneği, özellikle biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonların patogeneğinde rol oynamakta ve tedavi başarısızlığı için risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, üriner kateteri olan ve olmayan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında biyofilm oluşturma yeteneğinin karşılaştırılması ve biyofilm varlığında antifungal duyarlılıktaki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, üriner kateteri olan hastalara ait idrar kültürlerinden izole edilen 25 (10 *C.tropicalis*, 6 *C.glabrata*, 4 *C.albicans*, 4 *C.parapsilosis*, 1 *C.krusei*) ve olmayan hastalara ait 25 (8 *C.tropicalis*, 6 *C.albicans*, 4 *C.krusei*, 3 *C.parapsilosis*, 2 *C.kefyr*, 1 *C.glabrata*, 1 *C.lusitaniae*) olmak üzere toplam 50 *Candida* suşu alınmıştır. Biyofilm oluşturma yeteneği Kongo kırmızılı agar (KKA) ve mikroplakta XTT [2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid] indirgenmesi yöntemleriyle araştırılmıştır. Flukonazol (FLU) ve amfoterisin B (AMP-B) duyarlılıkları, planktonik hücrelerde *Clinical and Laboratory Standards Institute* önerilerine uygun olarak referans mikrodilüsyon; biyofilm varlığında ise

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Dolunay Gülmez. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 305 1560, E-posta (E-mail): dolunay@hacettepe.edu.tr

XTT indirgenmesi yöntemiyle saptanmıştır. KKA yöntemi ile suşların 12'sinde (%24), XTT indirgenmesi yöntemiyle ise tümünde (%100) biyofilm oluşumu gösterilmiştir. KKA yöntemi ile test edilen *C.albicans* (n= 10) ve *C.tropicalis* (n= 18) suşlarından hiçbirinde biyofilm pozitifliği saptanamamış; ancak, bu suşlar XTT indirgenmesi yöntemiyle güçlü biyofilm pozitif bulunmuştur. Üriner kateter varlığı ile izolatin biyofilm oluşturma özelliği arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Bu durumun biyofilm oluşturan suşların, daha enfeksiyonun başlangıç aşamasında mesane mukozasına tutunmada avantajlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Tüm suşlar için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, planktonik formda FLU ve AMP-B için klinik direnç sınır değerlerinin veya epidemiyolojik eşik değerlerin altında bulunmuştur. Biyofilm varlığında test edilen izolatların tümü FLU'ya dirençli hale gelmiştir. Benzer şekilde, suşların hiçbirisinde test edilen en yüksek AMP-B konsantrasyonu olan 8 µg/ml ile standart yöntemde MİK tespitinde önerilen %100 inhibisyon sağlanamamıştır. Değerlendirme %80 inhibisyona göre yapıldığında, yalnızca 14'ünde (%28) biyofilm varlığındaki AMP-B MİK değeri türe özgü epidemiyolojik eşik değerinin altında kalmıştır. Sonuç olarak üriner kateter varlığı ile idrar yolu enfeksiyonu etkeni olan *Candida* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği arasında ilişki saptanmamıştır. *Candida* türlerinde biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması için XTT indirgenmesi yönteminin, KKA yöntemine göre daha güvenilir sonuç verdiği gözlenmiştir. Ek olarak, KKA yöntemi ile *C.albicans* ve *C.tropicalis* gibi sık izole edilen türlerde biyofilm pozitifliğinin saptanamaması da dikkati çekmiştir. Test edilen suşların tümünde, biyofilm varlığında FLU etkinliğinin kaybolduğu gözlenmiş; AMP-B ise %100 inhibisyon sağlayamadığı gibi, %80 inhibisyon temel alındığında bile suşa göre değişkenlik göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Candida*; biyofilm; antifungal duyarlılık; idrar yolu enfeksiyonu; üriner kateter.

ABSTRACT

Frequency of *Candida* species causing urinary tract infections is increasing, and this increase is outstanding in nosocomial urinary tract infections especially in intensive care units. The ability of biofilm formation that is contributed to the virulence of the yeast, plays a role in the pathogenesis of biomaterial-related infections and also constitutes a risk for treatment failure. The aims of this study were to compare biofilm forming abilities of *Candida* strains isolated from urine cultures of patients with and without urinary catheters, and to investigate the change of antifungal susceptibility in the presence of biofilm. A total of 50 *Candida* strains isolated from urine cultures of 25 patients with urinary catheters (10 *C.tropicalis*, 6 *C.glabrata*, 4 *C.albicans*, 4 *C.parapsilosis*, 1 *C.krusei*) and 25 without urinary catheters (8 *C.tropicalis*, 6 *C.albicans*, 4 *C.krusei*, 3 *C.parapsilosis*, 2 *C.kefyr*, 1 *C.glabrata*, 1 *C.lusitaniae*) were included in the study. Biofilm forming ability was tested by Congo red agar (CRA) and microplate XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] reduction methods. Fluconazole (FLU) and amphotericin B (AMP-B) susceptibilities of the isolates were determined by reference microdilution method recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute for planktonic cells and by XTT reduction assay in case of biofilm-presence. Biofilm formation was detected in 12 (24%) by CRA and 50 (100%) of the isolates by XTT reduction method. None of the *C.albicans* (n= 10) and *C.tropicalis* (n= 18) strains were detected as biofilm positive by CRA, however, these strains were strongly positive by XTT reduction method. No statistically significant correlation was detected between the presence of urinary catheter and biofilm forming ability of the isolate ($p > 0.05$). This might be caused by the advantage of biofilm forming strains in adhesion to bladder mucosa at the initial stages of infection. For all of the isolates in planktonic form, minimum inhibitory concentration (MIC) values were below the clinical resistance breakpoints or epidemiological cut-off values. When tested in presence of biofilms, all the isolates became resistant against FLU. Similarly, 100% inhibition, which is recommended in the standard method to determine AMP-B MIC, could not be obtained in any of the isolates with the highest dilution 8 µg/ml AMP-B tested. When evaluation was performed according to 80% inhibition, only 14 (28%) of the isolates had an AMP-B MIC below species-specific epidemiological cut-off values in the presence of biofilm. As a result, no correlation between urinary catheters and biofilm formation ability of *Candida* isolates were detected. XTT reduction method was considered as more reliable than CRA for investigating

biofilm formation of *Candida* species. In addition, CRA failed to detect biofilm formation in frequently isolated species such as *C. albicans* and *C. tropicalis*. Fluconazole activity was lost, while AMP-B could not provide 100% inhibition in presence of biofilm for all isolates tested. Even if 80% inhibition was taken into account, AMP-B activity was still variable according to strain.

Keywords: *Candida*; biofilm; antifungal susceptibility; urinary tract infections; urinary catheter.

GİRİŞ

Candida türleri, sağlıklı bireylerde mikrobiyota elemanı olabilen ve uygun koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilen mantarlardır. Mantarın fırsatçı enfeksiyon oluşturma sürecinde, hastaya bağlı risk faktörlerinin yanında mantarın virülans özellikleri de önemli bir yere sahiptir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanımı, alta yatan hastalıkların bulunması, hastanın yaşı ve vücutta tıbbi cihaz varlığı konağa bağlı risk faktörleri arasında iken; adezinler, hidrolitik enzimler, dimorfizm ve biyofilm oluşturma yeteneği mantara bağlı patojenite faktörleri arasında yer almaktadır. Biyofilm oluşturma yeteneği, özellikle biyomateryaller ile ilişkili enfeksiyonlarda önem taşımaktadır^{1,2}. Üriner kateterler de, kateterin yapısal ve yüzeysel koşulları bakımından mikrobiyal biyofilm gelişimine uygun ortam sağlamaktadır².

Biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) kullanılarak biyofilm oluşumunun test edilmesi, mitokondriyal aktiviteyi ölçerek canlı hücre varlığını belirleyebildiği için avantajlı, ancak pahalı bir yöntemdir^{3,4}. Kongo kırmızılı agar (KKA) ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi, öncelikle bakterilerde kullanılmış olmakla birlikte, modifiye hali ile mantarlarda yapılan çalışmalarda da yapım kolaylığı ve ucuzluğu ile ön plana çıkmıştır⁵⁻¹⁰.

Biyomateryale bağlı enfeksiyonların tedavisinde en başarılı yaklaşım olarak biyomateryalin çıkarılması önerilmekteyse de, her hasta için mümkün olamamaktadır. Bazı hastalarda ise biyomateryal çıkarıldıktan sonra bile antifungal tedavi gerekebilmektedir. Bu nedenle, biyofilm varlığında antifungal ilaçların etkinliklerinin iyi bilinmesi tedavi başarısı açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma, idrar örneklerinden izole edilmiş *Candida* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi, üriner kateter varlığının biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkisinin araştırılması ve biyofilm oluşturan suşlarda antifungal ilaçların etkinliklerinin saptanması amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Maya Suşları

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikoloji Laboratuvarında, idrar kültürlerinden izole edilerek tanımlanmış *Candida* suşları dahil edildi. Cins ve tür düzeyinde tanımlama germ tüp testi, mısır unlu Tween 80 agar da (BBL Becton Dickinson, ABD) morfolojik görünüm ve ID32C (BioMerieux, Fransa) sistemi ile yapıldı¹¹. Mikoloji laboratuvarı hasta bilgisi kayıtları incelenerek, üriner kateteri

olan ve olmayan hastalardan izole edilmiş 25'er adet, toplam 50 suş seçildi. Seçilen suşlara ait stok kültürler, -80°C'lik derin dondurucudan çıkarılarak Sabouraud dekstroz agarda (SDA) (BBL, Becton Dickinson, ABD) 37°C'de üretildi ve saflık durumları kontrol edildi. Çalışma öncesinde tek koloni pasajları yapıldı ve üretilen suşların tür tanımlamalarının doğrulanması için mısır unlu Tween 80 agarda morfolojik görünümleri kontrol edildi. Kateterli hastalardan 10 *C.tropicalis*, 6 *C.glabrata*, 4 *C.albicans*, 4 *C.parapsilosis* ve 1 *C.krusei*; katetersiz hastalardan ise 8 *C.tropicalis*, 6 *C.albicans*, 4 *C.krusei*, 3 *C.parapsilosis*, 2 *C.kefyr* ve birer *C.glabrata* ve *C.lusitaniae* suşu çalışmaya dahil edildi.

Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm oluşturma özellikleri iki farklı yöntem ile test edildi.

a) Kongo kırmızılı agar (KKA) yöntemi

KKA, önceki çalışmalarda önerilene benzer olarak, mantarlar için modifiye edilen şekilde hazırlandı^{5,6}. Bunun için 37 g/L beyin kalp infüzyon buyyonu, 10 g/L agar ve 80 g/L glukoz distile su içinde homojenize edildi. Kongo kırmızısının sudaki çözeltisi 0.8 g/L olacak şekilde hazırlandı. İki çözelti, otoklavda 1 atm basınç altında 121°C de 15 dakikada ayrı ayrı steril edildi. Her iki karışım otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklıkları 55°C'ye düşene kadar su banyosunda bekletildi ve sonra karıştırılarak steril petrilere dağıtıldı. Test edilecek *Candida* suşunun SDA'da hazırlanan bir gecelik taze kültüründen bir öze dolusu alınarak KKA yüzeyine ekildi ve plaklar 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben üreyen maya kolonilerinin renkleri incelenerek görsel değerlendirme yapıldı. Bu değerlendirmeye göre koloniler siyah ve bordo ise mikroorganizma biyofilm pozitif; kırmızı, pembe ve beyaz ise biyofilm negatif kabul edildi. Biyofilm pozitif kabul edilen mayaların koloni rengi siyah ise "güçlü", bordo-siyah ise "orta dereceli", bordo ise "zayıf" biyofilm oluşumu olarak değerlendirildi. Tüm suşlar için 24 saat sonunda ön değerlendirme ve 48 saat sonunda asıl sonuç değerlendirmesi yapıldı. Deney üç kez tekrar edildi ve elde edilen sonuçların uyumu karşılaştırıldı.

b) 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) indirgenme yöntemi

Bu yöntemde 96 çukurlu mikroplaklar kullanıldı. Mikroplakta biyofilm varlığı, Pierce ve arkadaşlarının³ tanımladığı yöntemin modifiye edilmesiyle araştırıldı. Test edilecek suşlar, maya pepton dekstroz (yeast peptone dextrose; YPD) besiyerinde üretildi; önceden steril RPMI 1640 besiyeri konmuş mikroplak çukurlarına ekildi ve uygun koşullarda inkübe edildi. Üreme aşamasının ardından, çukurlar 200 µl'lik fosfatlı tampon (PBS) ile üçer kez yıkandı ve biyofilm oluşturarak çukur yüzeyine tutunamayan maya hücrelerinin uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işleminden sonra yapılan görsel değerlendirmede, çukurların taban kısmında tabaka oluşumu biyofilm varlığı lehine yorumlandı. Sonuçlar ayrıca, XTT kullanılarak spektrofotometrik olarak da değerlendirildi. Mikroplaktaki her kuyucuğa 100 µl XTT/menadion solüsyonu eklendi. Plaklar alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Her kuyucuktan 80 µl alınarak temiz düz tabanlı mikroplağa aktarıldı. Plaklar 492 nm dalgaboyunda ölçüm yapan spektrofotometrede okutularak absorbans

ölçüldü ve optik dansite (OD) belirlendi. Kalite kontrol için her çalışmada biyofilm yapan standart suş olan *C.albicans* MYA 274, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde Christensen ve arkadaşlarının¹² çalışması temel alındı. Bunun için: (1) Her kuyucuktan elde edilen OD değerinden negatif kontrol kuyucuğunun OD değeri çıkarılarak test değeri hesaplandı. (2) Her suş için üç test değerinin ortalaması sonuç değeri olarak alındı. (3) Negatif kontrol kuyucuklarının OD değerlerinin ortalamasına üç standart sapma eklenerek sınır değer hesaplandı. (4) Sonuç değeri, sınır değer ile karşılaştırılarak aşağıdaki şekilde değerlendirme yapıldı:

- Negatif: Suşa ait sonuç değeri < Sınır değer
- Zayıf pozitif: Sınır değer < Suşa ait sonuç değeri < 2 x Sınır değer
- Orta derecede pozitif: 2 x Sınır değer < Suşa ait sonuç değeri < 4 x Sınır değer
- Güçlü pozitif: Suşa ait sonuç değeri > 4 x Sınır değer

Antifungal Duyarlılığın Belirlenmesi

a) Planktonik hücrelerin antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi

Suşların antifungal duyarlılık testleri, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A3 kılavuzu önerilerine uygun olarak referans mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirildi¹³. Bu yöntem, planktonik hücrelerin test edilmesi için standart uygulamaları içermektedir. Kalite kontrolü için, her çalışmada *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 standart suşları kullanıldı. Tüm suşlar için flukonazol (FLU) ve amfoterisin B (AMP-B) minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlendi. *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* için elde edilen flukonazol MİK değerleri CLSI M27-S4¹⁴ önerilerine göre değerlendirildi. Diğer türler için FLU ve *C.kefyr* dışındaki tüm türler için AMP-B sonuçları, Pfaller ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmasında önerilen epidemiyolojik sınır değerler ile karşılaştırıldı. *C.kefyr* için önerilen AMP-B sınır değeri bulunmadığından, test edilen diğer türlerin çoğunluğundaki ortak epidemiyolojik eşik değer olan ≤ 2 µg/ml sınır olarak alındı¹⁵.

b) Biyofilm varlığında antifungal duyarlılığın belirlenmesi

Biyofilm varlığında antifungal duyarlılık, Pierce ve arkadaşlarının³ daha önce bildirdiği XTT ile duyarlılık saptama yöntemi kullanılarak belirlendi. Her suş için FLU ve AMP-B etkinliği test edildi. Her test için mikropakta iki sıra kullanıldı ve her suş iki kez test edildi. Kalite kontrol için her çalışmaya *C.albicans* MYA 274, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 standart suşları eklendi. MİK değerleri saptanırken, FLU için referans yöntemde önerilen %50 inhibisyon sağlayan değer MİK değeri olarak alındı¹³. AMP-B için ise, referans yöntemde önerilen şekilde %100 inhibisyon sağlayan değer ve literatür ile karşılaştırmaya olanak vermesi için %80 inhibisyon sağlayan değer olarak iki farklı MİK değeri belirlendi^{4,13,16}.

İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçlar için, gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

KKA testi sonuçlarına göre 12 (%24) suş biyofilm pozitif, 37 (%74) suş negatif bulunmuş; bir *C.parapsilosis* izolatu ise bu besiyerinde ürememiştir. Sonuçların tekrarlanabilirliğinde sorun gözlenmemiştir. Üriner kateteri olan ve olmayan hastalardan elde edilmiş suşlarda KKA'da üreme özelliğine göre biyofilm özelliği Tablo I'de özetlenmiş, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile tüm suşlarda biyofilm varlığı gösterilmiştir (Tablo I). Biyofilm yapma yeteneğinin gücü değerlendirildiğinde biyofilm oluşturma özelliği bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Kateterli ve katetersiz hastalardan elde edilen suşların her biri için KKA'da üreme özelliği ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre elde edilen biyofilm yeteneği sonuçlarının karşılaştırılması Tablo II'de verilmiştir. XTT indirgenmesi deneyi ile güçlü biyofilm pozitifliği saptanan 46 suşun 36'sında KKA yöntemiyle biyofilm varlığı saptanamamış ve bu durum iki yöntem arasında uyum olmadığını göstermiştir.

Biyofilm yeteneğini belirlemede kullanılan iki yöntemle elde edilen sonuçların *Candida* türlerine göre dağılımı Tablo III'de verilmiştir. En sık görülen iki tür olan *C.tropicalis* ve *C.albicans* suşlarının tümünde KKA yöntemi ile negatif sonuç alınırken, XTT indirgenmesi deneyi ile güçlü pozitif biyofilm geliştiği görülmüştür.

Çalışmada test edilen *C.glabrata* dışındaki türlere ait tüm suşlar FLU'ya duyarlı, *C.glabrata* suşlarının tamamı ise doza bağlı duyarlı bulunmuştur. Tüm suşlarda AMP-B MİK değerinin epidemiyolojik sınır değerinin altında olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, FLU'nun *Candida* biyofilmlerinde etkinliğinin olmadığı gözlenmiş, biyofilm varlığında suşlara ait MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri $> 64 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır.

Tablo I. Kongo kırmızılı agar (KKA)'da üreme özelliği ve XTT indirgenmesi yöntemine göre üriner kateteri olan ve olmayan hastalardan izole edilen *Candida* suşlarında biyofilm yeteneği

Biyofilm yeteneği		Kateterli hasta izolatları (n)	Katetersiz hasta izolatları (n)	Toplam (n)
KKA'da üreme özelliğine göre	Güçlü	0	1	1
	Orta	2	5	7
	Zayıf	4	0	4
	Negatif	19	18	37
	Üremeyen	0	1	1
	Toplam	25	25	50
XTT indirgenmesi deneyine göre	Güçlü	23	23	46
	Orta	1	2	3
	Zayıf	1	0	1
	Toplam	25	25	50

Tablo II. *Candida* suşlarında Kongo kırmızılı agar (KKA)'da üreme ve XTT indirgenmesi yöntemi ile elde edilen biyofilm yeteneği sonuçlarının karşılaştırılması

KKA'da üreme özelliğine göre biyofilm yeteneği (n)	XTT indirgenmesi deneyine göre biyofilm yeteneği (n)				
	Güçlü	Orta	Zayıf	Negatif	Toplam
Güçlü pozitif	1	0	0	0	1
Orta pozitif	6	1	0	0	7
Zayıf pozitif	2	1	1	0	4
Negatif	36	1	0	0	37
Üremeyen	1	0	0	0	1
Toplam	46	3	1	0	50

Tablo III. Farklı *Candida* türlerinde Kongo kırmızılı agar ve XTT indirgenmesi yöntemleriyle saptanan biyofilm yeteneği sonuçlarının karşılaştırılması

Candida türü (n)	KKA yöntemi					XTT indirgenmesi deneyi		
	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif	Negatif	Üremedi	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
<i>C.albicans</i> (10)	0	0	0	10	0	10	0	0
<i>C.tropicalis</i> (18)	0	0	0	18	0	18	0	0
<i>C.glabrata</i> (7)	0	1	3	3	0	6	1	0
<i>C.parapsilosis</i> (7)	0	2	1	3	1	5	1	1
<i>C.krusei</i> (5)	1	3	0	1	0	5	0	0
<i>C.keyfr</i> (2)	0	1	0	1	0	1	1	0
<i>C.lusitaniae</i> (1)	0	0	0	1	0	1	0	0
Toplam (50)	1	7	4	37	1	46	3	1

Sadece iki suş için MİK değerleri 64 µg/ml'nin altında (bir *C.albicans* ve bir *C.tropicalis* için sırasıyla 16 µg/ml ve 32 µg/ml) olmakla birlikte, tüm suşlar için tespit edilen MİK değerleri direnç sınır değerinden oldukça yukarıda izlenmiştir. Flukonazole doğal dirençli olan *C.krusei* suşlarında bile biyofilm varlığında MİK değerlerinde artış saptanmıştır.

Biyofilm varlığında AMP-B ile hiçbir suş için %100 inhibisyon gözlenmemiş ve tüm suşlar için MİK > 8 µg/ml bulunmuştur. Bununla beraber, %80 inhibisyon sağlayan AMP-B konsantrasyonları göz önüne alındığında, suşların 14'ünde (%28) epidemiyolojik sınır değerinin altında olduğu görülmüş; MİK₅₀ değeri 8 µg/ml, MİK₉₀ değeri ise > 8 µg/ml olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Candida türleri, insanda normal mikrobiyotaya dahil olmalarına karşın en sık karşımıza çıkan fungal enfeksiyon etkenleridir. Bu durum, konak faktörlerinin yanı sıra etken *Candida* türlerinin virülans faktörlerinden de kaynaklanmaktadır. Biyofilm oluşturma yeteneği *Candida*'ya ait virülans faktörleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Biyofilm üretimi,

özellikle yabancı cisim varlığında, antimikrobiyal tedaviye dirençli kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedir¹⁷.

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) etkenleri arasında *Candida* türlerinin sıklığı gittikçe artmaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonlarında sıklığı artan *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonların, yoğun bakım ünitelerinde *Escherichia coli*'nin ardından ikinci sıraya yerleştiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır¹⁷⁻¹⁹. Kandidüri olgularının büyük bir kısmı, antibiyotik kullanımı ve kateter varlığı ile ilişkili görülmektedir. Kateter vücuda yerleştirildikten kısa bir süre sonra biyofilm oluşumu gözlenmekte ve bu durum antifungal tedavinin başarısı için sorun oluşturmaktadır^{17,19}. Üriner kateter kullanımı durumunda, kateterin yapısal ve yüzeysel koşulları bakımından mikrobiyal biyofilm gelişimine uygun ortam oluşturduğu bilinmektedir². Kan dolaşımı enfeksiyonlarından farklı olarak, İYE'de kaynak kateter olmasa bile enfeksiyon etkeninin kateter ile ilişkisi kaçınılmazdır. Bu nedenle, çalışmamız planlanırken idrar izolatları seçilmiş, üriner kateteri olan ve olmayan iki hasta grubu alınmıştır.

Biyofilm oluşturma yeteneğinin saptanması için farklı yöntemler kullanılabilir. Bu çalışmada iki farklı yöntem ile değerlendirme yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. KKA'da üreme özelliğinin değerlendirilmesi, biyofilm yeteneğinin saptanması için basit, ucuz, hızlı sonuç veren ve kolay değerlendirilen bir yöntemdir⁶⁻¹⁰. Ancak, sonuçların görsel olarak değerlendirilmesi yorum farkına neden olabilmektedir. Ayrıca değerlendirme için kullanılan renk skalası, çalışmalarda farklılık gösterebilmektedir⁶⁻¹⁰. Bu durum, farklı çalışmalara ait sonuçların karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. Suşların üreme hızları türe ve suşa göre değişebilmekte, bazı suşların üremesi için 48 saatten uzun süreli inkübasyon gerekmektedir. Bu süre içinde besiyerlerinin rengi kırmızıdan siyaha dönüşmekte ve değerlendirmenin sağlıklı yapılmasına engel oluşturmaktadır. Ek olarak, bazı suşlar bu besiyerinde ürememekte ve bu nedenle değerlendirme yapılamamaktadır. Bizim çalışmamızda da bazı dezavantajlar gözlenmiştir. Çalışmaya alınan 50 suşun yalnızca 12'sinde KKA yöntemi ile biyofilm pozitifliği saptanabilmiş, bir suş bu besiyerinde üreyemediği için değerlendirme yapılamamıştır. Çalışmamızda kullanılan ikinci yöntem ise mikrop-lakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesidir. Bu yöntem, ortamdaki planktonik hücreler uzaklaştırıldığında yalnızca biyofilm içindeki canlı hücrelerin tespitine olanak sağladığı için avantajlıdır^{3,4}. Ancak, yöntemin uygulanabilmesi için temel teknik beceriler gerekmekte ve XTT'nin maliyeti yüksek olabilmektedir. Ayrıca suşun metabolik özelliklerine göre ve inokulum miktarının dikkatli ayarlanmaması durumunda sonuçlar etkilenebilmektedir. Hızlı, basit, tekrarlanabilir bir test olması ve değerlendirmenin kişisel yorumlardan etkilenmeyecek şekilde spektrofotometrik olarak yapılması yöntemin avantajlarıdır^{3,4}. Bizim çalışmamızda, XTT indirgenmesi deneyi ile tüm suşlarda biyofilm yeteneği saptanabilmiştir. Ayrıca, KKA yöntemi ile biyofilm negatif bulunan 37 suşun 36'sında güçlü, birinde ise orta derecede biyofilm pozitifliği gözlenmiştir (Tablo II). Bu durum, *Candida* suşlarında biyofilm yeteneğinin araştırılması için XTT indirgenmesi deneyinin daha güvenilir bir yöntem olduğunu ve KKA yönteminin uygun olmadığını düşündürmektedir. Buna ilaveten, enfeksiyon etkeni olarak sık karşılaşılan iki tür olan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için KKA yöntemi ile biyofilm oluşturma yeteneği saptanamamış, ancak XTT indirgenmesi deneyi ile güçlü pozitiflik gözlenmiştir (Tablo III). Genellikle farklı besiyerlerinde üremelerinde sorun olmayan bu iki tür için KKA yöntemi yetersiz kalmıştır.

Her iki yöntem ile kateteri olan ve olmayan hastalardan izole edilen suşların biyofilm yeteneği arasında fark saptanmamıştır. XTT indirgenmesi yöntemi ile çalışmaya alınan tüm suşlarda biyofilm varlığının gösterilmesi de hesaba katıldığında, üriner enfeksiyon gelişiminde, patojenin biyofilm yapma yeteneğinin, hastada üriner kateter varlığından bağımsız olarak bir avantaj sağladığını düşündürmüştür. Mesane mukozasına tutunma aşamasında biyofilm yapımının avantaj sağladığını bildiren çalışmalar bunu desteklemektedir²⁰⁻²³.

Çalışmamızdaki tüm suşlar için test edilen iki antifungale ait MİK değerlerinin, klinik veya epidemiyolojik sınır değerlerini aşmadığı görülmüştür. Bu suşlar, hastaların kateter kullanım durumuna göre seçildiği için, belirli bir grup veya döneme ait direnç durumunu temsil etmemektedir. Henüz *Candida* için bildirilen antifungal direnç oranları düşük olmasına karşın, son yıllarda mantar enfeksiyonlarının sıklığının ve antifungal tedavi gereksiniminin artması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasını ve yaygınlaşmasını kolaylaştırmaktadır²⁴⁻²⁶.

Candida enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biri olmakla birlikte, FLU'nun biyofilm varlığında etkin olmadığı bilinmektedir^{4,16,27}. Flukonazol, bizim çalışmamıza kontrol amaçlı olarak dahil edilmiş ve sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Biyofilm varlığında, tüm suşlar için MİK değerlerinin klinik veya epidemiyolojik sınır değerinden oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Amfoterisin B etkinliğinin ise biyofilm varlığında değişken olduğu farklı çalışmalarda rapor edilmiştir^{4,16}. Amfoterisin B için standart MİK değeri %100 inhibisyon ilkesine göre belirlenmektedir¹³. Bizim çalışmamızda AMP-B ile hiçbir suş için %100 inhibisyon gözlenmemiştir. Bununla beraber, literatürde örneği görülen şekilde^{4,16} %80 inhibisyon sağlayan AMP-B konsantrasyonlarına bakıldığında, suşların sadece 14'ünde (%28) epidemiyolojik sınır değerinin altında olduğu görülmüştür. Amfoterisin B'nin lipidli formlarının biyofilmlere daha etkili olabildiği bildirilmişse de, çalışmamızda lipidli formlar test edilmemiştir²⁷.

Sonuç olarak, kısıtlı sayıda üriner *Candida* izolatu ile çalışılmış olmakla birlikte, üriner kateter varlığının kandidüri için bir risk faktörü olduğu gösterilememiştir. Bulgularımız, biyofilm üretme yeteneğinin, kateterden bağımsız olarak, etkenin mukozaya tutunmasını kolaylaştırarak üriner enfeksiyona yol açabileceğini işaret etmektedir. Çalışmamızda ayrıca, *Candida* suşlarında biyofilm yeteneğinin saptanması için XTT yönteminin daha güvenilir olduğu gözlenmiş; biyofilm varlığında FLU'nun etkinlik göstermediği doğrulanmış ve literatürde biyofilmlere karşı etkinliğinin suşa göre değişkenlik gösterdiği belirtilen AMP-B'nin, hiçbir suşta fungusidal etki sağlayamadığı izlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics* 1999; 103(4):e39.
2. Tenke P, Kovacs B, Jackel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 2006; 24(1): 13-20.
3. Pierce CG, Uppuluri P, Tummala S, Lopez-Ribot JL. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp* 2010; 21(44): e2287.
4. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(9): 2475-9.
5. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42(8): 872-4.

6. Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ. *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17(1): 67-70.
7. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş ve ark. İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-albicans *Candida* suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2009; 39(3-4): 62-8.
8. Birinci A, Çekiç Cihan Ç, Bilgin K, Acuner Ç, Durupınar B. *Candida* türlerinde slime üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35(3): 163-6.
9. Saxena N, Maheshwari D, Dadhich D, Singh S. Evaluation of Congo Red Agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates. *J Evolution Med Dent Sci* 2014; 3(59): 13234-8.
10. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17(4): 471-81.
11. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 2011, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 996-1006.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. CLSI Document M27-A3. 2008, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI Document M27-S4, 2012. CLSI, Wayne, PA.
15. 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* 2012; 50(9): 2846-56.
16. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3234-40.
17. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 499-511.
18. Laupland KB, Bagshaw SM, Gregson DB, et al. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Crit Care* 2005; 9(2): R60-5.
19. Padawer D, Pastukh N, Nitzan O, et al. Catheter-associated candiduria: Risk factors, medical interventions, and antifungal susceptibility. *Am J Infect Control* 2015; 43(7): e19-22.
20. Lyman CA, Navarro E, Garrett KF, et al. Adherence of *Candida albicans* to bladder mucosa: development and application of a tissue explant assay. *Mycoses* 1999; 42(4): 255-9.
21. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2009; 4(11): e7967.
22. Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL Jr, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010; 156(Pt 12): 3635-44.
23. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(4): 380-5.
24. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G. Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2013; 27(1): 25-30.
25. Yüksekaya S, Fındık D, Arslan U. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 137-49.
26. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1366-77.
27. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1773-80.