

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİFUNGAL-DAPTOMİSİN KOMBİNASYONLARININ *CANDİDA ALBİCANS*
STAPHYLOCOCCUS EPİDERMİDİS BİYOFİLMİNE, ANTİFUNGAL-
MEROPENEM KOMBİNASYONLARININ *CANDİDA ALBİCANS*-
PSEUDOMONAS AERUGİNOSA BİYOFİLMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Agim OSMANİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2020

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİFUNGAL-DAPTOMİSİN KOMBİNASYONLARININ *CANDIDA ALBİCANS-
STAPHYLOCOCCUS EPİDERMİDİS* BİYOFİLMİNE, ANTİFUNGAL-
MEROPENEM KOMBİNASYONLARININ *CANDIDA ALBİCANS-
PSEUDOMONAS AERUGİNOSA* BİYOFİLMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Agim OSMANİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK 315S187

KOCAELİ
2020

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Antifungal-Daptomisin Kombinasyonlarının *Candida albicans-Staphylococcus epidermidis* Biyofilmine, Antifungal-Meropenem Kombinasyonlarının *Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmine Etkisinin Araştırılması

Tez Yazarı: Agim OSMANİ

Tez Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Bu çalışma, sınav kurumumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

| SINAV KURULU ÜYELERİ | | |
|----------------------|------------|------|
| ÜNVANI | ADI SOYADI | İMZA |
| BAŞKAN (ÜYE) | | |
| DANIŞMAN | | |
| ÜYE | | |
| ÜYE | | |
| ÜYE | | |
| ÜYE | | |

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Antifungal-daptomisin kombinasyonlarının *Candida albicans*-*Staphylococcus epidermidis* biyofilmine, antifungal-meropenem kombinasyonlarının *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* biyofilmine etkisinin araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı, antifungal ajanların (amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin) *C. albicans* biyofilmine etkisini ve bu antifungallerle birlikte daptomisin antibiyotiğinin birlikte kullanımının *C. albicans* ve *S. epidermidis*'in birlikte oluşturduğu biyofilm üzerine; ayrıca bu antifungallerle birlikte meropenem antibiyotiğinin birlikte kullanımının *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'nın birlikte oluşturduğu biyofilm üzerine etkisini araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmada monomikrobiyal (*C. albicans*) ve polimikrobiyal (*C. albicans*'ın *S. epidermidis* veya *P. aeruginosa* ile birlikte) biyofilm miktarının öncelikle XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Biyofilmin mikroskopik olarak incelenmesi inverted mikroskop, floresan mikroskop ve Taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır. *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilmin amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungine karşı MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) ve SMİK (Sesil MİK) değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, *C. albicans* ve *S. epidermidis* biyofilmine test edilen antifungaller ile birlikte daptomisin etkinliği ve *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilmine antifungaller ile birlikte meropenem etkinliği Checkerboard yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Antifungallerin tek başına *C. albicans* biyofilmine etkinliğinin araştırılmasında, biyofilm oluşturmadan önceki MİK değerleri sırasıyla amfoterisin B için 0,5 µg/ml, vorikonazol için 0,25 µg/ml, anidulafungin için 0,25 µg/ml olarak saptanmıştır. Amfoterisin B ve vorikonazol'un biyofilmdeki MİK değeri (%50 SMİK değeri karşılaştırıldığında) planktonik hücrelere göre dört kat fazla bulunmuştur, anidulafungin'de ise bu değerler eşit bulunmuştur. *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilme kıyasla polimikrobiyal biyofilmde azalma ve antifungal etkisi inverted ve floresan mikroskop ile gösterilmiştir.

C. albicans ve *S. epidermidis* biyofilminde antifungallerle birlikte daptomisin kullanımının test edildiği çalışmalar sonucunda, daptomisin amfoterisin B ile birlikte kullanıldığında etkisiz (indiferent) olduğu; vorikonazol ile birlikte kullanıldığında antagonistik; anidulafungin ile birlikte kullanıldığında da antagonistik etkili olduğu saptanmıştır.

C. albicans ve *P. aeruginosa* biyofilminde ise meropenem antibiyotiginin antifungallerle kombinasyonu test edildiğinde amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafunginin tümünün aditif etkisi saptanmıştır. Antifungallerin tek başına veya antibiyotik ile kombinasyonunun biyofilme etkisi Taramalı elektron mikroskobu ile de gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışma sonuçlarımıza göre, *C. albicans* ve *S. epidermidis* biyofilminin varlığında amfoterisin B, daptomisin kullanılacak ise antifungal olarak amfoterisin B tercih edilmesi; *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilmi varlığında ise antifungal tedavisi sırasında antibiyotik olarak meropenem kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, antifungal duyarlılık, *C. albicans*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, inverted, floresan ve taramalı elektron mikroskobu.

ABSTRACT

Investigation of antifungal-daptomycin combination on *Candida albicans*-*Staphylococcus epidermidis* biofilm and antifungal-meropenem combination on *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* biofilm

Objective: The aim of this study is to research the effect of the antifungal agents (amphotericin B, voriconazole and anidulafungin) on the *C. albicans* biofilm, and the effect of the combined use of these antifungals with daptomycin, on the polymicrobial biofilm produced by *C. albicans* and *S. epidermidis*; and the effect of antifungals combined with meropenem on the polymicrobial biofilm produced by *C. albicans* and *P. aeruginosa*.

Method: In the study, the quantification of monomicrobial (*C. albicans*) biofilm and polymicrobial (*C. albicans* with *S. epidermidis* or with *P. aeruginosa*) biofilm was determined by XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) method. The microscopic examination of the biofilm was also performed by fluorescence microscope and scanning electron microscopy. Antifungal susceptibility tests were performed to determine MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and SMIC (sessile MIC) values of amphotericin B, voriconazole, anidulafungin against *C. albicans* mono and polymicrobial biofilm. The effect of daptomycin combination with each antifungals against *C. albicans*-*S. epidermidis* biofilm and the effect of meropenem combination against *C. albicans*-*P. aeruginosa* biofilm were tested by Checkerboard analysis.

Results: MIC values of *C. albicans* biofilm alone against amphotericin B, voriconazole and anidulafungin prior to biofilm formation, were 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml and 0,25 µg/ml, respectively. When 50% SMIC values in biofilm were compared, the values of amphotericin B and voriconazole were found to be four times higher than those of planktonic cells, whereas the values of anidulafungin were found to be equal. Compared to the monomicrobial biofilm formed by *C. albicans* alone, the reduction in polymicrobial biofilm and its antifungal effect has been demonstrated by inverted and fluorescent microscopy.

The effect of daptomycin in *C. albicans*-*S. epidermidis* biofilm was determined as indifferent when used with amphotericin B; however, its effect was determined as antagonistic when used in combination with voriconazole or anidulafungin.

When the combination of meropenem with antifungals was tested, in *C. albicans* and *P. aeruginosa* biofilm, an additional effect of meropenem with all antifungals was detected.

The effects of antifungals and combinations with antibiotics were also visualized by scanning electron microscopy.

Conclusions: According to the results of all the tests applied in our project, if there is both *C. albicans* and *S. epidermidis* infections probably due to polymicrobial biofilm formation and daptomycin was planned to be used in the treatment, amphotericin B might be preferred as a choice in the antifungal treatment. Similarly, if there is *C. albicans* and *P. aeruginosa* biofilm formation, meropenem might be preferred as an antibiotic while the patient is under treatment of amphotericin B, voriconazole or anidulafungin treatment.

Keywords: Biofilm, antifungal susceptibility, *C. albicans*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, inverted, fluorescent and scanning electron microscopy.



TEŞEKKÜR

Doktora öğrenim süresince değerli desteğini, toleransını esirgemeyen ve sonsuz bilgi ve önerileriyle eğitimime yol gösterici katkılarda bulunan Sayın tez danışmanım Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi'nde bulunan Hocalarım Sayın Prof. Dr. Devrim DÜNDAR ve Prof. Dr. Ayşe Willke TOPÇU'ya her türlü destekleri ve bu tezin oluşmasına katkı sağlayan motive edici yaklaşımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Taramalı elektron Mikroskopi çalışmalarımızdaki desteklerinden dolayı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Feriha ERCAN'a teşekkürü borç bilirim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hocalarım Sayın Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI, Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Gülden SÖNMEZ TAMER ve Dr. Öğretim Üyesi Erdener BALIKÇI'ya doktora eğitimim süresince verdikleri desteklerinden ve beni asla yabancı gibi hissettirmediklerinden dolayı teşekkür ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UZUNER ve Arş. Gör. Dr. Doğanhan Kadir ER başta olmak üzere, tüm laboratuvar arkadaşlarıma anlayışları ve destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destekleri (Proje No: 315S187) için TÜBİTAK Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime sağladığı burs desteği ile katkıda bulunan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Gösterdikleri insane üstü fedakarlık ve hoşgörüle bu günlere gelmemi sağlayan, koşulsuz desteklerini hep arkamda hissettiğim annem Saniye ve babam Adil (merhum) başta olmak üzere tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

Ve her şeyden öte, aile olduğumuz ilk günden bu güne kadar kahrımı çeken, varlıkları ile hayatıma renk katan, motivasyon kaynaklarım eşim Liridona ve kızlarım Ejona ve Arbana'ya, zorlu doktora eğitimimin sürecinde gösterdikleri sınırsız anlayış, sevgi ve gösterdikleri büyük fedakarlıklar için teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Antifungal-daptomisin kombinasyonlarının *Candida albicans-Staphylococcus epidermidis* biyofilmine, antifungal-meropenem kombinasyonlarının *Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa* biyofilmine etkisinin araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / / 20....

Agim OSMANİ

İmza

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | vi |
| TEŞEKKÜR | viii |
| ORJİNALLİK BİLDİRİMİ | ix |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | xiii |
| ŞEKİLLER..... | xv |
| TABLolar | xviii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Biyofilm..... | 1 |
| 1.1.1. Biyofilm Tarihçesi | 1 |
| 1.1.2. Biyofilm Tanımı | 2 |
| 1.1.3. Biyofilmin Yapısı..... | 2 |
| 1.2. Biyofilmin oluşumu | 3 |
| 1.2.1. Biyofilm Oluşumunun Genel Özellikleri | 3 |
| 1.2.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları | 4 |
| 1.2.3. Bakterilerin Biyofilmde Hücreler Arası İletişimi (Quorum Sensing) | 5 |
| 1.2.4. Biyofilmlerin Klinik Önemi..... | 6 |
| 1.2.5. Biyofilmin Antibiyotiklere ve Konak İmmün Sistemine Karşı Direnci | 12 |
| 1.2.6. Fungal Biyofilm Oluşumu | 14 |
| 1.3. Biyofilm ve Quorum Sensing | 19 |
| 1.4. <i>Candida</i> Biyofilmleri ve Antifungal Direnç | 20 |
| 1.5. Polimikrobiyal Biyofilmler | 22 |
| 1.5.1. <i>Candida</i> ve <i>Staphylococcus</i> türleri Polimikrobiyal Biyofilmi | 23 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.2. <i>Candida</i> ve <i>Pseudomonas</i> Etkileşimleri | 26 |
| 2. AMAÇ | 28 |
| 3. YÖNTEM | 31 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar | 31 |
| 3.2. Biyofilm Oluşum Deneyi Öncesi Besiyerlerinin, Tampon Çözeltilerin ve XTT Maddesinin Hazırlanması | 32 |
| 3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması | 32 |
| 3.2.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması | 34 |
| 3.2.3. Biyofilm Kantitasyonunda Kullanılan XTT Maddesi Hazırlanması | 34 |
| 3.3. Biyofilm Oluşturulması | 36 |
| 3.3.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Oluşturulması | 36 |
| 3.4. Biyofilm Kantitasyonu | 39 |
| 3.4.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Kantitasyonu | 39 |
| 3.5. Antifungal Duyarlılık Testleri | 41 |
| 3.6. Biyofilmin Mikroskopik İncelenmesi | 42 |
| 3.6.1. İverted Mikroskop ile <i>C. albicans</i> Biyofilmi İncelenmesi | 42 |
| 3.6.2. Floresan Mikroskopu ile <i>C. albicans</i> Biyofilmi İncelenmesi | 42 |
| 3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskopu ile Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm İncelenmesi | 42 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz | 43 |
| 4. BULGULAR | 44 |
| 4.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Kantitasyonu | 44 |
| 4.2. Antifungallerin ve Antibiyotiklerin Planktonik MİK Değerlerinin Belirlenmesi | 48 |
| 4.3. <i>C. albicans</i> Biyofilminin Antifungal Duyarlılık Test Sonuçları | 48 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4. Polimikrobiyal Biyofilm Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri | 52 |
| 4.4.1. <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> Polimikrobiyal Biyofilm Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri | 53 |
| 4.4.2. <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Polimikrobiyal Biyofilm Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri | 53 |
| 4.5. Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal/Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi | 54 |
| 4.5.1. <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal ve Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi | 54 |
| 4.5.2. <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi | 58 |
| 4.6. <i>C. albicans</i> Biyofilminin Amfoterisin B Duyarlılığının İverted Mikroskopi ile İncelenmesi | 62 |
| 4.7. Floresan Mikroskobik İncelenmesi | 63 |
| 4.8. Taramalı Elektron Mikroskobik İncelenmesi | 64 |
| 5.TARTIŞMA | 70 |
| 6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... | 81 |
| 7.KAYNAKLAR..... | 82 |
| 8.ÖZGEÇMİŞ..... | 93 |

SİMGELER ve KISALTMALAR

AI: Auto Inducer
AmB: Amfoterisin B
ANF: Anidulafungin
ATCC: American Type Culture Collection
BAP: Biofilm Associated Protein
BHI: Brain Heart Infusion
CA: *C. albicans*
Ca⁺²: Kalsiyum
CFU: Colony Forming Unit
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
DAP: Daptomisin
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM: Extracellular Matrix
eDNA: Ekstraselüler DNA
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPS: Ekzopolisakarid
FIC_i: Fractional Inhibitory Concentration index
g: Gram
KF: Kistik Fibrozis
KKA: Koyun Kanlı Agar
L: Litre
MDR: Multi Drug Resistance
MDi: Metisiline Dirençli
MDu: Metisiline Duyarlı
MER: Meropenem
MFS: Major Facilitator Superfamily
MHA: Müeller-Hinton Agar
mg: Miligram
MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml: Mililitre
µl: Mikrolitre

mM: Milimolar
µm: Mikrometre
µM: Mikromolar
MOPS: MOPS Buffer Powder
NAG: N-asetil glukozamin
OD: Optik Dansitometre
P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa
PA: *P. aeruginosa*
PBS: Phosphate Buffered Saline
PlcR: Pleio Tropic Regulator
Poly B: Polimiksin B
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium (besiyeri)
SAK: Stafilokinaz
SDA: Sabouraud Dextrose Agar
S. epidermidis: Staphylococcus epidermidis
SE: *S. epidermidis*
TEM: Taramalı Elektron Mikroskobu
SMİC: Sesil Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
VAP: Ventilator-Associated Pneumonia
VOR: Vorikonazol
YPD: Yeast Pepton Dekstroz
QS: Quorum Sensing
XTT: 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium

ŞEKİLLER

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. <i>Candida albicans</i> biyofilmi üzerine yayınlanmış makale sayılarının yıllara göre dağılımı ve 1994-1998 yılları arasında Hawser ve Douglas tarafından yapılan ilk <i>in vitro</i> model | 1 |
| Şekil 1.2. Biyofilm oluşum aşamaları | 4 |
| Şekil 1.3. <i>C. albicans</i> biyofilm oluşumunun aşamaları.. | 15 |
| Şekil 1.4. Karışık biyofilm içindeki <i>S. aureus</i> 'un vankomisin'e artmış tolerans mekanizması olarak önerilen bariyer modelinin şematik gösterimi | 25 |
| Şekil 1.5. <i>P. aeruginosa</i> ve <i>C. albicans</i> arasındaki moleküler mekanizmaların etkileşimleri..... | 27 |
| Şekil 3.1. Mikrororganizmaların plakta üremesi (A) <i>C.albicans</i> , (B) <i>S.epidermidis</i> , (C) <i>P.aeruginosa</i> | 31 |
| Şekil 3.2. Mikroorganizmaların flask içerisinde inkubasyonu. | 36 |
| Şekil 3.3. ELISA plaklarında monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilmlerin oluşturulması. | 38 |
| Şekil 3.4. <i>C.albicans</i> biyofilmi yıkama işleminden sonra, gözle görünen kuyucukların (A), aynı kuyucuklar stereo mikroskop görüntüsü (B) | 39 |
| Şekil 3.5. XTT/menadion karışımı eklendikten sonra inkubasyon işlemi. | 40 |
| Şekil 4.1. XTT yöntemi ile biyofilm kantitasyon belirleme çalışmasında <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> ve <i>S. epidemidis</i> 'in tek başına oluşturdukları biyofilm ile <i>C. albicans</i> 'ın her iki bakteri ile beraber oluşturdukları polymikrobiyal biyofilmde oluşan görüntü..... | 45 |
| Şekil 4.2. XTT yöntemi ile belirlenen biyofilm absorbans değerleri. | 47 |
| Şekil 4.3. <i>C. albicans</i> biyofilm üzerinde amfoterisin B duyarlılığı. | 50 |
| Şekil 4.4. <i>C. albicans</i> biyofilm üzerinde vorikonazol duyarlılığı..... | 50 |
| Şekil 4.5. <i>C. albicans</i> biyofilm üzerinde anidulafungin duyarlılığı..... | 51 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.6. <i>C. albicans</i> biyofilmine antifungallerin duyarlılık sonucu. | 51 |
| Şekil 4.7. <i>C. albicans</i> biyofilminin amfoterisin B duyarlılığının XTT yöntemi ile görüntülenmesi (% 50 SMİK: 2 µg/ml; % 80 SMİK: 8 µg/ml).. | 52 |
| Şekil 4.8. <i>C. albicans</i> biyofilminde vorikonazol ve anidulafungin duyarlılığının XTT yöntemi ile görüntülenmesi (vorikonazol için % 50 SMİK: 1 µg/ml, % 80 SMİK: 8 µg/ml; anidulafungin için % 50 SMİK: 0,25 µg/ml; % 80 SMİK: 2 µg/ml).. | 52 |
| Şekil 4.9. <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> polimikrobiyal biyofilminde antifungal/antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi..... | 55 |
| Şekil 4.10. <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> biyofilminde antifungal ile birlikte daptomisin duyarlılığının belirlenmesi. | 57 |
| Şekil 4.11. <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> polimikrobiyal biyofilminde antifungal/antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi..... | 59 |
| Şekil 4.12. <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilminde antifungal ile birlikte meropenem duyarlılığının belirlenmesi. | 61 |
| Şekil 4.13. <i>C. albicans</i> biyofilminin amfoterisin B duyarlılığının inverted mikroskopi ile incelenmesi (40X). | 63 |
| Şekil 4.14. Floresan mikroskopi ile incelemede <i>C. albicans</i> biyofilminin A: (10X); B: (40X); C: (100X) büyütmede görüntüsü. | 63 |
| Şekil 4.15. <i>C. albicans</i> biyofilmi (Floresan Mikroskobik İncelemesi) 100X'lük büyütmede (hif oluşumu). | 64 |
| Şekil 4.16. <i>C. albicans</i> biyofilmi (Floresan Mikroskobik İncelemesi) 100X'lük büyütmede antifungal (amfoterisin B (2 µg/ml), vorikonazol (1 µg/ml) ve anidulafungin (0,25 µg/ml)) etkisinin gösterilmesi..... | 64 |
| Şekil 4.17. <i>C. albicans</i> biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskobik incelenmesi) 500X'lük büyütmede..... | 65 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.18. <i>C. albicans</i> biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 1, 500X'lük büyütmede..... | 65 |
| Şekil 4.19. <i>C. albicans</i> biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede blastosporların görünümü. | 66 |
| Şekil 4.20. <i>C. albicans</i> biyofilminin 2 µg/ml amfoterisin B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 500X'lük büyütmede görüntüsü. | 66 |
| Şekil 4.21. <i>C. albicans</i> biyofilminin 2 µg/ml amfoterisin B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 1,500X'lük büyütmede gösterilmesi. | 67 |
| Şekil 4.22. <i>C. albicans</i> biyofilminin amfoterisin 2 µg/ml B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede gösterilmesi. | 67 |
| Şekil 4.23. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede antifungalsız ve antibiyotiksiz <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> polimikrobiyal biyofilminin görünümü. | 68 |
| Şekil 4.24. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede amfoterisin B ve meropenem ile <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> polimikrobiyal biyofilminin görüntüsü..... | 68 |
| Şekil 4.25. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede antifungalsız ve antibiyotiksiz <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> polimikrobiyal biyofilminin görüntüsü..... | 69 |
| Şekil 4.26. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede amfoterisin B ve daptomisin ile <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> polimikrobiyal biyofilmi..... | 69 |

TABLULAR

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 3.1. RPMI besiyerinin hazırlanması. | 32 |
| Tablo 3.2. Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyerinin hazırlanması. | 33 |
| Tablo 3.3. Brain Heart Infusion (BHI) besiyerinin hazırlanması. | 33 |
| Tablo 3.4. Antimikrobiyal ajanların stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler. | 35 |
| Tablo 3.5. Kullanılan antifungal ve antibiyotik ajanların konsantrasyon aralıkları. | 35 |
| Tablo 4.1. XTT yöntemi ile belirlenen biyofilm absorbans değerleri (Optik densite:OD) ve <i>p</i> değerleri. | 46 |
| Tablo 4.2. <i>C. albicans</i> 'ın test edilen antifungallere karşı planktonik MİK değerleri. | 48 |
| Tablo 4.3. Antibiyotiklerin planktonik MİK değerlerinin belirlenmesi. | 48 |
| Tablo 4.4. <i>Candida albicans</i> 'ın biyofilm oluşturmadan önceki antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan planktonik MİK ve biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki sesil MİK (SMİK) değerleri. | 49 |
| Tablo 4.5. <i>C. albicans</i> biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerlerinin <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerleri ile karşılaştırılması. | 53 |
| Tablo 4.6. <i>C. albicans</i> monomikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerlerinin <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerleri ile karşılaştırılması. | 54 |
| Tablo 4.7. <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> biyofilminde antifungallere ve antifungal ile birlikte daptomisine karşı duyarlılığının belirlenmesi. | 54 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4.8. <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilminde antifungallere ve antifungal ile birlikte meropenem karşı duyarlılığının belirlenmesi..... | 58 |
| Tablo 4.9. Checkerboard analizi ile polimikrobiyal biyofilmlerin antifungal ve antibiyotik kombinasyonuna karşı gösterdikleri etkileşim türleri. | 62 |



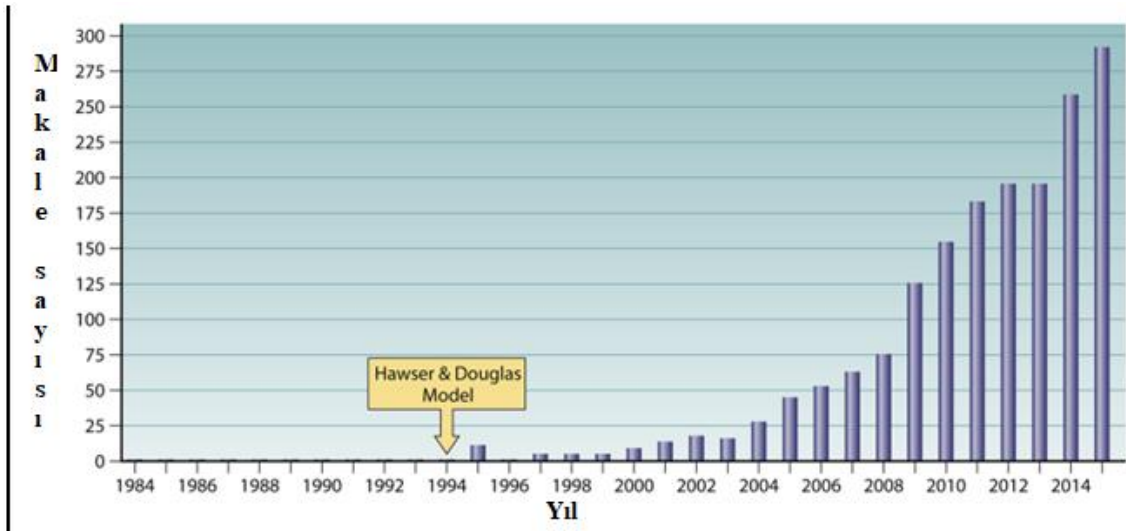
1. GİRİŞ

1.1. Biyofilm

1.1.1. Biyofilm Tarihçesi

Yüzeyle yapışan, dokularda veya sekresyonlarda bulunan, kendiliğinden türemiş bir matriks tarafından çevrelenmiş halde kümelenmiş mikroorganizmaların gözlemlenmesi, ilk kez hem Leeuwenhoek hem de Pasteur tarafından tanımlanmıştır (Dobell, 1960; Pasteur, 1864). Çevre mikrobiyolojisinde de biyofilmlerin gemiler gibi batık yüzeyler üzerindeki biyolojik kirlenmede rollerinin olduğu uzun yıllar önce bildirilmiştir (Zobell & Allen, 1935). Biyofilm enfeksiyonlarının Tıp alanındaki önemi ise 1970'lerin başında kronik olarak enfekte kistik fibrozlu hastalardan alınan balgam ve akciğer dokusunda *Pseudomonas aeruginosa* hücre yığınlarının gözlemlenmesiyle başlamıştır (Bjarnsholt ve ark., 2009).

Biyofilm terimi 1985 yılında J. W. Costerton tarafından Tıp literatürüne sokulmuştur. Takip eden yıllarda ise biyofilm ile ilgili araştırma makalelerinin ve biyofilm saptama yöntemlerinin sayısında hızlı bir artış görülürken klinikte biyofilm enfeksiyonlarının yaygın olduğu ispatlanmıştır. Biyofilm enfeksiyonlarının öneminin fark edilmesiyle, profilaksi, tanı ve tedavi için kılavuzlar geliştirilmeye başlanmıştır (Hoiby, 2017). Yıllara göre biyofilm konusu ile ilgili makalelerin sayıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Candida albicans* biyofilmi üzerine yayınlanmış makale sayılarının yıllara göre dağılımı ve 1994-1998 yılları arasında Hawser ve Douglas tarafından yapılan ilk *in vitro* model (Soll & Daniels, 2016).

1.1.2. Biyofilm Tanımı

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jel şeklinde bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Serena Leone ve ark., 2016). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarid” ya da “ekzopolimer substance (EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (Fujishige, Kapadia, & Hirsch, 2006). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterilerin veya maya mantarlarının organik bir polimer matriks içine gömülmesidir. Biyofilm oluşumu *in vivo* olarak canlı hücrelerde veya *in vitro* olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir (Poulsen, 1999).

1.1.3. Biyofilmin Yapısı

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipidlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Flemming & Wingender, 2010). Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks, biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin kütlelerinin %75–90’ını EPS oluşturmaktadır (Padera, 2006).

Biyofilm yapısı, protein, Ca^{+2} iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır (Hussain, Wilcox, & White, 1993). Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilir. Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilmde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Allison, 2003). Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH’sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif ya da Gram negatif), bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (Arnold & Silvers, 2000).

Mikrokolonilerin yapısına bakıldığında hem altında hem de arasında su kanalları bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır ve taşıma işlemi, su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaşmaktadır. Ayrıca su kanallarının, içteki alanlara oksijen ve çeşitli molekülleri taşıdığı da belirlenmiştir (Costerton ve ark., 1995). Bakterilerin yüzeye tutunmasında, proteinler gibi organik moleküllerin önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde oluşur (Lasa & Penades, 2006). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyofilm ilişkili Protein Yapısı (BAP-Biofilm Associated Protein), organizmanın yüzeyde kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından da önemlidir (Tormo ve ark., 2005).

1. 2. Biyofilmin oluşumu

1.2.1. Biyofilm Oluşumunun Genel Özellikleri

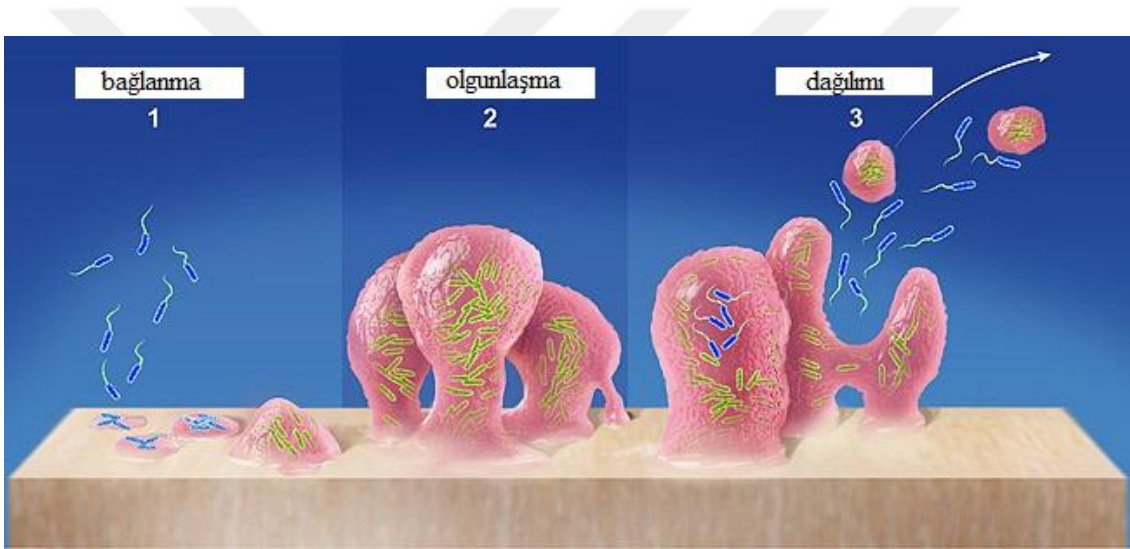
Birçok bakteri planktonik form ve biyofilm formu arasında geçiş yapabilmektedir. Planktonik bakteriler nispeten yüksek hücre büyümesi ve çoğalma oranına sahiptir. Bakteriyel biyofilm oluşumunun gerekliliği aşağıdaki gibi sıralanarak açıklanabilir (Jefferson, 2004).

İlk olarak, biyofilm, bakterilerin zor çevre koşullarına toleransını artırabilmektedir. Bakteriler, sadece bir yüzeye ya da dokuya yapışarak, su akışı ya da kan akımıyla yıkanmaktan kaçınabilmektedirler. Biyofilmlerin içindeki hücreler bulunduğu koşullarda, planktonik hücrelerden antimikrobiyal ajanlara yaklaşık 1000 kat daha fazla dirençlidir (Rasmussen & Givskov, 2006). İkinci olarak EPS matriksi, derin katmanlardaki bakteri hücrelerini, antimikrobiyal ajanlara karşı muhtemelen bu ajanların difüzyonunu sınırlayarak korumaktadır. Biyofilm, bakteriyel hareketliği kısıtlamakta, hücre yoğunluğunu arttırmakta ve aynı zamanda bazıları konjügasyon yoluyla antibiyotik direncini kodlayan ekstraselüler DNA (eDNA, plazmid) değişimi için optimal bir ortam sağlamaktadır. Diğer araştırmacılar tarafından da belirtildiği üzere, yatay gen transfer hızı, biyofilmlerde, planktonik hücrelerden daha yüksektir (Rabin ve ark., 2015).

1.2.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu için bakterilerin bir yüzeye yeterince yakın olması gerekmektedir. Bakteriler bir yüzeye yaklaştıkça, hem çekici ve hem de itici olmak üzere çeşitli güçler devreye girmektedir. Yüzeyden yaklaşık 10-20 nm mesafede bakteri yüzeyindeki negatif yükler, çoğu çevre yüzeyindeki negatif yüklerle itilmektedir. Bununla birlikte, bu itme, bakteriyel hücreler ve yüzey arasındaki çekici özellikteki van der Waals kuvvetleriyle ve bunun yanı sıra, yüzeye mekanik bağlantı sağlamak için fimbria ve flagella kullanımı ile gerçekleştirmektedir (Palmer, Flint, & Brooks, 2007).

Biyofilm oluşumu üç aşamada tarif edilebilmektedir: 1. bağlanma; 2. olgunlaşma ve 3. dağılım (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Biyofilm oluşum aşamaları - (Duane & Costerton, 2018).

Bağlanma aşaması, iki aşamalı bir süreç olarak kategorize edilebilir; tersine çevrilebilir bağlanma ve geri dönüşü olmayan bağlanma (Renner & Weibel, 2011). Geri dönüşümsüz olarak bağlanmış biyofilm, daha güçlü fiziksel veya kimyasal kesme kuvvetlerini tolere edebilmektedir (Sutherland, 2001).

İlk bağlanmada, flagella ve tip IV pili-aracılı hareketlilik önemlidir. Flagellalar, hücreler ve yüzey arasındaki ilk etkileşimler için kritik öneme sahiptir. Tip IV pili-aracılı seğirme hareketlilikleri, ekli hücrelerin kümelenmesini ve mikrokoloniler oluşturmasını sağlamaktadır. O'Toole ve Kolter, *P. aeruginosa* flagella kayıplı mutantlarının yüzeylere inemeyeceğini ve tip IV pili-yetersizliği olan mutantların mikrokoloniler oluşturamadığını göstermiştir (O'Toole & Kolter, 1998).

Staphylococcus epidermidis ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerde, biyofilm oluşumunun başlangıç aşaması, fibronektin, fibrinojen, vitronektin vb. gibi insan matriks proteinlerine bağlanmaktadır. Yapışkan matriks moleküllerine bağımlı adezyonları tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri, hücre duvarındaki peptidoglikana kovalent olarak bağlıdır. *S. aureus*, yapışkan matriks molekülü genlerini tanıyan 20'den fazla mikrobiyal yüzey bileşenine sahipken, *S. epidermidis* RP62A sadece 12 tanesine sahiptir (Otto, 2008). Otolizinlerin aracılık ettiği gibi kovalent olmayan adezyonlar da biyofilmlerin ilk oluşma evresine katkıda bulunmaktadır (Heilmann, Hussain, Peters, & Gotz, 1997).

Biyofilm olgunlaşmasını, biyofilm yaşam döngüsü için de kritik olan dispersiyon aşaması takip eder. Biyofilmler, besin eksikliği, yoğun rekabet, gelişmemiş popülasyon, vb. gibi sayısız faktör nedeniyle dağılmaktadır. Dağılım tüm biyofilmden veya sadece bir kısmında meydana gelebilmektedir. Planktonik bakterilerin salınımı, diğer bölgelerde yeni biyofilmlerin başlatılmasını teşvik etmektedir. Biyofilm formunun elverişsiz koşullarının sonucu olarak planktonik hücrelerin biyofilmden salınması gerçekleşmektedir. Bu, olgun bir biyofilmden planktonik forma kadar olan biyofilm gelişiminin son adımınıdır. Genellikle biyofilmin birkaç kısmı dağılmaktadır ve bu devamlı bir süreçtir. Bu adım, biyofilmin yeni bir yüzeye yayılmasına ve kolonize olmasına izin vermektedir (Rabin ve ark., 2015).

1.2.3. Bakterilerin Biyofilmden Hücreler Arası İletişimi (Quorum Sensing)

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra oraya yapışması ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri şeklinde gerçekleşen rastgele bir olay değildir. Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve “Quorum Sensing (QS)” olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler, ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletebilmektedirler (Camara, 2007).

Başka bir ifadeyle, QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama ‘Ben buradayım’ mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla

haberleşmektedirler (Arnold & Silvers, 2000). Bununla birlikte QS'in gelişim, spor oluşumu, antibiyotik sentezlenmesi, virülans faktör oluşumu, hücre ayırımı ve patojen bakteri enfeksiyonlarında diğer fiziksel olaylarla birlikte mikroorganizmanın beslenme değişimini düzenlediğine inanılmaktadır (March & Bentley, 2004). Bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizma, kendiliğinden sinyal üretebilen ve "Oto-indükleyici [Auto-inducer (AI)]" adı verilen moleküllerden oluşur. QS moleküllerinin oto-endükleyici olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermelerinden dolayıdır (Novick & Muir, 1999). Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır.

QS iki şekilde gerçekleşir; türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında oto-indükleyici N-acylhomoserinlaktone (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), Gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptitlerdir (auto inducing peptitler) (Wong, 1998). Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler ortak olarak oto-indükleyici -2 (AI-2's) kullanmaktadır (Raffa, Iannuzzo, & Levine, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *E. coli* ve *Salmonella enterica*'nın hücreden hücreye sinyalinde AI-2 sinyalleriyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sinyal moleküllerinin üstel gelişim süresince üretildiği ve bakteri membranına serbestçe geçebildiği ifade edilmektedir (Ahmer, 2004).

Bir başka deneysel çalışmada ise, *S. aureus*'un QS mekanizması bloke edildiği zaman biyofilm oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda *S. aureus*'un düşük miktarlarda biyofilm oluşumunu artırırken, yüksek miktarda bulunduğu ortamda biyofilm oluşumunu bırakarak konuk hücreyi işgal ettiği düşünülmektedir (Donabedian, 2003). Benzer bir çalışmada, *Bacillus cereus*'un biyofilm oluşturmak üzere, küçük peptitlerin aktive ettiği PlcR (pleio tropic regulator) sinyal moleküllerini kullandığı ifade edilmektedir (Hsueh, Somers, Lereclus, & Wong, 2006).

1.2.4. Biyofilmlerin Klinik Önemi

Mikroorganizmalar doğada planktonik hücreler olarak bulunmalarının yanısıra genellikle biyofilm oluşturma eğilimi göstermektedir. Biyofilm, mikroorganizmalara pek çok avantaj sunmaktadır; pH değişiklikleri, yüksek ve düşük sıcaklık koşulları, besin yetersizliği gibi olumsuz çevre koşullarına karşı mikroorganizmaları koruyarak yaşam döngülerini devam ettirmelerini sağlamaktadır. Bunun yanısıra biyofilm oluşumunun

insanlarda ciddi enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm oluşturma nedeniyle ortaya çıktığı literatürde yer alan çalışmalarda belirtilmektedir (Lewis, 2001). Biyofilm nedeniyle ortaya çıkan enfeksiyonlarla mücadelede antimikrobiyal ajanların yetersiz kaldığı durumlar görülmekte, bunun sonucunda kronik enfeksiyon oranlarında artış olmakta ve bazı durumlarda enfeksiyonlar ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Antimikrobiyal ajanların yetersiz kaldığı vakaların artması, sağlık giderlerinin artmasına da yol açmakta ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarla mücadele ciddi maddi kayıplara da sebep olabilmektedir (Ribeiro ve ark., 2016).

Biyofilm enfeksiyonlarını meydana getiren mikroorganizma türleri değişiklik gösterse de biyofilm kaynaklı enfeksiyonların ortak özellikleri bulunmaktadır. Bu ortak özellikler aşağıda belirtilmektedir.

1. Biyofilmler genellikle sabit (durağan) ve/veya cansız yüzeyler üzerinde gelişim gösterirler. Ancak canlı dokular üzerinde gelişim gösteren biyofilmler de bulunmaktadır.
2. Biyofilmin oluşma süresi mikroorganizma türlerine göre değişiklik göstermektedir. Ancak genellikle biyofilm formunun oluşması uzun bir süreçtir. Bu sebeple semptomların ortaya çıkması ve buna bağlı olarak fark edilmesi zaman almaktadır.
3. Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar antijen salınımı gerçekleştirme eğilimine sahiptir. Ancak biyofilm yapısı antikora karşı mikroorganizmaları korumaktadır. Bu süreçte antimikrobiyal ajanlar kullanılsa dahi bu ajanlar planktonik hücreleri öldürmekte ancak biyofilm yapısına etki edememekte ve biyofilmin ortadan kaldırılmasını sağlayamamaktadır.
4. Olgunlaşmış biyofilm yapısının en üst katmanında bulunan mikroorganizma hücreleri daha sonraki aşamalarda biyofilm formundan koparak ayrılmaktadır. Biyofilm formundan koparak ayrılan hücreler immün sistemi baskılanmış konaklarda akut enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu programlanmış süreç sonucunda kronik enfeksiyonlar meydana çıkmakta ve antimikrobiyal ajanlar kullanılsa dahi benzer enfeksiyonların konak sistemlerinde tekrarlandığı vakalar görülmektedir (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999).

Biyofilm enfeksiyonlarının en büyük özelliklerinden birisi antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdikleri direnç mekanizmasıdır. Biyofilm matriksinin temel yapısını oluşturan ve biyofilm dış katmanını meydana getiren EPS, antimikrobiyal ajanların difüze olmasını engellemektedir. EPS bariyerini aşamayan mikrobiyal ajanlar biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizma hücrelerine ulaşamamakta ve etkisini gösterememektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda; biyofilm formu içerisinde yer alan mikroorganizmaların serbest halde bulunan hücrelere kıyasla antimikrobiyal ajanlara karşı 1000 kat daha dirençli oldukları ortaya konulmaktadır. Biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar geliştirdikleri direnç genlerinin aktarımını yaparak çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına da sebep olmaktadır (Gupta ve ark., 2016).

Biyofilm formu meydana getiren bakteriler direnç genlerini taşıyan plazmidleri konjugasyon ile birbirlerine aktarabilmektedir. Bunun sonucunda çeşitli antibiyotik türlerine karşı direnç mekanizmaları gelişmekte ve antibiyotiklerin çoklu kullanımında dahi yetersiz kaldığı vakaların görülme oranında artış meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 2013 yılında yayınladığı raporunda ABD’nde meydana gelen 2 milyondan fazla bakteri kaynaklı enfeksiyonun 23,000’inin antibiyotik direnci sebebiyle ölümlerle sonuçlandığını belirtmektedir (Solomon & Oliver, 2014).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC) Avrupa’da meydana gelen bakteriyel enfeksiyonların 25,000’inin antibiyotik direncinden kaynaklı olarak ölümlerle sonuçlandığını açıklamaktadır. *P.aeruginosa*, *E. Coli*, *S.aureus* ve diğer Enterokoklar meydana getirdikleri biyofilm formu ile yüksek oranda enfeksiyona yol açan bakteri türleri arasında yer almaktadır (Hogberg, Magiorakos, Heuer, & Monnet, 2014; Weist & Diaz Hogberg, 2014).

P. aeruginosa hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli bakteri türlerinden biri olarak bilinmektedir. İmmün sistemi baskılanmış ya da zayıflamış hastalarda ciddi enfeksiyonlara sebebiyet veren fırsatçı bir patojendir. Hastanelerde kataterler, solunum cihazları ve sondalar gibi çeşitli cihazlarda kolonize olmaktadır. İnsan vücudunda ise perine, aksilla ve kulak gibi nemli vücut kısımlarında bulunabilmektedir. Özellikle kistik fibröz hastalarının akciğerlerinde meydana getirdiği biyofilm, ciddi solunum yolu enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir. Bu vakalardan bazılarının ölümlerle sonuçlandığı çeşitli raporlarda bildirilmektedir (Gellatly & Hancock, 2013). *P. aeruginosa*’nın oluşturduğu biyofilm yapısının bir sonucu olarak enfeksiyonların süresi ve şiddetinde artış meydana gelmekte, antibiyotiklerin yetersiz kaldığı vakaların

oranı gittikçe yükselmektedir. Biyofilm formu içerisinde yer alan *P. aeruginosa* kolonileri plazmidler aracılığı ile antibiyotik direnç genlerini aktarabilmekte ve çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaktadır (Bjarnsholt ve ark., 2009). CDC'nin 2013 senesinde yayınladıkları raporda, ABD'de görülen *P. aeruginosa* enfeksiyonlarından 6700'ünün antibiyotik direncine sahip suşlardan kaynaklandığını ve bu vakaların 440'nın ölümle sonuçlandığını belirtmiştir (Solomon & Oliver, 2014). Türkiye'de ise bir meta-analiz çalışmasında, *P. aeruginosa* izolatlarında 10 yıldaki antibiyotik direnç değişiminin durumunun değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Türkiye'de *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direncinin yüksek olduğunu ve özellikle karbapenemler ve penisilinlerde artmaya devam ettiğini göstermektedir (Acar, Karaahmetoğlu, Akalın & Altay, 2019).

Hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan patojenlerden *S. epidermidis* intravasküler kataterlerde yaygın olarak yayılım gösteren bakteri türlerinden biridir. Durgun yüzeylerde ve medikal cihazlar üzerinde meydana getirdiği mukoid yapıdaki biyofilm formu klinik açıdan önem arz eden enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar inatçı ve kronik enfeksiyonlara dönüşmekte ve mücadelesinde çeşitli zorluklar meydana gelmektedir. Biyofilm formu geliştiren *S. epidermidis* kolonileri konak hücrede sadece buldukları dokulara değil çevre dokulara da ciddi zararlar verebilmektedir. Konak canlıının hücreleri tarafından üretilen antikorlar planktonik hücrelere karşı genellikle etkili iken biyofilm formuna etki göstermekte zayıf kalmaktadır (O'Gara & Humphreys, 2001).

Medikal cihazlar ve protezlerde meydana gelen biyofilm formları da klinik vakaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sıklıkla kullanılan eklem protezleri, intravenöz kataterler, kalp pilleri ve sondalar yüksek oranda biyofilm formu ile ilişkili enfeksiyonlar açısından büyük risk taşımaktadır. Çoğunlukla Stafilokoklar ve *Pseudomonas* türleri bu medikal cihazlar üzerinde biyofilm tabakası oluşturmaktadır. Bu mikroorganizma türleri medikal cihazlar üzerinde biyofilm formu meydana getirirler ve bu cihazların konak canlıya transferiyle beraber fırsatçı patojenler olarak konak canlı hücrelerinde enfeksiyonlara yol açarlar. Bu bakımdan özellikle *S. epidermidis*'in hem açık yaralarda hem de implant ve medikal cihazlar aracılığıyla ciddi enfeksiyonlara yol açma potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Arciola ve ark., 2012).

Biyofilm formu üzerine yapılan araştırmalar ve çalışmalar bakteri türleri üzerinde yoğunlaşsa da mantar türlerinin de biyofilm formu meydana getirdikleri özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların büyük bir

kısımında mantarlar, özellikle *Candida* cinsi mayalar belirgin bir rol oynamaktadır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanılması, cerrahi operasyonlar sonucu mukozal bariyerin bozulması, kateter ve diğer medikal cihazların kullanılması mantar enfeksiyonlarına zemin hazırlayan en önemli faktörlerdir (Ramage, Rajendran, Sherry, & Williams, 2012).

Hastane kaynaklı patojenler arasında en fazla yaygınlık gösteren *C. albicans* biyofilmi, maya mantarları biyofilmleri içerisinde en iyi bilinen biyofilm olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar filamentli mantarların (*Aspergillus*, *Fusarium*, zygomycetes) ve mayaların *Blastoschizomyces*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* ve çeşitli *Candida* türleri) yüksek oranda biyofilm formu meydana getirdiklerini göstermektedir (Nett & Andes, 2015).

Kandidiyazis tıbbi cihazlarla ilişkili biyofilm enfeksiyonlarına en fazla sebebiyet veren enfeksiyon türüdür. *Candida* türleri kan enfeksiyonlarında dördüncü ve idrar yolu enfeksiyonlarında üçüncü en yaygın görülen etkenleridir. Biyofilm enfeksiyonları başta *C. albicans* için tanımlanmış olsa da *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türleri de yaygın olarak biyofilm enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Shin ve ark., 2002).

1.2.4.1. Tıbbi Cihazlar ve Biyofilm

Bakteri ve mantar türlerinin meydana getirdiği biyofilm formunun çeşitli hastalıklarla ilgili olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Biyofilm yapısı akciğer, aksilla ve perinenin yanısıra iç kulak yapısı ve diğer canlı dokularda meydana gelebileceği gibi çeşitli medikal cihazlar ve protezlerde de oluşabilmektedir. Biyofilm formu ile ilişkili kronik enfeksiyonların başında medikal cihazlarla ilişkili enfeksiyonlar bulunmaktadır. Kalp pilleri, eklem protezleri, intravenöz kateterler ve sondalar sıklıkla kullanılan cihazların başında gelmektedir ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar için büyük risk teşkil etmektedir. Özellikle Stafilokoklar ve *Pseudomonas* türleri ve *Candida* türleri, bu medikal cihazlar üzerinde biyofilm yapısı oluşturmakta ve bu cihazlar aracılığı ile konak hücreye girerek enfeksiyona sebebiyet verebilmektedir. Özellikle Stafilokoklar açık yaraları ve implantları da enfekte ederek ciddi hastalıklara yol açabilmektedir.

Rahim içi cihazlar ve kontakt lensler de biyofilm enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. *S. epidermis*, *C. albicans*, *S. aureus* ve bazı Enterekoklar kontakt lensler üzerinde biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara yol açmaktadır (Gupta ve ark., 2016).

1.2.4.2. Kistik Fibrosis ve Biyofilm

Akciğerdeki kistik fibrozis (KF), solunum yolunu tıkayan ve hastaların nefes almasını zorlaştıran kalın ve yapışkan mukus oluşumuna neden olur (Hunt, Peng, Loubens, & Storey, 2002; Lyczak, Cannon, & Pier, 2002). KF hastalarının %80'i kronik olarak *P. aeruginosa* ile enfekte olmuştur. Medikal cihazlar ve aygıtlar da *P. aeruginosa* ile kontamine olabilirler (Pedersen, Hoiby, Espersen, & Koch, 1992).

1.2.4.3. Diş Plağı ve Biyofilm

Biyofilmler diş hekimliğinde önemli bir rol oynarlar ve dental biyofilmler üzerine pek çok araştırma bulunmaktadır (Hojo, Nagaoka, Ohshima, & Maeda, 2009). *Streptococcus obrinus* ve *Streptococcus mutans* gibi diş çürükleriyle ilgili bakteriler çok yüksek asit toleransına sahiptirler. Ayrıca dirençli biyofilmler de oluşturabilen bu asit toleranslı bakteriler, diş çürükleri, diş eti iltihabı gibi birçok ağız içi hastalıktan sorumludur (Sbordone & Bortolaia, 2003).

1.2.4.4 Yaralar ve Biyofilm

Biyofilmler yaygın olarak kronik yaralarda bulunurlar (James ve ark., 2008) (56). Biyofilmler genellikle yaraların dış tabakasında oluşur fakat *P. aeruginosa* biyofilmleri gibi bazı biyofilmler yaranın dip katmanında olabilirler ve eküvyon ile alınan yara kültüründe saptanması zordur (Hall, McGillicuddy, & Kaplan, 2014).

1.2.4.5. Üriner Enfeksiyon ve Biyofilm

İdrar yolu kateteri gibi biyomateryaller üriner enfeksiyona yol açan bakteriyel biyofilm oluşumunu arttırırlar (Tenke, Kovacs, Jackel, & Nagy, 2006). Bakteriler sentetik yabancı cisimlerin yüzeylerine yapışarak biyofilm oluşumunu başlatabilirler. Bu biyofilmler (kristal yapıda olabilen *P. mirabilis* biofilmleri gibi) kateterde tıkanmalara yol

açabilir ve sonrasında kateter değişimi gerekir (Jacobsen, Stickler, Mobley, & Shirtliff, 2008).

1.2.4.6. Protez Eklem Enfeksiyonları

Protez eklem enfeksiyonuna neden olan bakteriler genellikle stafilokoklardır (Matthews, Berendt, McNally, & Byren, 2009). Çoğu kez ameliyattan hemen sonra, bakteriler (kan ya da lenften gelebilen kan) biyofilmler oluşturmak için protez eklem yüzeyine bağlanır (Trampuz & Zimmerli, 2005).

1.2.4.7. Kalp Kapakçığı Enfeksiyonu

Mekanik kalp kapakçığı üzerindeki bakteriyel biyofilm, prostetik kapakçık endokarditi olarak adlandırılan bir hastalığa neden olur ve etkenler sıklıkla *S. epidermiditis*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.* türleri, *Corynebacterium* türleri ve *Candida* türleridir. Mekanik kalp kapakçığındaki biyofilm akışta azalmaya, türbülansa hatta sızmaya yol açabilir, yapay kap kapakçığını bozabilir ya da tı kayabilir. Ayrık biyofilm hücreleri kan dolaşımı ile birlikte göç edebilir ve diğer organlarda enfeksiyon ve tıkanıklıklara yol açabilir (Nira ve ark., 2015).

1.2.5. Biyofilmin Antibiyotiklere ve Konak İmmün Sistemine Karşı Direnci

Bakteriyel biyofilmler tarafından sergilenen antibiyotik direnci aşağıdaki mekanizmalarla açıklanabilir.

1.2.5.1. Kısıtlı Antibiyotik Penetrasyonu

EPS matriksi kısıtlı antimikrobik ajanların biyofilme penetrasyonu ile oluşan antibiyotik direncinde önemli bir rol oynar. Dolu polisakkaridler ve eDNA birtakım antibiyotik türlerini tutabilirler. Suci ve ark. biyofilm üzerine antibiyotiklerin penetrasyonunu araştırdıkları çalışmalarında *P. aeruginosa* biyofilmindeki siprofloksasin konsantrasyonunun dramatik bir şekilde azaldığını, ancak tamamen bloke olmadığını göstermişlerdir (Suci, Mittelman, Yu, & Geesey, 1994).

Steward ve ark. *K. pneumoniae*'da ampisilin ve siprofloksasin penetrasyon sınırlamasını araştırmışlar ve siprofloksasinin ampisilinden çok daha iyi penetrasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir (Anderl, Franklin, & Stewart, 2000).

1.2.5.2. Yatay Gen Transferi

Bazı bakteriler genlerdeki rastlantısal mutasyonlar yoluyla antibiyotik direnci elde edebilirler. Biyofilmlerde yatay plazmid transfer sıklıkları planktonik hücreler arasındakilerden çok daha yüksektir. *S. aureus* biyofilmleri üzerine yapılan araştırmalar, biyofilmlerin konjugasyon/mobilizasyonla, plazmid kaynaklı antibiyotik direnç genlerinin yayılmasını sağladıklarını göstermiştir (Savage, Chopra, & O'Neill, 2013). Doğal veya içsel direnç, mikroorganizmanın kalıtsal özelliklerinden kaynaklanan cinse veya türe özgü antimikrobiyel maddelere dayanabilme yeteneğidir. Genellikle plazmitlerin aracılık ettiği kazanılmış dirençte ise bakteriler yatay gen transferi ile antibiyotik direnci kazanabilirler. Bu direnç mekanizması ile bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türe ait başka bir bakteriye hatta farklı türdeki bakterilere dahi taşınabilir (Araujo, Henriques, & Silva, 2017).

1.2.5.3. Çoğalma Hızında Azalma

Biyofilmlerin içinde kısıtlı oksijen ve besin maddeleri bulunur, bu yüzden özellikle de derin katmanlardaki biyofilm hücreleri hem düşük bir metabolik hıza hem de düşük büyüme ve bölünme hızına sahiptirler. Bu özellikler biyofilm bakterilerini hedefleyen antibiyotik ilaçlara karşı duyarsızlaştırır. Örneğin, β -laktam antibiyotiklerin hedefleri biyofilmdeki dağılım hücreleridir, bu yüzden biyofilm oluşturan *E.coli*'ye karşı kullanıldığında bu antibiyotiklerin bakteriyolitik aktiviteleri azalır (Ashby, Neale, Knott, & Critchley, 1994).

1.2.5.4. İnatçı Hücreler

Biyofilmlerde, inatçı hücreler olarak adlandırılan bir hücre grubu bulunur. Bunların büyüme hızı sıfır ya da son derece yavaştır. Hücre büyümesi ya da bölünmesi ile ilgili hedeflenen işlemlerde halen klinikte kullanılan çoğu antibiyotikler inatçı hücrelere karşı etkin değildirler (Lewis, 2007). İnatçı hücreler stres koşullarında hayatta kalmak için fenotipik olarak değişim gösterirler ve dormant (durağan) forma geçerler (Inigo, Peman, & Del Pozo, 2012). İnatçı hücreler durgun fazdaki planktonik kültürlerin bazılarında ve biyofilmlerde rastlanılmaktadır. Durgun fazdaki bakteri stres koşullarında inatçı hücreler ile kendilerini korumaya alırlar. Biyofilmlerde aynı durgun fazdaki hücre gibi kendisini korumaya almak için inatçı hücreler üretir (Malik, Erginkaya, & Erten, 2019).

1.2.5.5. Hücreden Atım Pompaları

Atım pompaları sistemleri antimikrobiyel ajanlara karşı hem doğal hem de kazanılmış direnç gösterirler. Atım pompasının aşırı üretimi çoklu ilaç direncine neden olabilir. Bakteriyel çıkış pompaları hedef modifikasyon ve antibiyotik inaktivasyonu gibi diğer direnç mekanizmaları ile kombine edilen çoklu ilaç direnci fenotipine eğilim gösterirler (Malik, Erginkaya, & Erten, 2019). Hücre dışı atım pompaları bakterilerin antibiyotik ilaçları dahil olmak üzere hücre içi toksinleri dışarı pompalanmasına olanak sağlar. Atım pompaları ayrıca planktonik hücrelerde de açıktırlar. Bazı atım pompa genlerinin ekspresyonunun artırılmasıyla biyofilmlerde antibiyotik dirence katkı gösterilmiştir. Zhang ve ark.yeni bir *P. aeruginosa* atım pompası geni PA 1874-1877'ni ve biyofilmlerdeki PA1871877 geninin ekspresyon seviyesinin planktonik hücrelerdekinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu gen tarafından şifrelenen atım pompası tobramisin, gentamisin ve siprofloksasin direncini arttırmaktadır (Zhang & Mah, 2008).

1.2.5.6. EPS Matriks Koruması

EPS matriksi kümelenmiş biyofilm hücrelerine fiziksel koruma sağlar. Mikroorganizmaların inaktive edilebilmeleri için yeterli konsantrasyonda antimikrobiyal madde ile muamele edilmeleri gerekmektedir. Ancak biyofilmlerdeki EPS matriksi antimikrobiyel maddelerin hedef bölgeye istenen konsantrasyonda ulaşmasına engel olmakta ve bir bariyer görevi görerek mikroorganizmaya direnç kazandırmaktadır (Jahid & Ha, 2014). Anyonik EPS matriksi toksik katyonik ağır metalleri, katyonik antimikrobiyel peptitleri ve pozitif yüklü antibiyotikleri (aminoglikozitler) bağlayabilir. Ancak beta-laktam gibi nispeten yüksüz antibiyotiklerde böylesi bir bağlanma söz konusu değildir. Genelde, antibiyotikler EPS matriksine ya çok az nüfuz ederler ya da hiç giremezler. Bundan dolayı antibiyotiklerin EPS matriksindeki düşük penetrasyonu antibiyotik direncinde EPS matriksinin çok da etkili olmadığını düşündürmüştür (Bouffartigues ve ark., 2015). Leid ve ark. *P. aeruginosa*'daki biyofilmlerde ekzopolisakarit aljinatın, biyofilm bakterilerini insan lökosit hücrelerinden koruduğunu göstermiştir (Leid ve ark., 2005).

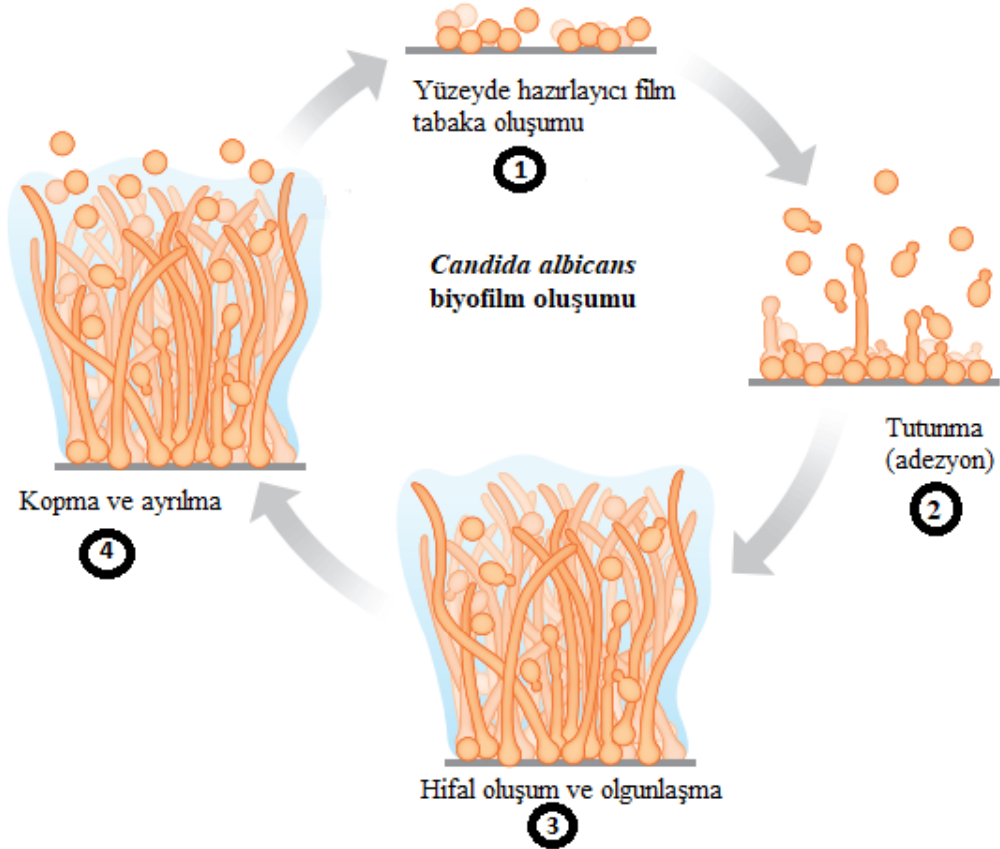
1.2.6. Fungal Biyofilm Oluşumu

Hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların büyük bir kısmında etken *Candida* türleridir. Özellikle yatan hastalarda kullanılan tıbbi cihazlarda oluşan biyofilm kaynaklı

enfeksiyonlar nedeniyle, tedavide bazı güçlüklerle karşılaşılmaktadır. İmmün sistemin baskılanmasının fırsatçı mantar enfeksiyonlarıyla yakın ilişkisinin bulunduğu göz önüne alındığında, oluşabilecek bu güçlü antifungal direnç daha ağır klinik seyire yol açmakta ve yüksek mortaliteye neden olabilmektedir (Nobile & Johnson, 2015).

Hawser ve Douglas'ın (Douglas, 2003) kateterden kestikleri küçük diskler üzerinde yaptıkları *in vitro* biyofilm çalışmaları, fungal biyofilmlerle ilgili önemli bilgiler sağlamıştır. Araştırmacılar bu yöntem ile *C.albicans*'ın lateks, polivinil klorür ve silikon gibi maddeler üzerinde biyofilm oluşturabildiğini ve biyofilm oluşturma yeteneğinin non-albicans *Candida* türlerinden daha iyi düzeyde olduğunu göstermişlerdir. *Candida* biyofilmlerinin gelişim aşamaları da bakteriyel biyofilmlere benzerdir ve şu şekilde basamaklanabilir (Şekil 1.3.):

- 1) Yüzeyde hazırlayıcı film tabaka oluşumu
- 2) Tutunma (adezyon)
- 3) Hifal oluşum ve olgunlaşma
- 4) Kopma ve ayrılma



Şekil 1.3. *C. albicans* biyofilm oluşumunun aşamaları. (Nobile & Johnson, 2015).

1.2.6.1. Yüzeyde Hazırlayıcı Film Tabaka Oluşumu

Biyofilm gelişiminin ilk basamağını oluşturan hazırlayıcı film tabaka oluşumu aynı zamanda adezyon basamağının da temelidir.

Herhangi bir yüzeyin sıvı ile teması sonrasında film tabaka gelişimi dakikalar içinde başlamaktadır. İnsan vücudu söz konusu olduğunda, biriken maddeler anatomik bölgenin özelliğine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, diş ve dişeti üzerinde plak oluşumu sırasında albümin, lizozim, glikoprotein gibi maddelerden oluşan bir birikim meydana gelmektedir (Elder, Stapleton, Evans, & Dart, 1995). Tıbbi cihazların vücuda implantasyonundan sonra ilk olarak vücut içerisindeki tükürük, kan, serum gibi çeşitli sekresyonların taşıdıkları kollajen, fibrinojen ve fibronektin gibi makromoleküller yüzey üzerinde birikmektedir (Tümbay, 1999).

Bu şekilde tıbbi gereç üzerinde bir hazırlayıcı film oluşmaktadır. Mikroorganizmalar, tıbbi gereçlerin çıplak yüzeyleri yerine bu tabaka üzerinde tutunmayı tercih etmektedirler.

Doğal çevrede ve insan vücudunda bulunan yüzeylerde hazırlayıcı film tabaka oluşumunu takiben mikroorganizmaların adezyonu gerçekleşmektedir (Elder, Stapleton, Evans, & Dart, 1995). Durgun sıvılarda mikroorganizmalar partikül gibi davranır ve tabana çökerler (Costerton, Geesey, & Cheng, 1978). Ancak, tutunma yalnızca pasif çökme ile sınırlı olmayıp reseptörlerle kemotaktik hareketleri de içeren sistemli bir olaydır (Percival, Knottenbelt, & Cochrane, 2011). Adezyonun geri dönüşlü ve geri dönüşsüz olabileceği bilinmektedir (Elder, Stapleton, Evans, & Dart, 1995).

Geri dönüşlü adezyonda yüzeye zayıf bağlanma gerçekleşirken, geri dönüşsüz adezyonda güçlü bağlanma görülmekte ve takiben biyofilm oluşumunun sonraki aşamaları meydana gelmektedir (Douglas, 2003).

1.2.6.2. Tutunma (Adezyon)

1) Primer Adezyon (Gevşek Adezyon)

Mikroorganizma ve hazırlayıcı film tabaka ile kaplı yüzeyin temasını gerektiren bu aşamada farklı fiziko-kimyasal değişkenler rol oynamaktadır. Sürüklenerek veya kendi hareketi ile yüzeye 1 nm gibi kritik bir uzaklığa kadar ulaşan mikroorganizma; hidrofobik ve elektrostatik ilişkiler, Van der Waals kuvvetleri, sıcaklık ve benzeri etkilerin sonucunda

geri dönüşlü olarak yüzeye tutunur. Hidrofobik etkileşimin etkisinin diğerlerinden fazla olduğu düşünülmektedir (Percival, Knottenbelt, & Cochrane, 2011).

2) Sekonder Adezyon (Sıkı Adezyon)

Bu aşama, yüzeye bağlanan ekzopolisakkaritler ve/veya reseptöre özgü ligandlar aracılığıyla gerçekleşir. Mikroorganizma yüzeyin kendisine veya yüzeye tutunmuş diğer mikroorganizmalara tutunabilir. Bu aşamanın sonunda tutunma geri dönüşsüz hale gelmektedir (Percival, Knottenbelt, & Cochrane, 2011).

Serbest *Candida*'nın adezyonu, yüzey hazırlayıcı film oluşumunun ardından hidrofobik ve elektrostatik etkilerle gerçekleşmekte, sonrasında hücreler arası adezyonu gerçekleştiren özelleşmiş adezinler devreye girmektedir. Bu adezinler, sadece hücreler arası değil, hücre-yüzey tutunmasında da yer almaktadırlar (Inweregbu, Dave, & Pittard, 2005). Biyomateryale bağlı gelişen *Candida* biyofilmlerinde en önemli basamağın adezyon olduğu ve adhezinlerin biyofilm oluşumunda primer rolü olduğu söylenebilir.

1.2.6.3. Hifal Oluşum ve Olgunlaşma

1) Hifal Oluşum

Fungal biyofilm gelişiminde dimorfizmin ayrı bir rolü vardır. Maya ve hif formlarının biyofilm içindeki işlevleri farklı görünmektedir. Baillie ve Douglas hif formunun biyofilm gelişiminde önemli role sahip olduğunu göstermişlerdir. Maya ve küf formunda bulunabilen sokak suşu, hif oluşturamayan mutant suş ve maya hücresi şeklinde bulunamayan mutant suşun oluşturduğu biyofilmleri incelemişlerdir. Bu çalışmada, sokak suşunun oluşturduğu biyofilmin ince bir maya hücresi tabakası ile yüzeye tutunduğu ve üzerinde kalın bir hif tabakası oluşturduğu görülmüştür. Hif oluşturamayan mutant ince bir tabaka ile yüzeye tutunabilmiş ve sonuç olarak biyofilm kalınlaşmamıştır. Maya hücresi olmayan mutant ise kalın bir tabaka hif içeren biyofilm oluşturmuş ancak bu biyofilm yüzeyden kolayca ayrılmıştır (George S. Baillie & Douglas, 2000).

Fungal biyofilm gelişimi sırasında filamentasyon ve hifal farklılaşma aşamaları için farklı genler rol almaktadır (Inweregbu, Dave, & Pittard, 2005). Hifal farklılaşma aşamaları için genel olarak ALS genleri sorumludur.

C. albicans'ın biyofilm oluşturmasında ALS1, ALS3 ve ALS5 genleri biyofilmin adhezyon aşamasında rol almaktadır. ALS1 hem maya hem hifal formunun, ALS3

genlerinin ise sadece hifal formda exprese edildiği saptanmıştır (Araujo, Henriques, & Silva, 2017).

Hifal oluşumun meydana gelmesiyle ECM (ekstrasellüler matris) içinde maya, yalancı hif ve gerçek hif ağını içeren oldukça karmaşık ve sağlam bir yapı ortaya çıkmaktadır. Mısır koçanını andıran, bakteriyel biyofilmlerde birden fazla türde bakterinin biyofilm yapısına katılmasıyla oluşan ve antimikrobiyal dirence neden olabilen bu yapı; *Candida* biyofilmlerinde tek bir türün oluşturduğu biyofilmin yapısıdır. Bu heterojenlik, yapıya kazandırdığı sağlamlığın yanında bunun oldukça yoğun bir form olmasını da sağlamaktadır. Heterojenliğin kazandırdığı yoğunluk, hücreler arasında daha fazla iletişim ve işbirliği anlamı taşımaktadır. Diğer bir taraftan biyofilm içindeki sesil mantar hücreleri antifungal tedavide ilk seçenek ilaçlardan olan azollere çok daha az duyarlı hale gelmektedir (Brown, Denning, & Levitz, 2012).

2) Olgunlaşma

C. albicans biyofilm yapısının olgunlaşması 38.–72. saatler arasında gerçekleşmektedir (Douglas, 2002). Olgunlaşma ile biyofilmin üç boyutlu yapısı gelişmektedir (Brown, Denning, & Levitz, 2012), bu süreçte biyofilm, blastosporlar ve yoğun psödohif-hif ağından oluşan heterojen bir yapıya sahiptir (Douglas, 2002). Mayalar, hiflerin bağlanması için taban katmanını oluşturmaktadırlar (Silva ve ark., 2011). Bağlanan mayaların bölünüp çoğalması ve organik - inorganik maddelerin dış ortamlardan ECM yapısına katılması, biyofilm yapısının yoğunluğunun ve yapısal karışıklığın artmasını sağlamaktadır. Biyomateryal ve tıbbi cihaz ile ilişkili biyofilmlerde konak hücrenin salgıladığı enzim ve yapısal proteinler, fibrinojen ve fibronektin gibi maddeler, biyofilm yapısına katılarak yoğunluk artışına neden olmaktadır. Bu olaylar gerçekleşirken, diğer taraftan ECM miktarı da artmaktadır. ECM, konakçının enzimleri ve antifungal ilaçlar gibi dış etkilere karşı mantar hücrelerini koruyan bir kalkan görevi görmektedir. *C. albicans* ve *C. tropicalis* için bu yapı oldukça karmaşıktır. Bu türler için ECM yapısına katılan maddeler protein, heksozamin, fosfor, üronik asit ve karbonhidratlardır. *C. albicans* biyofilmlerinde bu yapıya DNaz da katılmaktadır (Sellam ve ark., 2009). ECM yapısında bulunan karbonhidratların biri de hücre duvar yapısında bulunan ve adezyon aşamasında işlev gören β -1,3-glukandır.

1.2.6.4. Kopma ve Ayrılma

C. albicans biyofilmi içindeki hücrelerin yakın çevreye yayılması biyofilm yaşam döngüsünde bir başka önemli bir aşamadır. Hücrelerin biyofilm oluşumu boyunca sürekli olarak dağıldığı ve öncelikle yuvarlak maya şeklinde oldukları düşünülmektedir. Dağılmış hücreler, morfolojik olarak planktonik maya hücrelerine benzer olmakla birlikte, farklı özelliklere sahiptir. Bu hücreler (planktonik hücrelere göre) daha fazla yapışma özellikleri, daha verimli bir biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler (Uppuluri ve ark., 2010).

Biyofilmin büyüme potansiyeli besin miktarına, besinin iç kısımlara perfüzyonuna ve toksik maddelerin uzaklaştırılabilmesine bağlıdır. Hücre yoğunluğu, ECM yapısı ve ECM içerisindeki maddeler belirli bir seviyeye ulaştığı zaman, biyofilm yapısı da belli bir doygunluğa ulaşmış demektir ve böylelikle biyofilmde hücre yoğunluğu arttığında hücrelerin bir kısmı biyofilmden ayrılmaktadır (Kim & Sudbery, 2011)

1.3. Biyofilm ve Quorum Sensing

Son yıllarda bakteriler gibi mantarlarda da Quorum Sensing (QS) sinyal sisteminin bulunduğu, ve QS moleküllerinin morfogenez, filamentasyon, biyofilm oluşumu ve patogenez gibi olaylarda anahtar rolü olduğu gösterilmiştir. Dimorfik *C. albicans* ile yapılan QS molekülleri ile ilgili çalışmalarda (Hogan, 2006) düşük hücre yoğunluğunda ($<10^6$ hücre/ml) maya hücreleri germ tüp oluşturmakta fakat yüksek hücre yoğunluğunda blastokonidya şeklinde kalmaktadır. Farnesol ve tyrosol gibi QS moleküllerinin *C. albicans*'ın blastonidiya formunun filamentöz hifal forma geçişini kontrol ettiği saptanmıştır (Jacob ve ark., 2001; Oh, Miyazawa, Naito, & Matsuoka, 2001). Farnesol 1-50 μ M konsantrasyonda *C. albicans* suşlarına etki gösteren, besiyerinde bulunan sığır serum albumini ya da prolin N-asetilglukozamin gibi hif oluşumunu tetikleyen maddelerin varlığına rağmen miçel oluşumunu baskılayabilen bir sinyal molekülüdür. Ancak hif oluşumunu baskılayabilmek için yüksek konsantrasyonlara (10-250 μ M) ihtiyaç duyulmaktadır (Mosel ve ark., 2005). Ayrıca hif oluşumunu baskılayanın yanında hücreyi hidrojen perokside karşı korumakta ve böylece konak savunma mekanizmasından kaçışı sağlamaktadır. Bazı suşların, (*C. albicans* ATCC 10231 gibi) farnesol yerine farnesoik asit molekülü içerdiği gösterilmiştir. Farnesol, farnesoik asite göre daha düşük konsantrasyonlarda hif oluşumunu inhibe edebilmektedir (Hogan, 2006).

C. albicans'ın ürettiği diğer QS moleküllerinden biri de tirozin derivativesi olan "tyrosol"dür. "Tyrosol" farnesolün aksine biyofilmin ilk oluşum aşamasında hif oluşumunu

arttırmaktadır. Mantarlarda tanımlanan farnesol ve tyrosol dışındaki diğer aktif QS molekülleri oxylipins, pheromones, tryptophol, 1-phenylethanol, acet-aldehydler ve bazı uçucu bileşiklerdir. Bu moleküllerden phenylethanol ve tryptophol *C. albicans* tarafından üretilmekte ve “tyrosol” etki göstermediğinde yalancı hif oluşumunu arttırmaktadır (Alem, Oteef, Flowers, & Douglas, 2006).

1.4. *Candida* Biyofilmleri ve Antifungal Direnç

Biyofilm yapısı olumsuz çevre koşulları, konak immün sisteminden kaçış ve antimikrobiyal direnci açısından mikroorganizmaya çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Brown, Denning, & Levitz, 2012). Yapılan çalışmalarda, fungal ve bakteriyel biyofilmlerin antifungallere ve antibiyotiklere daha dirençli olduğu gösterilmiştir. *Candida* hücrelerinin biyofilm oluşturan formlarının planktonik hücre formlarına göre amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, nistatin gibi antifungal ilaçlara ve klorheksidin gibi dezenfektanlara daha dirençli oldukları gözlenmiştir (Yücesoy, 2006). *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinin amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, ravukonazol, nistatin, terbinafin ve klorheksidine dirençli iken, amfoterisin B'nin lipid içeren formülleri ile ekinokandin grubunda yer alan kaspofungin ve mikafungine duyarlı oldukları bildirilmiştir (Bourgeois ve ark., 2010). *Candida* biyofilmlerinin antifungallere neden daha dirençli olduğu konusu net olmasa da, bu konu ile ilgili çeşitli hipotezler mevcuttur. Antifungal direncin muhtemel nedenleri antifungal ilaçların ECM'e iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin yavaş üremesi, inatçı hücrelerin varlığı ve biyofilmi oluşturan hücrelerde yüzeye tutunma sonrası farklı genlerin ön plana çıkması olarak sıralanabilir (Saxena, Maheshwari, Dadhich, & Singh, 2014). Direnç, genellikle bu mekanizmalardan sadece biri ile ortaya çıkmamaktadır ve çoğu durumda mekanizmalar iç içe geçmiştir. Direncin meknizmaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- 1) ECM'nin, bakteriyel biyofilmler için fiziksel bir bariyer gibi rol oynayarak antibakteriyel penetrasyonunu engellediği ve ilaç direncine neden olduğu bilinmektedir *Candida* biyofilmlerinde de ECM'nin uzaklaştırılması direncin azalmasına neden olmakla birlikte, ECM'nin dirence neden olan tek faktör olmadığı gözlenmiştir (Brown, Denning, & Levitz, 2012).

- 2) Biyofilmde gözlenen antifungal direnç ile ilgili öne sürülen bir diğer hipotez ise biyofilm içindeki hücrelerin üreme hızlarının azalmasıdır. Genel olarak, antimikrobiyal ajanların hızlı çoğalan hücrelere daha etkili oldukları ve biyofilm içindeki hücrelerin üreme hızlarının düştüğü bilinmektedir (Koç, 2003). Ancak, Chandra ve ark., biyofilmde gelişen antifungal direncin yalnızca biyofilm içindeki hücrelerin metabolik aktivitesinin azalmasından kaynaklanmadığını, direnç düzeyinin biyofilmin olgunlaşması ile de artış gösterdiğini bildirmişlerdir (Chandra, Kuhn, ve ark., 2001).
- 3) Antifungal tedavi başarısızlığına neden olan ve özellikle kronik enfeksiyonlarda önem kazanan bir diğer mekanizma da inatçı hücrelerdir. İnatçı hücreler, antimikrobiyal varlığında eradike olmayan ve üreme hızlarını yavaşlatarak hayatta kalan hücrelerdir. Yapılan çalışmalar inatçı hücrelerin planktonik hücre formlarında gözlenmeyip sadece biyofilm içinde bulunduğunu göstermektedir. İnatçı hücreler fenotipik varyantlar olup mutasyon göstermemektedirler (Sellam ve ark., 2009). *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinde maya hücrelerinin küçük bir kısmının amfoterisin B'ye yüksek düzeyde dirençli olduğu bildirilmiştir (Yücesoy, 2005). Antifungal tedavi sırasında inatçı hücrelerin seçilerek hayatta kalması rekürren enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Murray ve ark., 2007).
- 4) Direnç gelişimi için biyofilm yapısının olgunlaşması şart değildir ve tutunma aşamasında bile direnç tetiklenmektedir (A. Kalkancı, 2003). Yüzeye tutunma, antifungal direnç durumunu etkileyen genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir. Bunlar arasında hücre zarındaki sterol çeşidi ve miktarını düzenleyen genler, hücre duvarında ve ECM'de bulunan glukan miktarını düzenleyen genler ve atım pompası genleri sayılabilir. Biyofilmdeki inatçı hücrelerde *ERG1*, *ERG25*, *SKN1* ve *KRE1* genlerinin düzenlenmesinde değişiklik gözlenmiş, hücre zarı ve hücre duvarının içeriğinde değişiklikler olabileceği belirtilmiştir (Yücesoy, 2005). Kuhn ve ark., *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinin ekinokandin grubunda yer alan kaspofungin ve mikafungine duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Ekinokandin grubu antifungaller *Candida* hücre duvarında önemli yere sahip olan β -1,3-glukanın sentezini inhibe etmektedir. Bu polisakkaridin aynı zamanda biyofilm matriksi içinde de yer aldığı bilinmektedir (Bourgeois ve ark., 2010). Yüzeye temasla aktive olan *Mkc1* ("mitogen activated protein kinase") proteini hif oluşumu ve biyofilmin oluşabilmesi için gerekli görünmektedir. *Mkc1* mutantlarında zayıf bir biyofilm gelişebilse de, biyofilm

flukonazole direnç gösterememektedir (Kalkancı, Yalınay, Mansuroglu, & Kustimur, 1999).

- 5) Antifungal dirençte atım pompalarının da rolü olabilmektedir. *Candida* türlerinde CDR (candida drug resistance) ve MDR (multi drug resistance) genlerince kodlanan ABC (“ATP-binding cassette”) ve MFS (“Major facilitator superfamily”) taşıyıcılarının antifungal direncinde rol oynadığı bilinmektedir. Biyofilm gelişimi sırasında bu genlerin ekspresyonunda artış olmaktadır (Sellam ve ark., 2009). Mateus ve ark (Matthews, Berendt, McNally, & Byren, 2009), yaptıkları çalışmalarda *Cdr1* ve *Mdr1* atım pompası genlerindeki mutasyonların biyofilmin flukonazole duyarlılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Mukherjee ve ark. ise, bu iki genin erken fazda içindeki hücrelerde planktonik hücrelere göre daha fazla eksprese olduklarını bildirmişlerdir. Bu genlerin birinde ya da ikisinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda biyofilmin antifungal ilaçlara direncinde azalma olmakla birlikte direnç devam etmektedir. Bu durum, biyofilimde gözlenen antifungal direncin birden fazla mekanizmadan kaynaklandığı hipotezi ile uyumludur (Kuhn ve ark., 2003).
- 6) *Candida* biyofilminde görülen direnç mekanizmaları biyofilmin fazına göre değişmektedir. Azol direncinde erken fazda atım pompaları ön planda iken, geç fazda sterol içeriğindeki değişiklikler önem kazanmaktadır (Yücel & Kantarcıoğlu, 2000). Biyofilmin olgunlaşma sürecinde değişen membran sterol kompozisyonunun amfoterisin B ve azollere olan duyarlılığı etkilediği belirtilmektedir (Inweregbu, Dave, & Pittard, 2005).

1.5. Polimikrobiyal Biyofilmler

Hastalıkların çoğu, kültür bağımlı izolasyon tekniklerinin yoğun kullanımı nedeniyle doğada monomikrobiyal olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, kültürden bağımsız bakteri idantifikasyon metodolojilerinin ortaya çıkmasıyla, birçoğu, ağız içi enfeksiyon hastalıkları, otitis media, diyabetik ayak yarası enfeksiyonları ve kistik fibrozlu hastalarda akciğerdeki kronik enfeksiyon gibi polimikrobiyal enfeksiyonlar giderek daha fazla tanınmaktadır. Bu durumlarda, mikrobiyal popülasyonların bileşimi, hastalığın ciddiyetini ve sonucunu gösterir (Peters, Jabra-Rizk, ve ark., 2012). Polimikrobiyal biyofilm toplulukların çoğunluğu, biyotik ve abiyotik bölgelere bağlı kompleks halinde

gelişmektedir. Polimikrobiyal biyofilm toplulukları, bir faz veya yoğunluk arayüzeyinde mevcut olan ve sıklıkla polisakkaridden oluşan ve kendinden ve/veya konaktan türetilmiş hidratlı bir matriks içerisinde kaplı olan çeşitli organizmalar (mantarlar, bakteriler ve virüsler) topluluğu olarak tanımlanabilmektedir (Donlan & Costerton, 2002).

Polimikrobiyaller süspansiyondaki sekonder bir kolonizer bir biyofilm yüzeyindeki spesifik moleküllere bağlanır ve pıhtılaşma kademesini başlatır ya da birkaç bakteri, biyofilm üzerinde daha fazla pıhtılaşmayı teşvik eden fenotipik değişikliklerle sonuçlanan bir agregat oluşturur. Planktonik (veya serbest yüzer) durumdan sessiz duruma geçtikten sonra, eklenen mikroorganizmalar genlerini ve protein ifadelerini kökten değiştirmeye başlar. Hem bakteri hem de mantar yüzeylerinde pıhtılaşmayı düzenleyen ligand-reseptör etkileşimlerinin çeşitliliği oldukça fazladır. Farklı bakteri, mantar ve viral patojen grupları tarafından oral kolonizasyonun karmaşıklığı, ilerlemesi ve kinetiği tamamen açıklanmamasına rağmen, birçok oral hastalığın doğada polimikrobiyal olduğu açık olarak tanımlanmıştır (Peters, Jabra-Rizk, ve ark., 2012).

1.5.1. *Candida* ve *Staphylococcus* türleri Polimikrobiyal Biyofilmi

Candida türleri biyofilmler içinde birlikte çoğaldığında bakteriler üzerinde olumlu bir etkiye sahip görünmektedir. Örneğin, *C. albicans*, *S. epidermis* gibi çeşitli bakteri türlerinin bağlanmasını ve büyümesini kuvvetle artırır (El-Azizi, Starks, & Khardori, 2004). *C. albicans* ve *S. aureus* arasında spesifik moleküler etkileşimler gösterilmiştir (Peters, Ovchinnikova, ve ark., 2012). *C. albicans* ve stafilokoklar arasındaki etkileşimlerin, vankomisine karşı stafilokok direncinde önemli bir artış sağladığı bulunmuştur (Harriott & Noverr, 2009).

C. albicans, karışık bakteriyel-fungal enfeksiyonlardan en sık izole edilen mantar patojenidir. *C. albicans* ile etkileşime girerek biyofilm enfeksiyonuna neden olduğu anlaşılan yaygın bakteri türleri olsa da polimikrobiyal enfeksiyon analizlerinin çoğu, büyük ölçüde immün sistemi baskılanmış hastalarda meydana gelen gözlemsel çalışmalarla sınırlıdır. İmmün yetmezliği olan bireylerin, enfeksiyonlar ve birçok ek tıbbi risk faktörü ile karşı karşıya kaldıklarında, bu polimikrobiyal etkileşimlerin hastaların klinik prognozu üzerindeki derecelerini değerlendirmek zordur (Peleg, Hogan, & Mylonakis, 2010). *Staphylococcus* ve *Candida*'nın polimikrobiyal enfeksiyonlarının hayvan modellerinde yüksek mortalite görülmesine rağmen, mortalite ve morbiditenin artma mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (Douglas, 2003).

S. epidermidis'te biyofilm oluşumu, *S. aureus*'ta biyofilm oluşumu ile eşdeğer değildir. *S. epidermidis* ile karşılaştırıldığında, *S. aureus*, ön kaplama ve besin takviyesi gerektirir ve, abiyotik yüzeylerde kolayca biyofilm oluşturamaz. Bununla birlikte, *S. aureus*, mortalite oranlarının daha yüksek olduğu, tıbbi cihazla ilişkili sistemik enfeksiyona yol açan önemli bir patojendir.

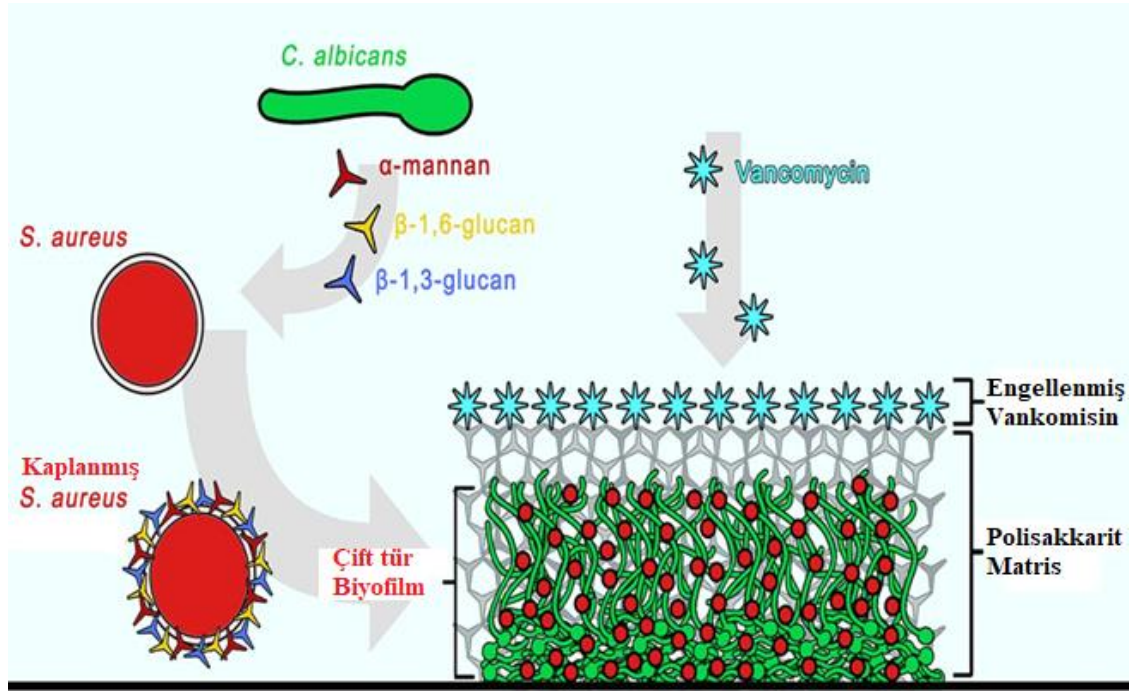
***Candida* ile *S. aureus* biyofilmi**

Stafilokoklar klinik biyofilmlerden en sık izole edilen organizmalardır ve ABD'de hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık nedenidir (Wisplinghoff ve ark., 2004). *S. aureus*, diğer bazı stafilokok türleri kadar kolay biyofilmler oluşturmamasına rağmen, genellikle daha yüksek ölüm oranlarına neden olur (Jones ve ark., 2007). Benzer şekilde, *C. albicans*, cihaza bağlı biyofilmlerden daha sık izole edilen organizmalardan biridir ve bir kez sistemik hale geldiğinde yaklaşık % 40 ölüm oranına sahip olabilir (Wey ve ark., 1988). Klinisyenler için önemli endişe verici olan, bu iki patojenik türün bir karışımını içeren polimikrobiyal biyofilmlerin tespitinin artmasıdır (Shirliff, Peters, & Jabra-Rizk, 2009). *Candida*'nın çeşitli stafilokoklar veya streptokoklarla birlikte eklendiğinde abiyotik yüzeylere daha etkili bir şekilde yapıştığı bulundu ve bu etkileşimin polisakkarit reseptörleri arasındaki spesifik etkileşimlerin aracılık ettiği bulundu (Millsap, Bos, van der Mei, & Busscher, 1999).

C. albicans'ın oluşturduğu biyofilm, polimikrobiyal olarak *S. aureus* ile birlikte biyofilm tabakasında yer alabilir, bu durum genellikle immün suprese bireylerde gerçekleşir (Schlecht ve ark., 2015). *S. aureus*, *C. albicans*'ın hifasına kuvvetli bir şekilde yapışabilir, ancak maya şekline yapışmaz. Bu etkileşime, hifal spesifik proteini Als3 aracılık eder ve hem *C. albicans* hem de *S. aureus* bu yakın fiziksel etkileşimden faydalanabilir (Peters, Ovchinnikova, ve ark., 2012).

Kong ve ark., *C. albicans* - *S. aureus* biyofilmlerinde, *C. albicans* biyofilm matrisinin – özellikle de salgılanan ekzopolimerik β -1,3 glukanın - antibakteriyel antibiyotiklere karşı yüksek tolerans derecesine sahip bakteriyel hücrelerin verilmesinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Kong ve ark., 2016). *C. albicans*'lar hiflerinin ve de hücre duvarından salınan polisakaritlerin karışık biyofilm ortamına salgıladığı α -mannan, β -1,6-glukan ve β -1,3-glukan'lar ile *S. aureus* hücre duvarının dış tabakası kaplayarak yapışır

(Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Karışık biyofilm içindeki *S. aureus*'un vankomisin'e artmış tolerans mekanizması olarak önerilen bariyer modelinin şematik gösterimi (Kong ve ark., 2016).

***Candida* ile *S. epidermidis* biyofilmi**

Bakterilerin implanta yapışması ve bir biyofilm oluşturma kabiliyeti patojenite ile ilgilidir (Saginur ve ark., 2006). Bazı *S. epidermidis* türleri, bakterilerin polisakaritler, proteinler ve teikoik asitten oluşan hücre dışı polimerik maddeleri (EPS) salgılayarak biyofilm oluşturma kabiliyetini artırabilir (Adam, Baillie, & Douglas, 2002).

Polimikrobiyal biyofilmler, tek tür *S. epidermidis* biyofilmlerine kıyasla daha fazla organizmaya ve hücre dışı maddeye sahiptir. *C. albicans*, *S. epidermidis*'in vankomisine ve *C. albicans*'ın flukonazol (Harriott & Noverr, 2010) ve amfoterisin B'ye karşı korunmasına izin veren çok parçalı bir biyofilm oluşturur.

S. epidermidis ve *C. albicans* mikroorganizmalarının her ikisinde de eş zamanlı organizmalar olarak bulunurlar ve sıklıkla immün yetmezliği olan hastalarda fırsatçı patojenler olarak biyofilmlerde bir arada oldukları gösterilmiştir (Lin ve ark., 2013). Bu kombinasyon polimikrobiyal biyofilmleri genel antimikrobiyal tedavilere karşı özellikle dirençli kılar. Spesifik olarak, çok alem (kingdom) fungal-bakteriyel biyofilm, önemli EPS üretimi varlığında antimikrobiyal tedaviye daha dirençli olabilir (Davies, 2003). Bu artmış direnç, biyofilm organizmalarını ilaçların penetrasyonundan koruyan kalın EPS tabakasının varlığından kaynaklanmaktadır.

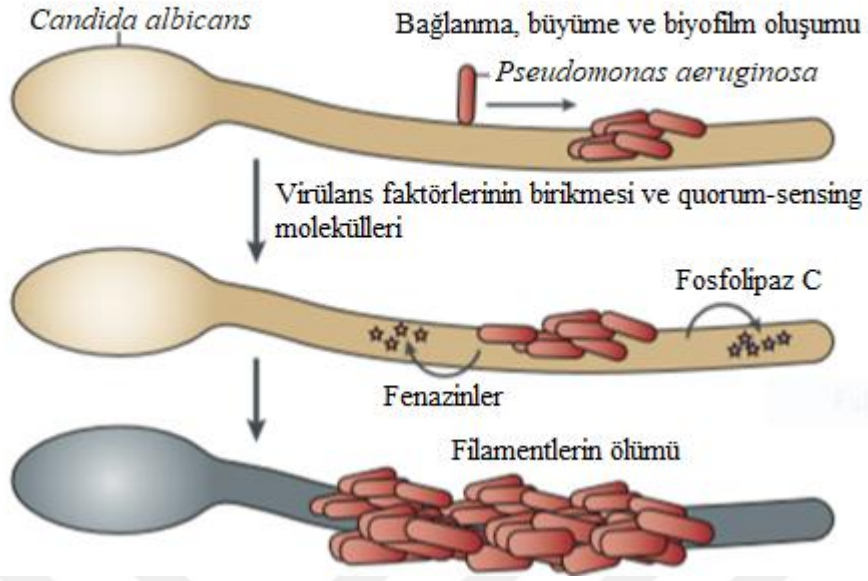
Yapılan bir çalışmada *S. epidermidis* spesifik primerleri (*lrgA*, *lrgB* ve *bap*) kullanarak ekstrakte edilen biyofilm matriksindeki bakteri eDNA'sının miktarının belirlenmesi, *S. epidermidis* ve *C. albicans*'ın karışık türdeki biyofilmlerinde *S. epidermidis* ve *C. albicans*'ın tekli türlerinin biyofilmlerinde belirgin şekilde artmış olduğunu göstermiştir (Pammi ve ark., 2013).

C. albicans ve *S. epidermidis*'in EPS üreten suşları arasındaki etkileşimi incelemek değerlidir çünkü etkileşimleri biyofilm ilaç direncinde rol oynar ve EPS üretimi stafilokokal patojenite için önemlidir.(Adam, Baillie, & Douglas, 2002). Bir çok çalışma alem (kingdom) biyofilminde, *S. epidermidis*'in bir wild-type suşu (RP62A) üreten bir EPS'nin flukonazolün penetrasyonunu bloke ettiğini, bununla birlikte metabolik aktivite üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir.

1.5.2. Candida ve Pseudomonas Etkileşimleri

Bakteriyel virülans için önemli olan genleri içeren *C. albicans* ve *P. aeruginosa* arasında patojenik bir ilişki tarif edilmektedir. *P. aeruginosa* topraklarda yaygındır ve sıklıkla sağlıklı bireylerin cilt ve mukozasında bulunur (Palleroni, 2003). Bununla birlikte, immün sistemi baskılanmış konaklarda *P. aeruginosa* yanıklar, kateterler ve implantlarla ilişkili ciddi enfeksiyonlara neden olmak için virülans faktörlerini kullanır *C. albicans* cilt ve mukozal floranın iyi huylu bir üyesidir. Bununla birlikte, immün sistem baskılandığında *C. albicans*, ciddi hastalıklara yol açabilecek istilacı büyümeyi başlatır (Odds, Nuffel, & Gow, 2000). Konakta, *C. albicans* hem maya formunda hem de filamentli hücreler olarak mevcuttur ve filamente neden olma yeteneği virülansı için önemlidir (Palleroni, 2003). Bazı çalışmalar *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'ın insan vücudunda birbirleriyle etkileşime girdiğini göstermektedir (Kerr ve ark., 1999). *P. aeruginosa* ve *C. albicans* arasındakiler gibi bakteriyel-mantar etkileşimlerinin moleküler bir bakış bakteriyel patogenez ve mikrobiyal ekoloji arasındaki arayüzü daha etkin bir şekilde keşfetmemize izin verebilir.

Bazı deneylerde *P. aeruginosa* ve *C. albicans* kültürlerinin karıştırılmasından sonra, *P. aeruginosa* tarafından fosfolipaz C ve fenazinlerin üretilmesi *C. albicans* filamentlerinin ölümüne yol açar (Peleg, Hogan, & Mylonakis, 2010).



Şekil 1.5. *P. aeruginosa* ve *C. albicans* arasındaki moleküler mekanizmaların etkileşimleri (Peleg, Hogan, & Mylonakis, 2010)'den alınmıştır).

Maya formu ve filamentli *C. albicans*'ın hücre duvarlarındaki farklılıklar, muhtemelen *P. aeruginosa*'nın *C. albicans*'ın hifal filamentlerine seçici bir şekilde bağlandığını açıklamaktadır. *P. aeruginosa*'nın *C. albicans*'ın hifal gelişimini modüle eden 12-karbonlu bir asil homoserin laktonu salgıladığı bilinmektedir. Sonuçta biyofilm oluşumu, *C. albicans* filamentli hücrelerinin ölümüne neden olur, ancak maya hücreleri canlı kalır (Hogan & Kolter, 2002). Aslında, *P. aeruginosa* tarafından salgılanan faktörlerin varlığı, yapışma ve biyofilm oluşumunda yer alan genlerin regülasyonunu azaltır ve CDR1 ve SNQ2 gibi efflux pompalama sistemi kodlayan genlerin ekspresyonunu ve biyofilm dispersiyonunda yer alan bir proteini kodlayan YWP1 genini eksprese eder. *C. albicans* biyofilmlerinde *C. albicans* üzerindeki bu olumsuz etki, *P. aeruginosa*, 3-okso-C12 homoserin laktonu tarafından üretilen ve salgılanan bir algılayıcı molekülle ilişkilidir (Holcombe ve ark., 2014). Öte yandan, *C. albicans* tarafından üretilen farnesol, hücre dışı proteaz, hidrojen siyanid ve redoks aktif fenazinlerin üretimini düzenleyen *Pseudomonas*'tan azalan bir kinolon sinyaline yol açar. İn vitro çalışmalarda, *C. albicans*'ın biyofilmi *P. aeruginosa* tarafından baskılandığı, aynı zamanda *P. aeruginosa* biyofilminin de *C. albicans* varlığında inhibe olduğu gösterilmiştir (Keceli Ozcan, Dundar, & Sonmez Tamer, 2012).

2. AMAÇ

Biyofilmler, neden oldukları ciddi klinik enfeksiyonlar nedeniyle büyük öneme sahiptir. Özellikle yerleştirilmiş çeşitli tıbbi cihazlar (damar içi kateterler, uriner kateterler, kalp pili, vasküler greftler, santral sinir sistemi şantları, eklem protezleri v.s.) daki biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ciddi mortalite ve morbiditeye yol açmaktadır. Örneğin, *Candida* biyofilm enfeksiyonları, başarıyla tedavi edilmediği takdirde yüksek mortalite riski olan invazif fungal enfeksiyonlar ile sonuçlanabilir (Taff ve ark., 2012).

Candida enfeksiyonları tüm dünyada giderek artmaktadır. Bu enfeksiyonlar özellikle yoğun bakım hastalarında en sık görülen enfeksiyonlar arasında dördüncü sırada yer almaktadır (Bajwa & Kulshrestha, 2013). Fakat asıl ölümcül olan ve tedavide zorluk yaratan hematolojik-onkolojik hastalarda görülen invazif *Candida* enfeksiyonudur. İnvazif kandidiyazise neden olan en sık etken *Candida albicans*'tır. Özellikle nötrofil sayısının çok düşük olduğu hastalarda invazif kandidiyaz ölümcül olmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda *C. albicans*'ın oluşturduğu biyofilmin antifungallerle tedavisinin etkinliği araştırılmıştır.

Belçika'da yapılan bir çalışmada deneysel hayvan modelinde *C. albicans* kateter enfeksiyonu oluşturularak tedavide flukonazol ve anidulafungin kullanılmıştır. Anidulafungin tedavisinin *C. albicans* biyofilminde flukonazol tedavisine göre daha etkili olduğu gözlenmiştir (Kucharikova ve ark., 2010). Bu nedenle, çalışmamızda *in vivo* deney sonuçlarının daha güvenilir olduğunu varsayarak anidulafunginin denenecek olan antifungaller içerisinde yer alması planlanmıştır. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda deneyler *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir.

Anidulafunginin *C. albicans* biyofilmine etkisi *in vitro* antifungal duyarlılık testleri ile saptanmıştır. *C. albicans* biyofilmine etkinliği biyofilm hücrelerinin MİK değerlerinin planktonik hücre MİK değerlerine göre daha düşük olmasından anlaşılmıştır (Jacobson ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda aynı yöntemle anidulafunginin *C. albicans* biyofilmine etkinliği araştırılmasının yanı sıra *C. albicans*-*S. epidermidis* ve *C. albicans*-*P. aeruginosa* biyofilmine etkinliği de araştırılmıştır. Literatürde bu konuda bilgi bulunmamaktadır.

Antifungal olarak Amfoterisin B, vorikonazol ve flukonazolün *Candida* biyofilmine etkinliği ve amfoterisin B ile vorikonazol kombinasyonunun tek başına antifungal tedavisinden daha etkili olduğu MİK değerlerinin karşılaştırılması ile gösterilmiştir (Ibrahima ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda ise flukonazol yerine anidulafungin denenmiştir.

Hastalarda oluşan ateşin nedeni, sadece bakteriyel enfeksiyon olmayıp, bu enfeksiyon üzerine eklenmiş fungal enfeksiyon da olabilmektedir. Ayrıca, bu hastalarda bakteriyel enfeksiyon veya invazif kandidiyazis klinik belirti ve bulgularının ayırt edilmesi çok zordur çünkü her ikisi de klinik olarak sepsis tablosuna yol açabilmektedir. Bu nedenle, bu hastalar bakterilere karşı antibakteriyel ve invazif kandidiyaza yönelik de antifungaller ile aynı anda tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Enfeksiyona yol açan bakteriye yönelik doğru antibiyotik kullanımının önemi arzetmekle beraber, bu antibiyotikle birlikte hangi antifungal kullanılması tedavide daha etkili olacağını belirlemek de merak konusudur.

P. aeruginosa ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmi invazif kandidiyaz olgularında birlikte görülebilmektedir. Her iki biyofilmin olduğu enfeksiyonlarda antifungal ve antibiyotik kullanımının etkisi net olarak aydınlatılmamıştır (Park ve ark., 2014). Bu nedenle çalışmamızda *C. albicans* tedavisine yönelik antifungal ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu bakteriyel enfeksiyon tedavisine yönelik meropenem tedavisinin *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilmine etkisi araştırılmıştır.

Ekinokandin türevi kaspofungin antifungalinin meropenem antibiyotik ile beraber kullanıldığında tedavide etkinliğin arttığı, yani sinerjistik etkinin bulunduğu gösterilmiştir (Ozcan ve ark., 2006). Bu sinerjinin gösterilmesi çalışmalarımızın devamında invazif kandidiyaz tedavisinde yeni bir antifungal olarak kullanılmaya başlanan anidulafunginin de böyle bir sinerjizme sahip olabileceğini akla getirmiştir. Bu nedenle, planladığımız bu çalışmada anidulafungin ile meropenemin birlikte kullanımının *C. albicans*-*P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilmindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

S. epidermidis ile *C. albicans*'ın birlikte oluşturduğu biyofilminin incelendiği bir çalışmada, antifungallerin etkisinin azaldığı görülmüştür (Adam, Baillie, & Douglas, 2002). Bu çalışmada antifungal olarak azol grubundan flukonazol ve antibiyotik olarak da vankomisin denenmiştir. Bizim çalışmamızda ise antifungal olarak azol grubundan vorikonazol, antibiyotik olarak ise vankomisin yerine daptomisin denenmesi amaçlanmıştır.

Son yıllarda *S. epidermidis* biyofilmi kaynaklı kateter enfeksiyonlarında daptomisin etkin olduğu gösterilmiştir (Stewart, Davison, & Steenbergen, 2009). Bu nedenle, çalışmamızda vankomisin yerine daptomisin kullanılması planlanmıştır. Daptomisini diğer bir seçme nedenimiz ise bu antibiyotik biyofilme vankomisinden daha etkili olmasıdır. Ayrıca, daptomisin etkinliğinin *C. albicans* ve *S. epidermidis* biyofilmindeki etkisinin araştırılması yeni bir araştırma konusudur.

Bizim alışmamızda, *C. albicans*'ın tek başına veya *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* ile beraber oluşturduğu biyofilmin antifungallere ve antifungallerle birlikte antibiyotiklere etkinliği araştırılmıştır. Çalışmamızda, tedavide yaygın olarak kullanılan antifungallerle birlikte hangi antibiyotiğin kullanılmasının tedavide daha etkili olacağının saptanması hedeflenmiştir.



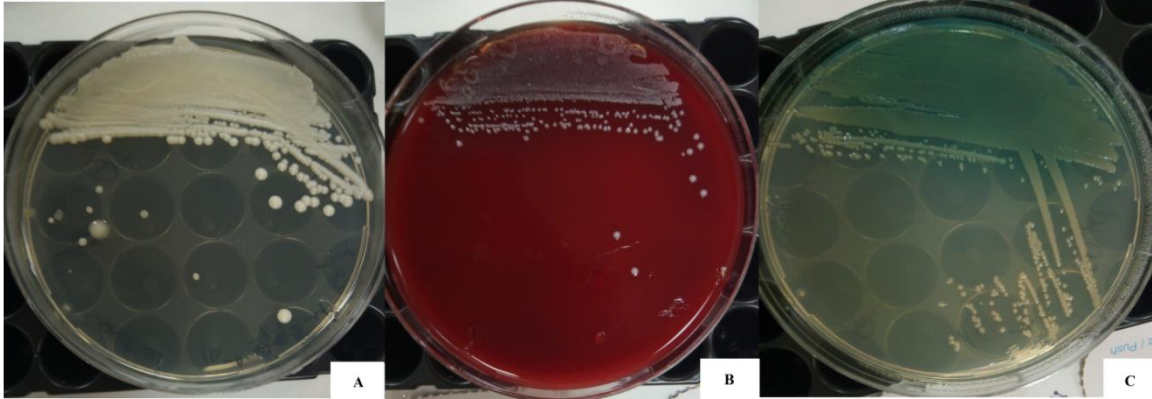
3. YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC) standart bakteri suşları olan *S. epidermidis* ATCC 35984, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 90028 mantar suşları kullanılmıştır. Bu suşların -80 °C'deki stok kültürleri çıkarılarak besiyerlerine pasajlanmış ve deneylerde bu canlandırılmış suşların kolonileri kullanılmıştır.

15 ml'lik falkon tüpü içerisinde *S. epidermidis* ATCC 35984 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri olan suşlar 10 ml Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya) da 24 saat, *C. albicans* ATCC 90028 mantar suşu ise 10 ml Sabouraud Dextrose Broth (Merck, Almanya) sıvı besiyeri kullanılarak 48 saat 37 °C'de (Hettich, Almanya) inkubasyona bırakılmıştır.

İnkubasyon süresi sonrasında üremiş olan mikroorganizmalar, uygun katı besiyeri seçip ekim işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, *C. albicans* suşu Sabouraud Dextrose Agar'a (Merck, Almanya), *S. epidermidis* Koyun Kanlı Agar'a (Salubris, Türkiye) ve *P. aeruginosa* Müeller-Hinton Agar'a (Merck, Almanya) ekilmiştir. Agar plaklarda üretilen suşlar gliserinli tripticase soy broth boncuklu saklama besiyerine koyulup daha sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere - 80 °C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.1. Mikrororganizmaların plakta üremesi (A) *C.albicans*, (B) *S.epidermidis*, (C) *P.aeruginosa*.

3.2. Biyofilm Oluşum Deneyi Öncesi Besiyerlerinin, Tampon Çözeltilerin ve XTT Maddesinin Hazırlanması

Biyofilm oluşturma deneylerine geçmeden önce aşağıdaki hazırlıklar yapılmıştır.

3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.1.1. RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) Besiyeri

Çalışmamızda *C. albicans*'ın biyofilm deneylerinde L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve fenol içermeyen toz halinde RPMI (Sigma -Aldrich, Almanya) besiyeri kullanılmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. RPMI besiyerinin hazırlanması.

Formül (200 ml için):

| | |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| RPMI toz | 2,2 gr |
| Tampon Çözeltisi MOPS (Sigma -Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) | 6,9 gr |
| D-glukoz anhidroz (Merck, Almanya) | 4 gr |

Besiyerinin hazırlanmasında kullanılacak olan distile su öncelikle sterilize edildi. Steril distile su ısıtılarak 50°C'ye getirildi. Daha sonra içerisine RPMI, MOPS ve D-Glukoz anhidroz eklendi. Bu karışım homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra pH 7,0'a ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 0,22 µm çaplı membran filtrelerden (Sartorius, Almanya) geçirilerek sterilize edildi ve steril başka bir cam şişeye aktararak kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.1.2. Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besiyeri

Çalışmamızda *C. albicans*'ın üremesi ve saflaştırılmasında uygun besiyerlerinden biri olan Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyeri kullanılmıştır. Yeast Peptone Dextrose broth (Becton Dickinson, Almanya) üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyerinin hazırlanması.

Formül (1000 ml için):

| | |
|---------------|--------|
| Maya Ekstresi | 10,0 g |
| Pepton | 20,0 g |
| Dekstroz | 20,0 g |

50 g YPD toz besiyeri tartıp 1 L distile suya konuldu. İyice karıştırıldı. Sudaki toz besiyeri 1 dakika içerisinde ısıtıp tamamen çözülmesini beklendi. Sıvı besiyeri 121 ° C’de 15 dakika otoklavlandı. Steril edilmiş sıvı besiyeri yeni steril kapaklı cam şişesinde kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

3.2.1.3. Brain Heart Infusion (BHI) Sıvı Besiyeri

Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI), aerobik ve anaerobik bakteriler, maya ve çeşitli küfler için kullanılan genel amaçlı bir sıvı besiyeridir. Çalışmamızda bu besiyeri *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* ile yapılan deneylerde kullanılmıştır. Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan maddeler Tablo 3.3. de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Brain Heart Infusion (BHI) besiyerinin hazırlanması.

Formül (1000 ml için):

| Bileşenler | Gram / Litre |
|------------------------------------|--------------|
| Buzağı beyinleri (200 g infüzyonu) | 12,5 |
| Sığır eti kalp (250 g infüzyonu) | 5,0 |
| Peptone | 10,0 |
| Sodyum klorür | 5,0 |
| D (+) - Glikoz | 2,0 |
| Disodyum hidrojen fosfat | 2,5 |
| Son pH 7,4 +/- 0,2 (25 ° C’de) | |

37,0 g toz halinde BHI besiyeri 1 litre distile suda süspanse edildi. İyice karıştırıldı. Sudaki toz besiyeri 1 dakika içerisinde ısıtıp tamamen çözülmesini beklendi. 121 ° C’de 15

2-8 dakika otoklavlandı. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için kapaklı şişelere dağıtılıp 2-8 ° C’de saklandı.

3.2.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1. Phosphate Buffered Saline (PBS) Hazırlanması

Phosphate Buffered Saline’de (pH 7,2), sodium klorür mikrobiyal hücrelerin ozmotik korunmasını sağlar; ayrıca fosfatlar, hücre canlılığının korunması için de önemli olan stabil fizyolojik pH değeri sağlar.

Çalışmamızda Phospate Buffered Saline (Sigma -Aldrich, Almanya) tablet olarak kullanılmıştır. Fosfat tampon çözeltisi (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl ve 10 mM (25 ° C’de pH 7,4)) elde etmek için 1 tablet 200 ml steril distile su içinde çözüldü. Hazırlanan PBS tampon steril kapaklı cam şişesinde kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.2.3. Biyofilm Kantitasyonunda Kullanılan XTT Maddesi Hazırlanması

3.2.3.1. XTT ve Menadion Hazırlanması

Çalışmamızda XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (Sigma-Aldrich, Almanya) ve Menadion (Sigma -Aldrich, Almanya) tarafından temin edilmiştir ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır.

XTT, 0,5 g/L’de steril PBS içinde bir çözelti (aliquot) halinde hazırlanıp 0,22 µm bir filtre kullanılarak sterilize edilmiştir. XTT çözeltisi ışığa duyarlıdır, bu yüzden hazırlık ve saklanma sırasında çözeltinin alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Filtre ile sterilize edildikten sonra, 10 ml’lik çalışma hacimlerine bölünüp bir sonraki deneyler için -70 ° C’de saklanmıştır (Pierce, Uppuluri, Tummala, & Lopez-Ribot, 2010) (Pierce ve ark. 2010).

Menadion, % 100 asetonda (Merck, Almanya) 10 mM’luk bir stok çözelti halinde hazırlanmış ve daha sonra küçük hacimlere (yaklaşık 50 µl) bölünüp -70 ° C’de saklanmıştır. XTT / menadion karışımı 10 ml XTT çözeltisi içeren bir tüpe 1 µl menadion stok çözeltisi ekleyerek hazırlanmıştır. Biyofilm kantitasyon işlemine gelindiğinde çok kanallı bir pipet kullanılarak, önceden yıkanmış olan ve biyofilm içeren her bir kuyucuğa 100 µl XTT / menadion çözeltisi eklenmiştir.

3.2.3.2. Antifungallerin ve Antibiyotiklerin Konsantrasyon ve Duyarlılık Aralıkları

Antifungallerin ve antibiyotiklerin standart toz formları kullanıldı. Kullanılan antifungal ajanlar amfoterisin B (Sigma -Aldrich, Almanya), vorikonazol (Sigma -Aldrich, Almanya) ve anidulafungin (Pfizer, Almanya), antibiyotik ajanlar olarak ise daptomisin (Sigma -Aldrich, Almanya) ve meropenem (Sigma -Aldrich, Almanya) idi.

Antifungallerin ve antibiyotiklerin standart toz formlarından 10 mg/ml'lik stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyonların hazırlanmasında çözücü olarak Tablo 3.4. deki çözücüler kullanılmıştır. Antifungallerin ve antibiyotiklerin konsantrasyon ve duyarlılık aralıkları, antifungaller için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (M27-A3), antibiyotikler için (CLSI) M100-S23 rehberi kullanılarak belirlenmiştir. Antifungal stok çözeltilerinin hazırlanmasında standart toz antifungal formları kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Antimikrobiyal ajanların stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler.

| Ajan | Çözücüler |
|---------------|-------------------|
| Amfoterisin B | DMSO |
| Vorikonazol | Steril distile su |
| Anidulafungin | Steril distile su |
| Daptomisin | DMSO |
| Meropenem | Steril distile su |

Antimikrobiyal ajanların konsantrasyon aralıkları aşağıdaki Tablo 3.5. de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Kullanılan antifungal ve antibiyotik ajanların konsantrasyon aralıkları.

| Ajan | Konsantrasyon aralığı (µg/ml) |
|---------------|-------------------------------|
| Amfoterisin B | 0,015-32 |
| Vorikonazol | 0,005-16 |
| Anidulafungin | 0,005-16 |

| | |
|------------|-----------|
| Daptomisin | 0,125- 64 |
| Meropenem | 0,125-64 |

3.3. Biyofilm Oluşturulması

Öncelikle *C. albicans* izolatu için monomikrobiyal biyofilm deneyleri yapılmıştır. Daha sonra da *C. albicans* ile *S. epidermidis* ve *C. albicans* ile *P. aeruginosa*'nın birlikte (polimikrobiyal) biyofilm oluşturma deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Oluşturulması

3.3.1.1. Suşların Saflaştırılması-Zenginleştirilmesi

Stoktan çıkarılan standart *C. albicans*, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* suşları bölüm 3.1. de açıklandığı gibi katı besiyerlerine pasajlanmıştır ve inkübasyon sonrası üreyen kolonilerin biyofilm oluşumunu arttırmak için *C. albicans* Yeast Peptone Dextrose sıvı besiyerinde, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* ise Brain-Heart Infusion sıvı besiyerinde ekimi yapıldı.

Her flaskta *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* için 20'şer ml BHI, *C. albicans* için ise 20 ml YPD sıvı besiyeri konulmuştur. Katı besiyerinde üremiş suşlardan bir öze dolusu alınarak 20 ml sıvı besiyeri içeren flasklara konulmuştur. Daha sonra, flasklar, bir gecede, 30°C'de, 175 rpm orbital çalkalayıcıda (Labnet, Amerika Birleşik Devletleri) inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. Mikroorganizmaların flask içerisinde inkubasyonu.

İnkübasyon sonrası mikroorganizmalar flasktan alıp 50 ml'lik falkonlara aktarılmıştır. Santrifuj işlemi başlamadan önce Santrifuj (Eppendorf, Almanya) 3000 rpm x 5 dakika, 4°C olarak ayarlanmıştır. Falkonlardaki kültür süspansiyonu santrifuje yerleştirilip 5 dak. santrifuj edilmiştir. Dipte çökelti üzerindeki süpernatant sıvı atılıp soğuk halde 20 ml'lik Fosfat Tamponlu Su (PBS) eklendikten sonra vortekslenmiştir (Ika, Almanya) ve daha sonra yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama işlemi iki defa tekrarlanmış ve aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- Santrifuj işleminden sonra çökelti üzerine 20 ml PBS eklenmiştir. Çökelti üzerine birinci ve ikinci yıkama işlemi sırasında 20 ml PBS eklenip homojenizasyon açısından vortekslenmiştir.

- PBS dökülüp çökelti üzerine 20 ml besiyeri eklenerek, homojenizasyon açısından pipetaj yapılmış ve Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanarak her mikroorganizma için gerekli süspansiyon hazırlanmıştır.

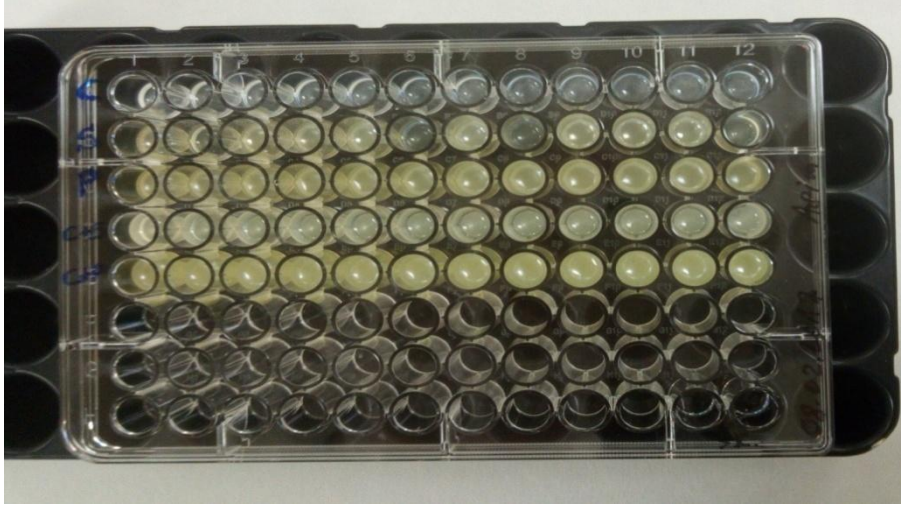
3.3.1.2. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm için İnokulum Hazırlanması

Spektrofotometre kullanarak her bir mikroorganizma için ayrı süspansiyon hazırlanmıştır. *C. albicans* için RPMI besiyeri içerisinde $1,0 \times 10^6$ hücre/mL hazırlanmıştır (Pierce ve ark. 2010), *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* için ise BHI besiyeri içerisinde $1,0 \times 10^7$ hücre/ml hazırlanmıştır (Lown ve ark., 2016 ve Rodrigues ve ark., 2017).

3.3.1.3. ELISA Plaklarında Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilmlerin Oluşturulması

Biyofilm oluşturulması için 96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA (Corning, ABD) plakları kullanılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan monomikrobiyal biyofilm oluşturmak için her bir mikroorganizmadan 100'er mikrolitre alınarak ELISA plaklarına konulmuştur.

Polimikrobiyal biyofilmler oluşturmak için her iki mikroorganizmadan eşit miktarda inokulum aynı kuyucuğa konmuştur. Bölüm 3.3.1.2. de açıklandığı gibi hazırlanan *C. albicans* ve *S. epidermidis* inokulumundan aynı kuyucuğa herbirinden 100'er µl , aynı şekilde *C. albicans* ve *P. aeruginosa* inokulumundan 100'er µl aynı kuyucuğa konulmuştur. Hem monomikrobiyal hem de polimikrobiyal biyofilm oluşturmak için ELISA plakları 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

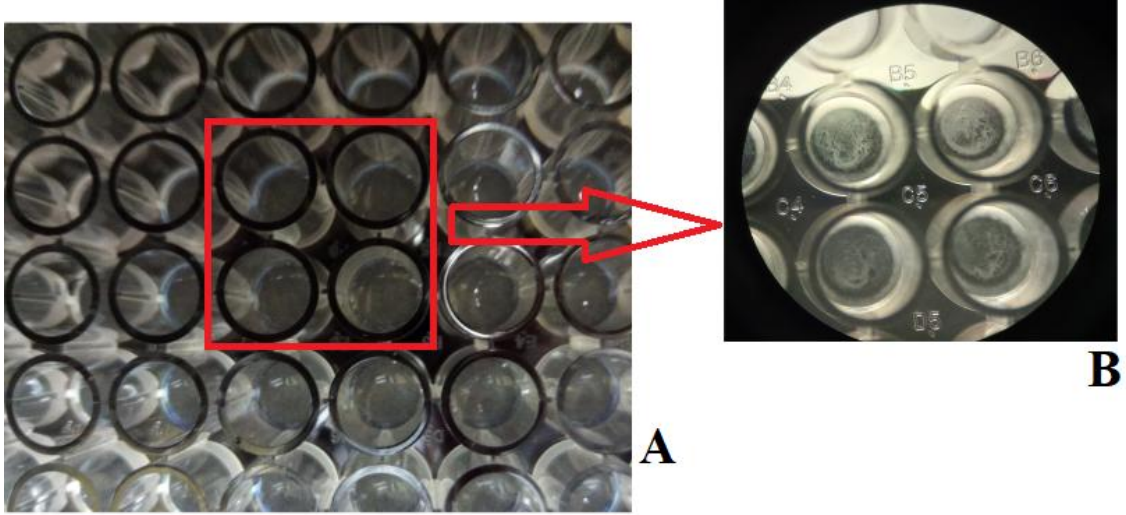


Şekil 3.3. ELISA plaklarında monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilmlerin oluşturulması.

3.3.1.4. ELISA Plaklarında Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilmlerin Yıkama İşlemi

Kantitatif ölçme işlemine geçmeden önce, 24 saat inkübasyon sonrası, 96 kuyucuklu ELISA plaklarında oluşan monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilmine yıkama işlemi uygulanmıştır. Biyofilm oluşumundan sonra, çok kanallı bir pipet kullanılarak, kuyucukların herbirinde oluşan biyofilmlere dokunmadan kuyucuktaki üst sıvı dikkatlice aspire edilmiştir.

Çok kanallı bir pipet kullanarak plakalar içindeki her bir kuyucuğa 200 µl'lik steril PBS ile üç kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkamalar arasında ve özellikle son yıkama işlemi bittiğinde, kalan PBS damlacıklarını çıkarmak için plakalar ters çevirilmiş ve kağıt havlulara vurularak damlacık kalmaması sağlanmıştır. Bu aşamada, kuyucukların dibinde oluşan biyofilmler çıplak gözle bile açıkça görülebilir halde stereo mikroskop (Olympus, Japonya), kullanılarak da aşağıdaki gibi (Şekil 3.3.) görüntülenebilmiştir.



Şekil 3.4. *C.albicans* biyofilmi yıkama işleminden sonra, gözle görünen kuyucukların (A), aynı kuyucuklar stereo mikroskop görüntüsü (B).

Bu haldeki biyofilm XTT kullanarak, biyofilm miktarının (kantitasyonu) belirlenmesi için hazırdır veya bu haldeki biyofilme antimikrobiyal ajan (antifungal/antibiyotik) eklenip XTT ile biyofilmin inhibisyonunu ölçmek mümkündür.

İlk olarak, birkaç kuyucuk kullanılarak, üç mikroorganizmanın biyofilm oluşumu ayrı ayrı doğrulanmıştır. Daha sonra biyofilm üzerinde antifungal/antibiyotik etkisinin test edilme aşamasına geldiğimizde daha fazla kuyucuk kullanılmıştır. Hem monomikrobiyal hem de polimikrobiyal biyofilmlerde her bir mikroorganizma için pozitif kontrol olarak antifungalsız/antibiyotiksiz biyofilm kuyucuğu bırakılmıştır, negatif kontrol için ise XTT eklenmiş besiyeri kullanılmıştır.

3.4. Biyofilm Kantitasyonu

3.4.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Kantitasyonu

Biyofilm miktarının belirlenmesi için daha önce tanımlanan XTT yöntemi uygulanmıştır (Ramage, Vandewalle, Wickes, & Lopez-Ribot, 2001). Bunun için de, XTT absorbans yöntemi kullanılmıştır. Yıkamış ve kurutulmuş 24 saatlik biyofilm içeren ELISA plaklarındaki her bir kuyucuğa pozitif ve negatif kontrol dahil iken XTT/menadion karışımı eklenmiştir. İşlemden önce karanlıkta hazırlanan XTT/menadion karışımından 100 µl alınıp çok kanallı bir pipet yardımıyla her kuyucuğa aktarılmıştır. Kolorimetrik XTT yöntemi kapsamında, XTT maddesi alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C'de 5 saatlik

inkübasyona bırakılmış ve daha sonra XTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan kahverengi formazan ürününün oluşumu araştırılmıştır.



Şekil 3.5. XTT/menadion karışımı eklendikten sonra inkubasyon işlemi.

XTT yöntemi üç farklı biyofilm kantitasyonu aşamasında kullanılmıştır. Bu deney aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Her mikroorganizma için (*C. albicans*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*) mono biyofilminde
2. *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilmi (*C. albicans* ile *S. epidermidis* ve *C. albicans* ile *P. aeruginosa*)
3. Monobiyofilme antifungaller; polimikrobiyal biyofilme antifungaller ve antifungallerin daptomisin ve meropenem antibiyotikleri ile kombinasyonu eklendikten sonra.

ELISA plaklarının 5 saat inkubasyonu sonrası, ELISA plak okuyucusunda (Alisei, İtalya) 490 nm dalga boyunda okutulurak, OD değerleri belirlenmiştir (Park ve ark., 2014). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Son olarak da XTT uygulanan plaklar inverted mikroskopta incelenmiştir.

3.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmamızda antifungal ajanlar olarak amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin kullanılmıştır. Aantibakteriyel ajanlar olarak ise daptomisin ve meropenem aktif toz formları şeklinde kullanılmıştır. Antifungallere ve antifungal-antibiyotik kombinasyonlarına karşı duyarlılık sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu yöntem ile öncelikle biyofilm oluşmadan önceki (planktonik) minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) saptanmıştır. Antifungal duyarlılık testleri CLSI M27-A3 göre yapılmıştır (Arendrup ve ark., 2010). Mikroplak kuyucuklarında, kontrol kuyucuğu ile kıyaslandığında bulanıklıkta belirgin (%80) azalmaya yol açan en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir. Mono *C. albicans* biyofilmi içeren kuyucuklara amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin'in RPMI+MOPS besiyeri içindeki seri dilüsyonları eklenmiştir.

C. albicans ve *S. epidermidis* birlikte oluşturdukları polimikrobiyal biyofilme: 1) amfoterisin B ve daptomisin, 2) vorikonazol ve daptomisin, 3) anidulafungin ve daptomisin ve *C. albicans* ve *P. aeruginosa* birlikte oluşturdukları polimikrobiyal biyofilme: 1) amfoterisin B ve meropenem, 2) vorikonazol ve meropenem, 3) anidulafungin ve meropenem etkinliği Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Her bir antimikrobiyal için Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİKİ) indeksi hesaplanmıştır.

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİKİ) indeksi veya (FIC_i):
 $\Sigma FIC_{a+b} = FIC_a + FIC_b$

FIC_i ≤ 0,5 = sinerjistik, FIC_i = 0,5-1 additif (ek etki), FIC_i = 1- 4 fark yok ve FIC_i >4 ise antagonistik olarak kabul edilmiştir (Rodrigues ve ark., 2017). Biyofilm oluşturulduktan sonra, sesil MİK'ler (SMİK, biyofilmdeki MİK değeri) daha önce tanımlanan yöntem ile mikroplaklarda belirlenmiştir (Shuford, Piper, Steckelberg, & Patel, 2007). Tüm mikroorganizmaların 0,5 McFarland bulanıklığın'daki süspansiyonundan kuyucuklara 100'er µl konulmuştur, aynı süspansiyondan pozitif kontrol için de 12 kuyucuk kullanılmıştır, negatif kontrol olarak RPMI besiyeri kullanılmıştır.

Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra, kuyucuklardaki sıvılar alınarak, kuyucuklar 200 µl, PBS ile üç kez yıkanmıştır. Biyofilm içeren kuyucuklara, RPMI'daki seri dilüsyonlar, yukarıdaki gibi antifungal ve daptomisin veya meropenem olarak 100'er µl eklenmiştir. Antifungal ve antibiyotik (meropenem veya daptomisin) içermeyen kuyucuklara ve negatif kontrol kuyucuğuna 100 µl RPMI konulmuştur.

Mikroplaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaklar PBS ile üç kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µl XTT/menadione karışımı eklenerek plaklar 5 saat daha inkübe edilmiştir.

Mikroplaklar ELISA okuyucusunda 490’nm de okutularak absorbands ölçümü yapılmıştır. Kontrol kuyucuğuna (besiyeri ve mikroorganizma) kıyasla absorpsiyonun %50 ve %80 azalmasına neden olan en düşük konsantrasyon sesil MİK (SMİK) değeri olarak belirlenmiştir.

3.6. Biyofilmin Mikroskopik İncelenmesi

3.6.1. İverted Mikroskop ile *C. albicans* Biyofilmi İncelenmesi

XTT uygulandıktan sonra plaklar inverted mikroskopta (Leica, Almanya) da incelenmiştir. *C. albicans*’ın kuyucuklara antifungal eklenmeden önce ve antifungal eklendikten sonraki biyofilmi inverted mikroskop altında değerlendirilmiştir.

3.6.2. Floresan Mikroskopu ile *C. albicans* Biyofilmi İncelenmesi

C. albicans biyofilm morfolojisinin değerlendirilmesi floresan mikroskopu (Olympus BH-2, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyofilm parçaları ELISA plaklarından alındıktan sonra cam lamlara aktarılıp 1 damla Calcofluor White (0,05% [vol/vol]; Sigma, Almanya) ile boyanmıştır. (Kuhn, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2002). *C. albicans* biyofilmi farklı büyütmede x10, x40, x100’lük antifungal eklenmeden önce ve antifungal eklendikten sonra floresan mikroskopu altında incelenmiştir. Floresan boyama incelemesi İstanbul Çapa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yapılmıştır.

3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskopu ile Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm İncelenmesi

Taramalı Elektron Mikroskopu (TEM) için 24 saatlik biyofilm oluşumunu takiben kuyucuklardaki biyofilm süspansiyonu TEM mikroskopisine uygun küçük kare şeklindeki lamellere aktarımıştır. 24 saat sonra lameller, planktonik hücreleri uzaklaştırmak için PBS (üç kez) ile yıkanmıştır.

Lameller, 2 saat % 2,5 gluteraldehid (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 1 saat sıvı ozmiyum tetroksit (Sigma-Aldrich, Almanya) içinde fikse edilip havada kurutulmaya bırakılmıştır.

Lameller daha sonra % 35 etanol, % 50 etanol, % 70 etanol ve % 95 etanol içinde ardarda 10 dakikalık inkübasyon işlemleri yapıldıktan sonra % 100 etanol içinde 10 dakikalık inkübasyon ile dehidre edilmiştir ve yeniden 20 dakika boyunca havada kurutulmaya bırakılmıştır.

TEM lamelleri tutturulmuş ve altın/paladyum ile kaplanmıştır (Fratesi, Lynch, Kirkland, & Brown., 2004; Harriott & Noverr, 2009).

Örnekler TEM (JOEL JSM-5200, Japonya) yüksek-vakum modunda 15 kV'a x 500, x 1.500, x 3.500'lük farklı büyütmede görüntülenmiştir. Örneklerin bu incelemesi Marmara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı'nda yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel veri analizleri için GraphPad (Prism version 6.01) programı kullanılarak yapılmıştır. Verileri doğrulamak için t-testi kullanılarak analiz edilmiştir. *p* değeri <0,05 olan analizler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda biyofilm kantitasyonu, monomikrobiyal (*C. albicans*) ve polimikrobiyal (*C. albicans* ile *S. epidermidis* ve *C. albicans* ile *P. aeruginosa*) biyofilminde XTT yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra *C. albicans*'ın antifungallere karşı MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir. Ayrıca, *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu monomikrobiyal biyofilmin antifungallere karşı SMİK (Sesil Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir.

Polimikrobiyal biyofilm kantitasyon işlemi yapılmadan önce *S. epidermidis* üzerinde daptomisin, *P. aeruginosa* üzerinde meropenem (CLSI) M100-S23 rehberinde belirtildiği şekilde planktonik MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) belirlenmiştir.

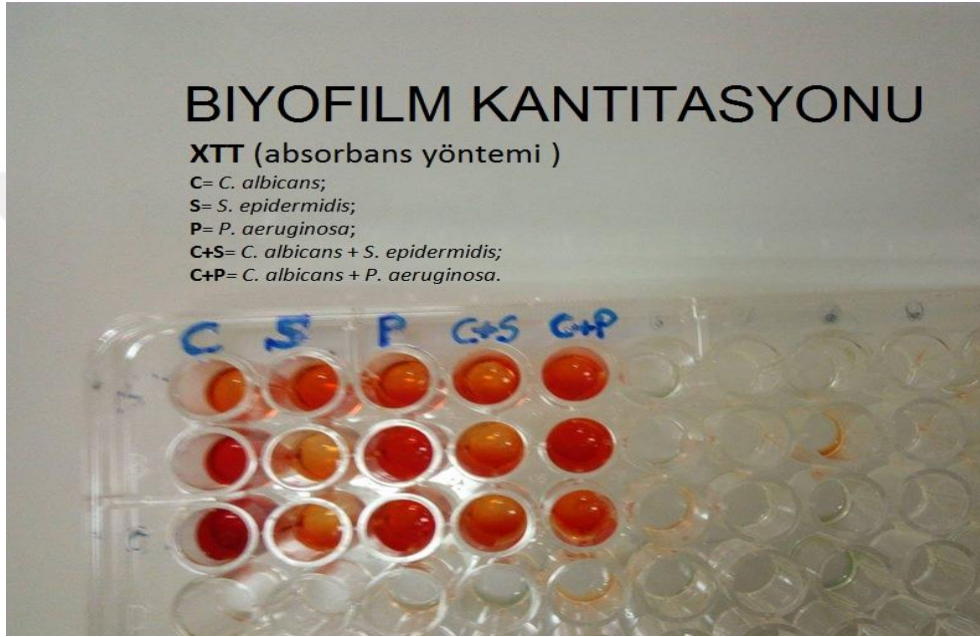
Polimikrobiyal biyofilme karşı antimikrobiyal etkinliğin araştırılmasında test edilen antifungal antibiyotik kombinasyonları şu şekildeydi: *C. albicans* ve *S. epidermidis*'in birlikte oluşturduğu polimikrobiyal biyofilme: 1) amfoterisin B ve daptomisin, 2) vorikonazol ve daptomisin, 3) anidulafungin ve daptomisin; *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'nın birlikte oluşturdukları polimikrobiyal biyofilme ise: 1) amfoterisin B ve meropenem, 2) vorikonazol ve meropenem, 3) anidulafungin ve meropenem.

ELISA plaklarının çukurlarında oluşturulan olgun monomikrobiyal ve polimikrobiyal sesil bakteri ve mantarlar farklı antifungal/antibiyotik kombinasyonlar ile test edilmiştir. Çalışmamızda mantar ve bakterilerden oluşan polimikrobiyal biyofilmlerdeki mikrobiyal birlikteliğin türlerin yaşamındaki etkisi yani sinerjizm sağlaması, inhibisyona yol açması veya nötr etki göstermesi gibi durumların varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla antifungaller ve antifungal-antibiyotik kombinasyonları ile temas sonrası hem monomikrobiyal hem de polimikrobiyal biyofilmlerde yaşayan mikroorganizma sayıları, her biyofilm modelinin kendi kontrol grubundaki MİK değeri ile karşılaştırılmış ve MİK değerindeki artış, azalış veya değişmeme durumu belirlenmiştir.

4.1. Monomikrobiyal ve Polimikrobiyal Biyofilm Kantitasyonu

Biyofilm miktarının belirlenmesi XTT yöntemi ile yapılmıştır. Bu deney kapsamında ilk önce *C. albicans* monomikrobiyal biyofilmi oluşturulmuştur. Daha sonra *C. albicans* ve *S. epidermidis* ile oluşturulan polimikrobiyal biyofilm ile *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'nın yaptığı polimikrobiyal biyofilm incelenmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in tek başına oluşturdukları monomikrobiyal biyofilmleri de incelenmiştir.

Kolorimetrik XTT yöntemi kapsamında, 24 saat inkübasyon sonrasında biyofilm, XTT maddesi ile 37 °C'de 5 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun sonunda XTT'nin indirgenmesi ile oluşan kahverengi formazan ürününün oluşumu araştırılmıştır. Daha sonra plak, ELISA plak okuyucusunda 490 nm dalga boyunda okutularak, OD (optik dansitometre) değerleri belirlenmiştir (Maria E.Rodriguesve ark., 2017). Bu deneyler üç kez tekrarlanmış ve deneylere ek olarak en son XTT uygulanan plaklar inverted mikroskopta incelenmiştir.



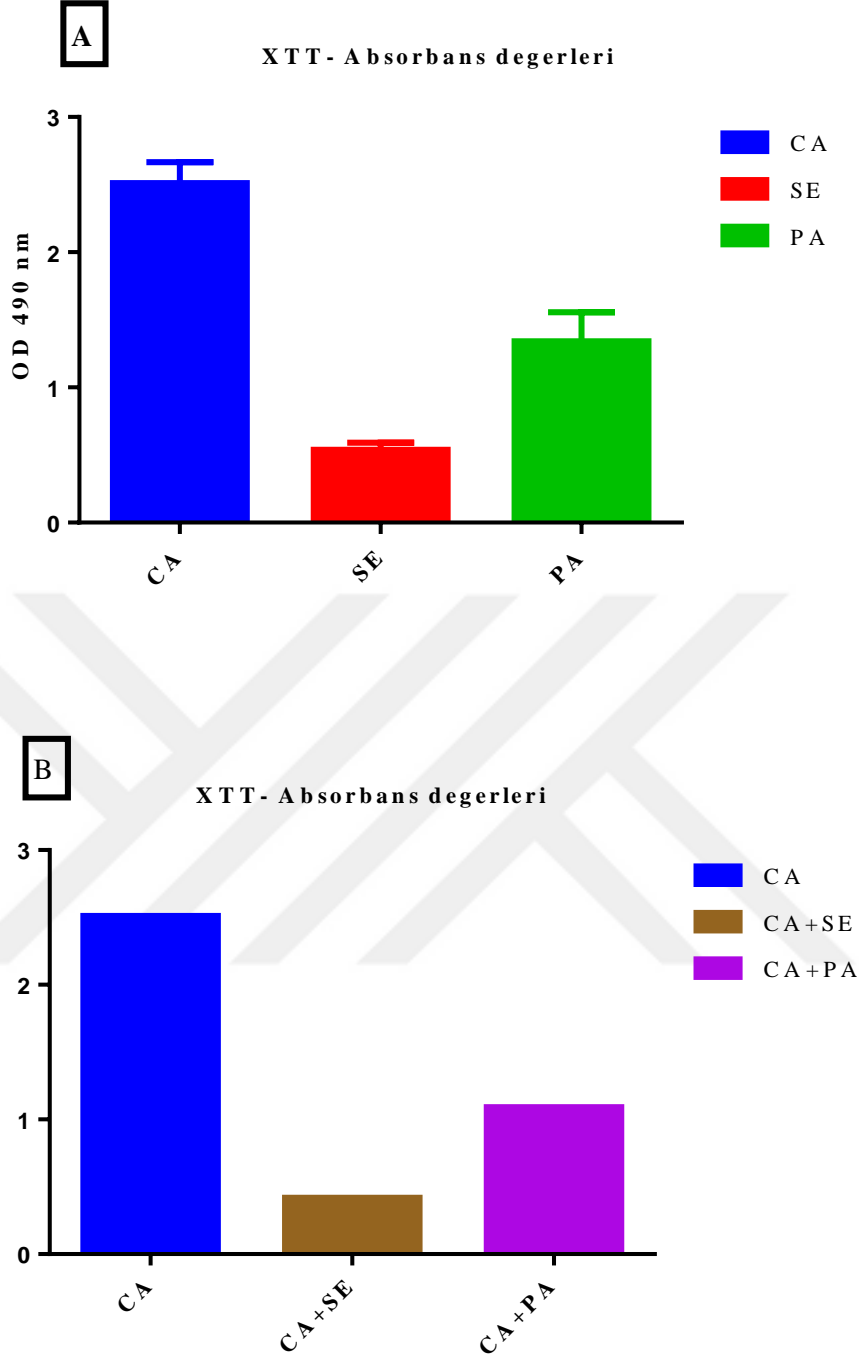
Şekil 4.1. XTT yöntemi ile biyofilm kantitasyon belirleme çalışmasında *C. albicans*, *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in tek başına oluşturdukları biyofilm ile *C. albicans*'ın her iki bakteri ile beraber oluşturdukları polimikrobiyal biyofilmde oluşan görüntü.

Tablo 4.1. XTT yöntemi ile belirlenen biyofilm absorbans değerleri (Optik densite:OD) ve *p* değerleri.

| <i>C. albicans</i> biyofilmi | <i>S. epidermidis</i> biyofilmi | <i>P.aeruginosa</i> biyofilmi | <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> biyofilmi | <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilmi |
|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 2,391 | 0,600 | 1,140 | 0,310 | 1,159 |
| 2,462 | 0,501 | 1,320 | 0,431 | 1,162 |
| 2,684 | 0,513 | 1,567 | 0,521 | 0,956 |
| Ortalama= 2,512 | Ortalama= 0,538 | Ortalama= 1,342 | Ortalama= 0,420 t test ile <i>p</i> değeri 0.0001* | Ortalama= 1,092 t test ile <i>p</i> değeri 0.0002* |

*: *p* değeri *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm ile *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilminin OD değerlerinin karşılaştırılması sonucu elde edilmiştir.

Tablo 4.1.'deki biyofilm değerlerine bakıldığında sırasıyla en fazla biyofilmi *C. albicans*, sonra *P. aeruginosa* ve son olarak da *S. epidermidis*'in oluşturduğu gözlemlenmektedir. *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm miktarına (OD:2,502) kıyasla *S. epidermidis* ile birlikte oluşturduğu biyofilm miktarında (OD:0,420) %83,2 lük bir azalma saptanmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p<0,0001**). Benzer şekilde, *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm miktarına kıyasla, *P. aeruginosa* ile birlikte oluşturduğu biyofilmdeki miktarda (OD:1,092) ise %56,3 lük bir azalma saptanmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p<0,0002**).



Şekil 4.2. XTT yöntemi ile belirlenen biyofilm absorbans değerleri. **A:** Monobiyofilm absorbans değerleri, **CA= C. albicans**; **SE= S. epidermidis**; **PA= P. aeruginosa**; **B:** *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm absorbans değerlerinin **SE** ve **PA** ile birlikte oluşturduğu biyofilm absorbans değerleri ile karşılaştırılması.

4.2. Antifungallerin ve Antibiyotiklerin Planktonik MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Monomikrobiyal ya da polimikrobiyal biyofilm duyarlılık deneylerinden önce *C.albicans*'ın MİK değerleri saptanmıştır. Bunun için öncelik *C.albicans*'ın amfoterisin B, vorikonazol, anidulafungin antifungallerine karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Bu değerler amfoterisin B için 0,5 µg/ml, vorikonazol için 0,25 µg/ml ve anidulafungin için 0,25 µg/ml olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2.).

Bu sonuçlara göre standart *C. albicans* suşunun amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin antifungallerine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.2. *C. albicans*'ın test edilen antifungallere karşı planktonik MİK değerleri.

| Antifungaller | MİK (µg/ml) |
|---------------|-------------|
| AmfoterisinB | 0,5 |
| Vorikonazol | 0,25 |
| Anidulafungin | 0,25 |

S. epidermidis'in daptomisine ve *P. aeruginosa*'nın meropeneme karşı duyarlılıkları test edilmiş ve MİK değerleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Buna göre her iki bakteri bu antibiyotiklere karşı duyarlı bulunmuştur.

Tablo 4.3. Antibiyotiklerin planktonik MİK değerlerinin belirlenmesi.

| Antibiyotikler | Bakteri | MİK (µg/ml) |
|----------------|-----------------------|-------------|
| Daptomisin | <i>S. epidermidis</i> | 0,25 |
| Meropenem | <i>P. aeruginosa</i> | 0,5 |

4.3. *C. albicans* Biyofilminin Antifungal Duyarlılık Test Sonuçları

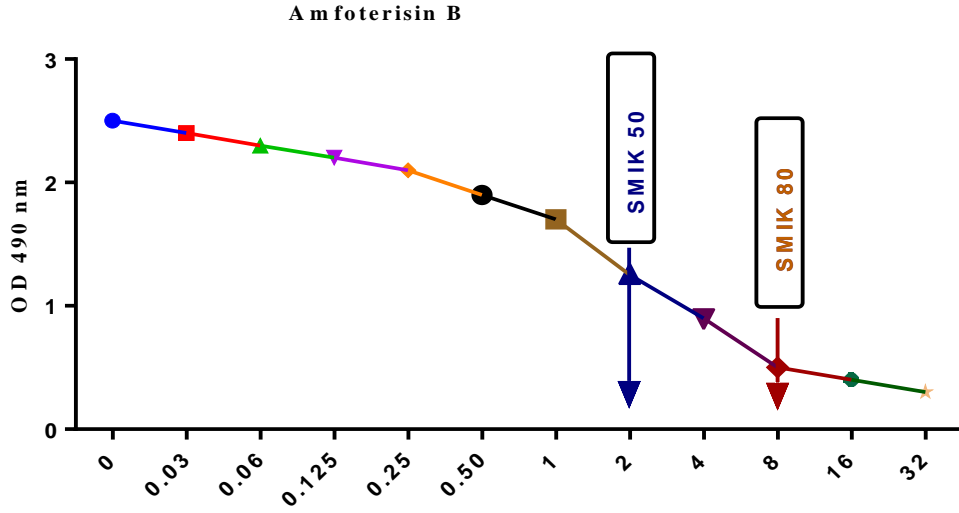
İlk önce monomikrobiyal (*C.albicans*) biyofilm üzerinde çalışılmıştır. Antifungal içermeyen kuyucuk-pozitif kontrol (OD = 2,512) ve biyofilm olmayan kuyucuk ise negatif kontrol (OD = 0,1) olarak belirlenmiştir. *C. albicans* biyofilmi mikrolakta oluşturulduktan

sonra antifungal duyarlılık testi ve hesaplanması standart prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir (Pierce ve ark., 2010), *C. albicans* monomikrobiyal biyofilmi üzerine amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin antifungallerinin etkinliği test edilmiştir ve her antifungal için % 50 ve % 80 SMİK değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 4.4).

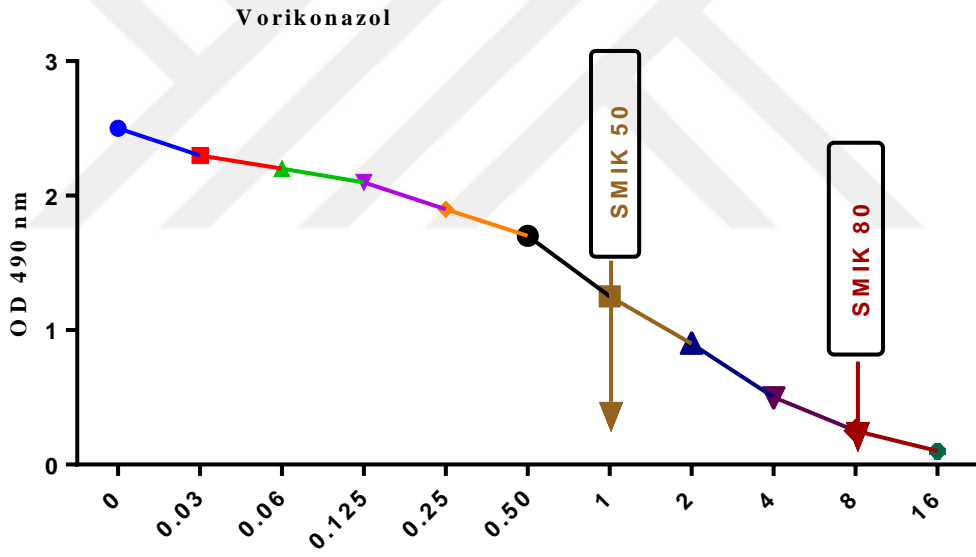
Tablo 4.4. *Candida albicans*'ın biyofilm oluşturmada önceki antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan planktonik MİK ve biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki sesil MİK (SMİK) değerleri.

| Antifungaller | Biyofilm oluşmadan önce | Biyofilm oluştuktan sonra | |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------|
| | | MİK (µg/ml) | % 50 SMİK (µg/ml) |
| Amfoterisin B (0,015-32µg/ml) | 0,5 | 2 | 8 |
| Vorikonazol (0,05-16µg/ml) | 0,25 | 1 | 8 |
| Anidulafungin (0,05-16µg/ml) | 0,25 | 0,25 | 2 |

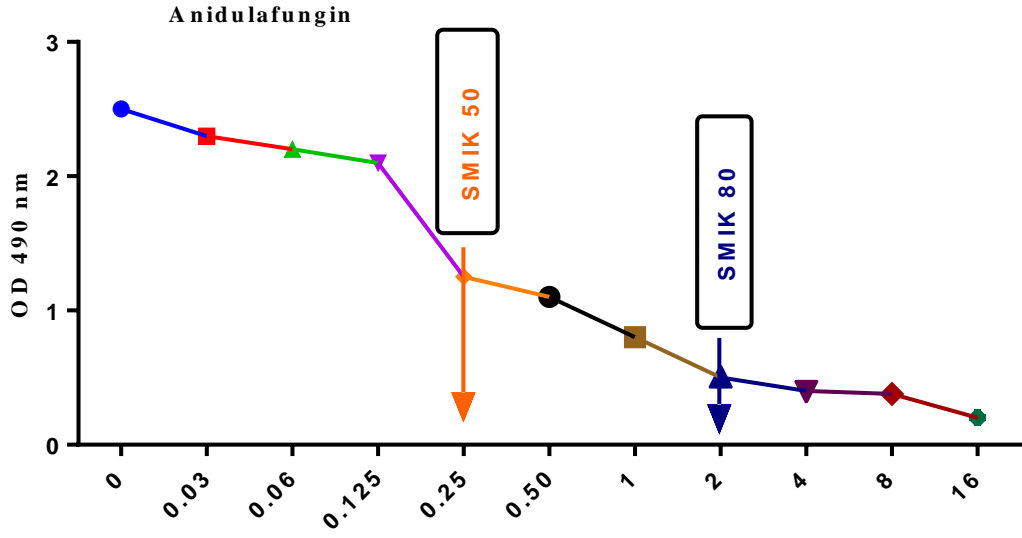
Antifungallerin planktonik MİK değeri %80 SMİK değeri ile karşılaştırıldığında, %80 SMİK değerleri sırasıyla amfoterisin B'de 16 kat, vorikonazol'de 32 kat ve anidulafungin'de 8 kat fazla bulunmuştur. Antifungallerin planktonik MİK değeri %50 SMİK değeri ile karşılaştırıldığında, %50 SMİK değerleri sırasıyla amfoterisin B'de 4 kat, vorikonazol'de 4 kat fazla bulunmuştur, anidulafungin'de ise bu değer eşit bulunmuştur.



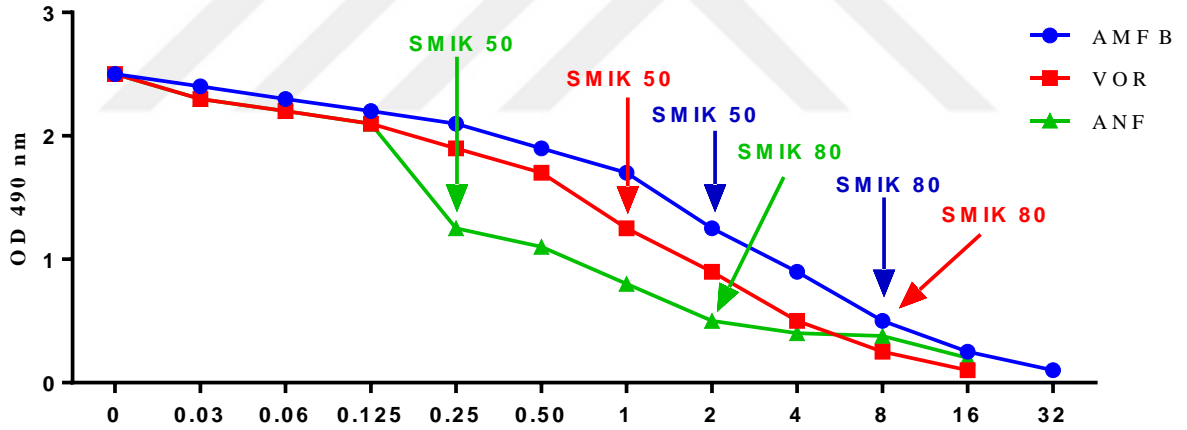
Şekil 4.3. *C. albicans* biyofilm üzerinde amfoterisin B duyarlılığı.



Şekil 4.4. *C. albicans* biyofilm üzerinde vorikonazol duyarlılığı.

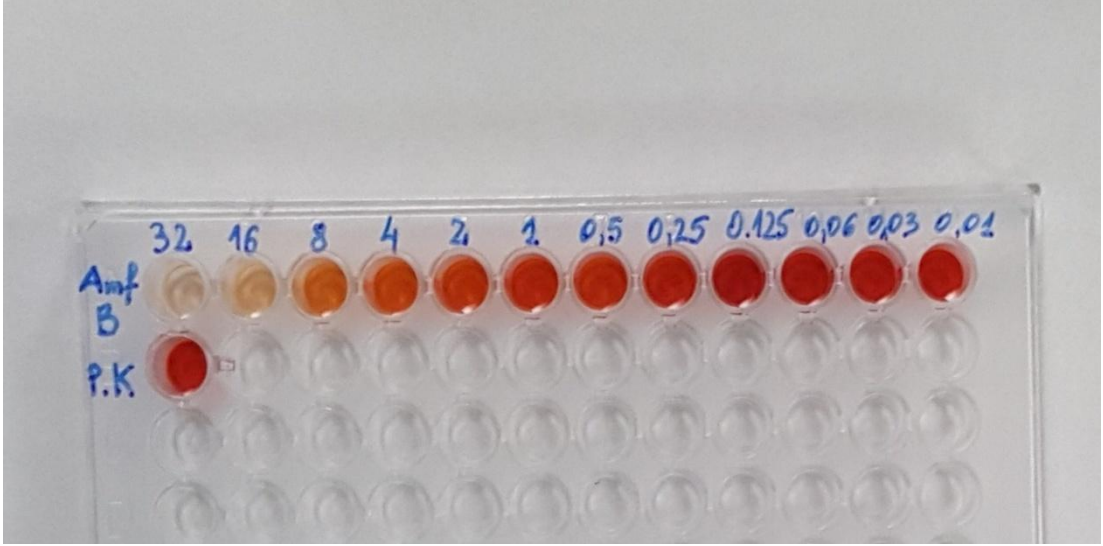


Şekil 4.5. *C. albicans* biyofilm üzerinde anidulafungin duyarlılığı.

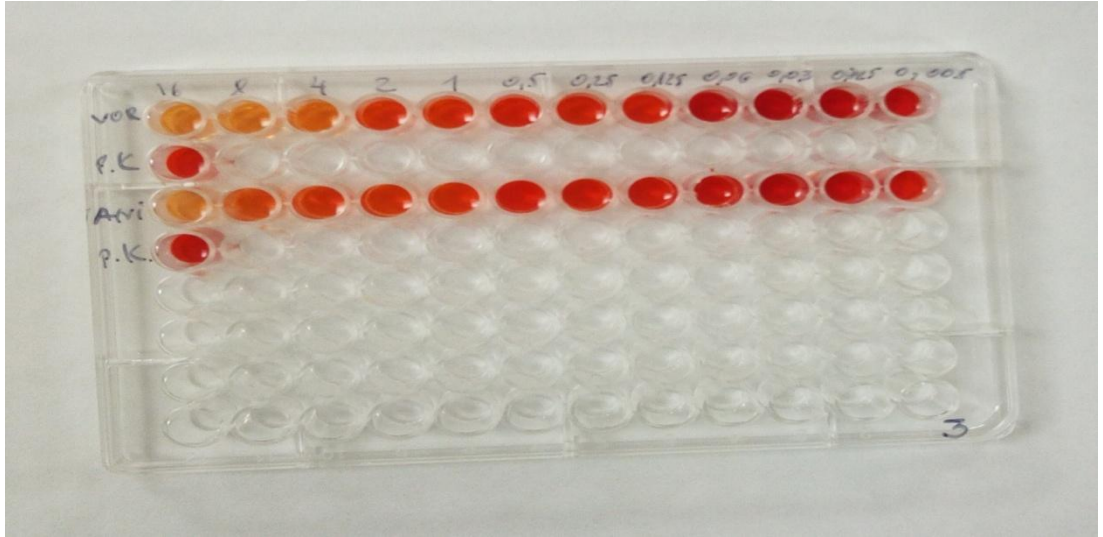


AMF B=Amfoterisin B; VOR=Vorikonazol; ANF=Anidulafungin

Şekil 4.6. *C. albicans* biyofilmine antifungallerin duyarlılık sonucu.



Şekil 4.7. *C. albicans* biyofilminin amfoterisin B duyarlılığının XTT yöntemi ile görüntülenmesi (% 50 SMİK: 2 µg/ml; % 80 SMİK: 8 µg/ml).



Şekil 4.8. *C. albicans* biyofilminde vorikonazol ve anidulafungin duyarlılığının XTT yöntemi ile görüntülenmesi (vorikonazol için % 50 SMİK: 1 µg/ml, % 80 SMİK: 8 µg/ml; anidulafungin için % 50 SMİK: 0,25 µg/ml; % 80 SMİK: 2 µg/ml).

4.4. Polimikrobiyal Biyofilm Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri

Polimikrobiyal biyofilm içeren mikroplaklar ELISA okuyucusunda 490 nm’de okutularak absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans değeri (OD değeri) kontrol kuyucuğuna (besiyeri ve mikroorganizma) kıyasla absorpsiyon değerinin %50 azalmasına neden olan en düşük konsantrasyon sesil MİK (SMİK) değeri olarak belirlenmiştir

(Antonio Rosato ve ark., 2016). Bu şekilde, polimikrobiyal biyofilmde pozitif kontrole göre % 50 SMİK değeri belirlenmiştir.

4.4.1. *C. albicans* ve *S. epidermidis* Polimikrobiyal Biyofilm Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri

Daha önce belirlediğimiz *C. albicans* % 50 SMİK değerleri *C. albicans* ve *S. epidermidis* ile oluşturulan polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılığının % 50 SMİK değerleri karşılaştırarak aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *C. albicans* biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerlerinin *C. albicans* ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerleri ile karşılaştırılması.

| Antifungaller | <i>C. albicans</i> % 50 SMİK (µg/ml) | <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> % 50 SMİK (µg/ml) |
|---------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Amfoterisin B | 2 | 64 |
| Vorikonazol | 1 | 32 |
| Anidulafungin | 0,25 | 32 |

C. albicans ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminin % 50 SMİK değeri, *C. albicans* monomikrobiyal biyofilminin % 50 SMİK değeri ile karşılaştırıldığında amfoterisin B'ye göre 32 kat, vorikonazole göre 32 kat anidulafungine göre 128 kat artmıştır.

4.4.2. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* Polimikrobiyal Biyofilmi Üzerinde Antifungallerin Duyarlılık Testleri

C. albicans % 50 SMİK değerleri *C. albicans* ve *P. aeruginosa* ile oluşturulan polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılığının % 50 SMİK değerleri karşılaştırılarak Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. *C. albicans* monomikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerlerinin *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminin antifungallere karşı duyarlılık testlerinde saptanan % 50 SMİK değerleri ile karşılaştırılması.

| Antifungaller | <i>C. albicans</i> % 50 SMİK (µg/ml) | <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> % 50 SMİK (µg/ml) |
|----------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Amfoterisin B | 2 | 8 |
| Vorikonazol | 1 | 8 |
| Anidulafungin | 0,25 | 8 |

C. albicans ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilmindeki % 50 SMİK değeri, *C. albicans* monomikrobiyal biyofilminin % 50 SMİK değerine göre amfoterisin B’de 4 kat, vorikonazol’de 8 kat, anidulafungin’de ise 32 kat artmıştır.

4.5. Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal/Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi

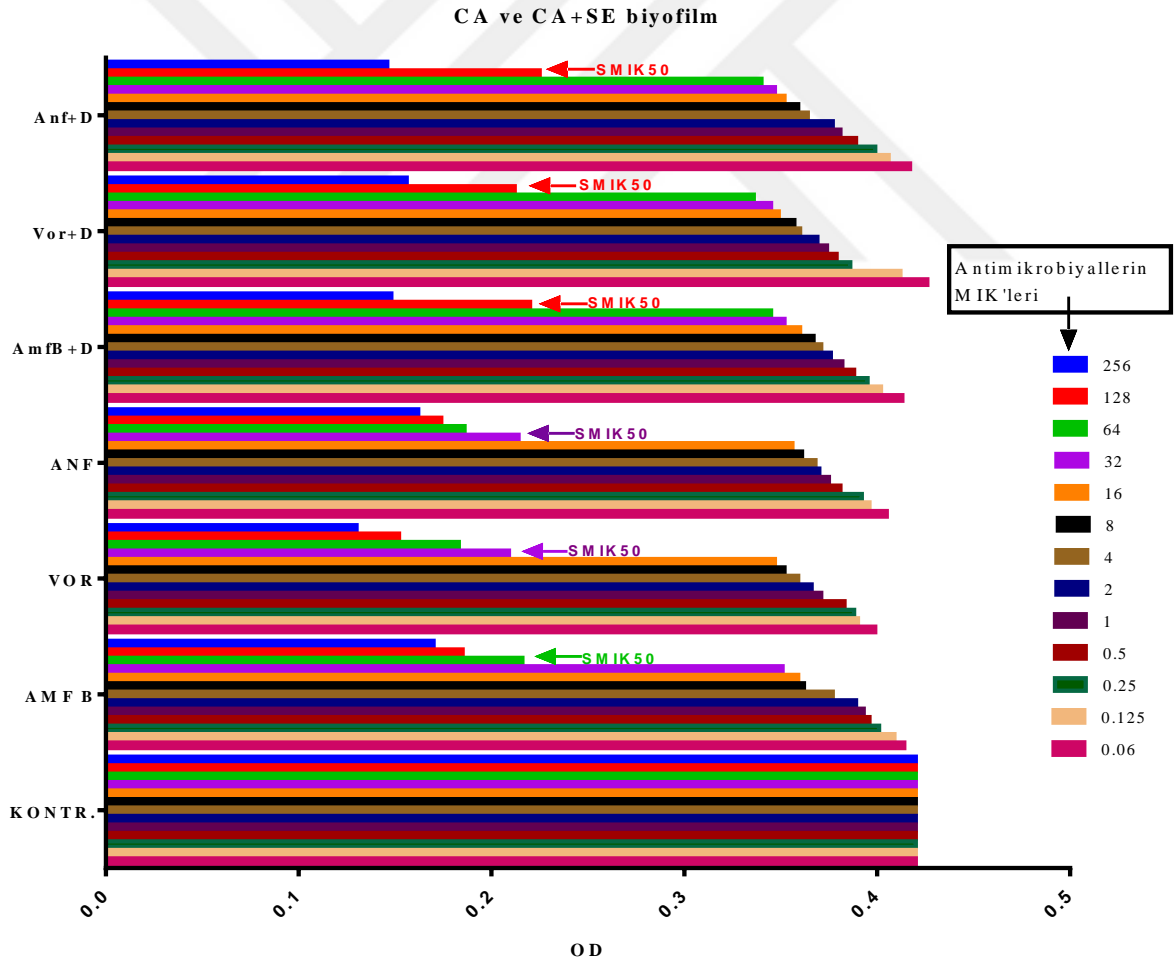
4.5.1. *C. albicans* ve *S. epidermidis* Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal/Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi

Çalışmamızda *C. albicans* ve *S. epidermidis*’in birlikte oluşturdukları polimikrobiyal biyofilm üzerine antifungal/antibiyotik etkinliği araştırılmıştır. İlk olarak amfoterisin B ve daptomisin, ikinci olarak vorikonazol ve daptomisin, üçüncü olarak da anidulafungin ve daptomisin yani antifungal/antibiyotik kombinasyonu denenmiştir. Bu deneylerin sonunda ise % 50 SMİK (µg/ml) belirlenip aşağıdaki veriler elde edilmiştir (Tablo 4.7. ve Şekil 4.10.)

Tablo 4.7. *C. albicans* ve *S. epidermidis* biyofilminde antifungallere ve antifungal ile birlikte daptomisine karşı duyarlılığının belirlenmesi.

| Antifungaller ve Antibiyotik | <i>C. albicans</i> ve <i>S. epidermidis</i> biyofilm % 50 SMİK (µg/ml) |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Amfoterisin B | 64 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Vorikonazol | 32 |
| Anidulafungin | 32 |
| Daptomisin | 64 |
| Amfoterisin B + daptomisin | 128 |
| Vorikonazol + daptomisin | 128 |
| Anidulafungin + daptomisin | 128 |



Şekil 4.9. *C. albicans* ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminde antifungal/antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.

4.5.1.1. *C. albicans* ve *S. epidermidis* Polimikrobiyal Biyofilminin Amfoterisin B ve Daptomisin Kombinasyonuna Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

C. albicans ve *S. epidermidis* biyofilminin antifungal ve daptomisin etkinliğinin belirlenmesinde öncelikle Şekil 3.4'de gösterildiği gibi MİK değerleri belirlenmiş ve bu MİK değerleri ile aşağıdaki gibi Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon hesaplanmıştır.

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$$

$$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$$

FİK = amfoterisin B ve daptomisin MİK / tek başına amfoterisin B MİK

Amfoterisin B için FİK değeri (FİK amfoterisin B) = 128/64=2

Daptomisin için FİK değeri (FİK daptomisin) = 128/64=2

FİK_i = FİK amfoterisin B + FİK daptomisin = 2+2=4

Amfoterisin B ve daptomisin FİK_i = 4 (indifferent yani fark yok).

4.5.1.2. *C. albicans* ve *S. epidermidis* Polimikrobiyal Biyofilminin Vorikonazol ve Daptomisin Kombinasyonuna Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$$

$$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$$

FİK = vorikonazol ve daptomisin MİK / tek başına vorikonazol MİK

Vorikonazol için FİK değeri (FİK vorikonazol) = 128/32=4

Daptomisin için FİK değeri (FİK daptomisin) = 128/64=2

FİK_i = FİK vorikonazol + FİK daptomisin = 4+2=6

Vorikonazol ve Daptomisin FİK_i = 6 (antagonistik).

4.5.1.3. *C. albicans* ve *S. epidermidis* Polimikrobiyal Biyofilminin Anidulafungin ve Daptomisin Etkinliğinin Belirlenmesi

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$$

$$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$$

FİK = anidulafungin ve daptomisin MİK / tek başına anidulafungin MİK

Anidulafungin için FİK değeri (FİK anidulafungin) = 128/32=4

Daptomisin için FİK değeri (FİK daptomisin) = 128/64=2

FİK_i = FİK anidulafungin + FİK daptomisin = 4 + 2 = 6

Anidulafungin ve Daptomisin FİK_i=6 (antagonistik).

Bu yapılan hesaplamalara göre antifungallerle birlikte daptomisin kullanımının test edildiği çalışmaların sonucunda *C. albicans* ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminde daptomisinin amfoterisin B ile birlikte kullanıldığında indiferent (yani fak yok); vorikonazol ve anidulafungin ile birlikte kullanıldığında antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır.



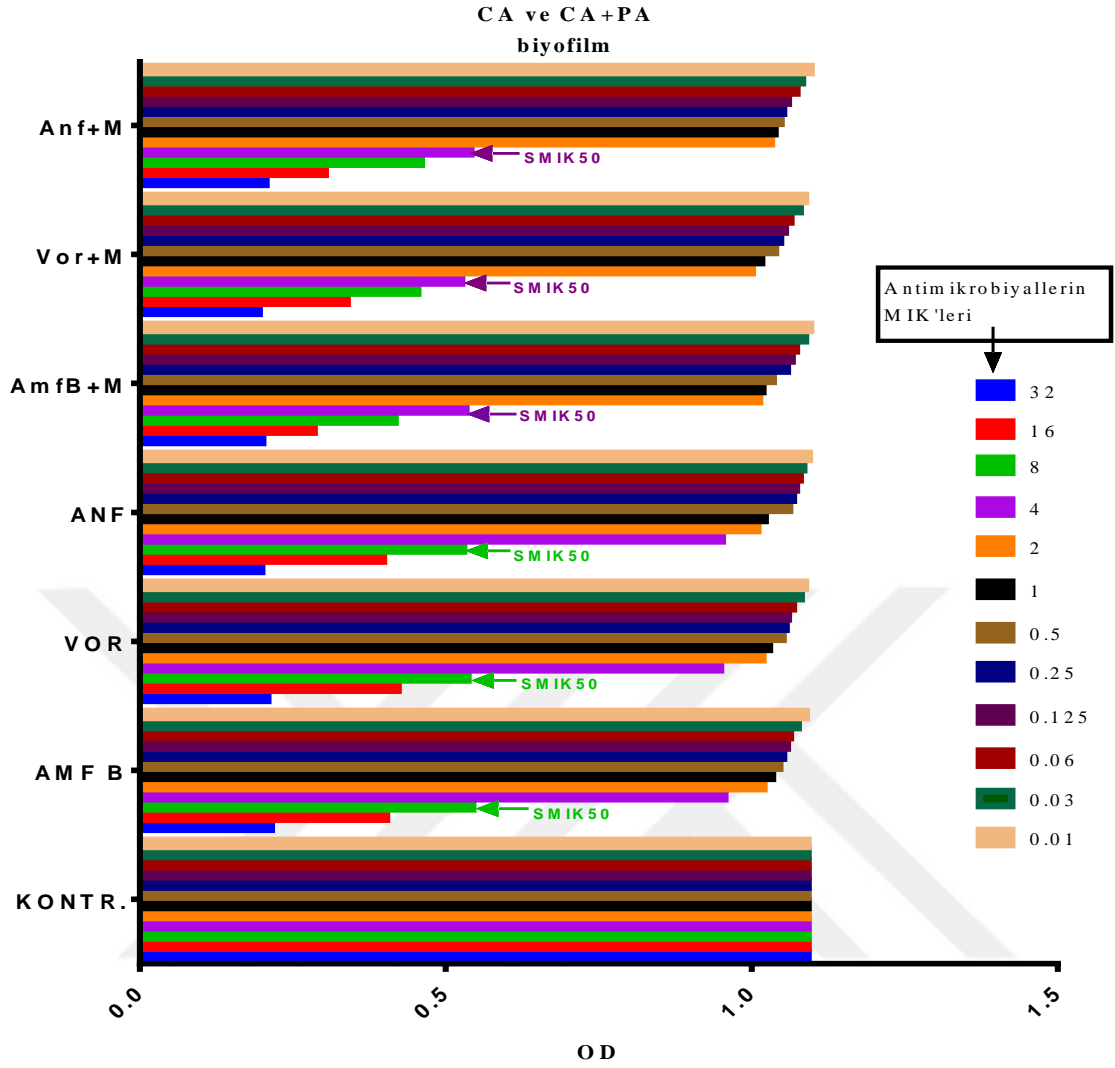
Şekil 4.10. *C. albicans* ve *S. epidermidis* biyofilminde antifungal ile birlikte daptomisin duyarlılığının belirlenmesi.

4.5.2. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* Polimikrobiyal Biyofilminde Antifungal /Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.5.1.1’de belirtildiği gibi Checkerboard analizi yapılan mikroplaklar ELISA okuyucusunda 490’nm de okutularak absorbans ölçümü yapılmıştır. Pozitif kontrol kuyucuğuna (besiyeri ve mikroorganizma) kıyasla absorpsiyonun %50 azalmasına neden olan en düşük konsantrasyon sesil MİK (SMİK) değeri olarak belirlenmiştir. Bu deneylerin sonucunda *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminde antifungal ile birlikte meropenem duyarlılığının belirlenmesi konusunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir (Tablo 6. ve Şekil 5.).

Tablo 4.8. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilminde antifungallere ve antifungal ile birlikte meropeneme karşı duyarlılığının belirlenmesi.

| Antifungaller ve Antibiyotik | <i>C. albicans</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilm % 50 SMİK (µg/ml) |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Amfoterisin B | 8 |
| Vorikonazol | 8 |
| Anidulafungin | 8 |
| Meropenem | 4 |
| AmfoterisinB + meropenem | 4 |
| Vorikonazol + meropenem | 4 |
| Anidulafungin + meropenem | 4 |



Şekil 4.11. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminde antifungal/antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.

4.5.2.1. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* Polimikrobiyal Biyofilminin Amfoterisin B ve Meropenem Etkinliğinin Belirlenmesi

C. albicans ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminin antifungal ve meropenem etkinliğinin belirlenmesi Şekil 3.5 de gösterildiği gibi Checkerboard analizi ile yapılmıştır. Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu hesaplaması ise şu şekilde yapılmıştır:

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$

$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$

FİK = amfoterisin B ve meropenem MİK / tek başına amfoterisin B MİK

Amfoterisin B için FİK değeri (FİK amfoterisin B) = 4/8=0,5

Meropenem için FİK değeri (FİK meropenem) = 4/8=0,5

FİK_i = FİK amfoterisin B + FİK meropenem = 0,5 + 0,5 = 1

Amfoterisin B ve meropenem FİK_i = 1 (aditif yani ek etki).

4.5.2.2. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* Polimikrobiyal Biyofilminin Vorikonazol ve Meropenem Etkinliğinin Belirlenmesi

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$

$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$

FİK = vorikonazol ve meropenem MİK / tek başına meropenem MİK

Vorikonazol için FİK değeri (FİK vorikonazol) = 4/8=0,5

Meropenem için FİK değeri (FİK meropenem) = 4/8=0,5

FİK_i = FİK vorikonazol + FİK meropenem = 0,5 + 0,5 = 1

Vorikonazol ve meropenem FİK_i = 1 (aditif yani ek etki).

4.5.2.3. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* Polimikrobiyal Biyofilminin Anidulafungin ve Meropenem Etkinliğinin Belirlenmesi

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK_i) indeksi: $\Sigma FİK_{A+B} = FİK_A + FİK_B$.

$FİK_A = \text{kombine MİK}_A / \text{tek başına MİK}_A$

$FİK_B = \text{kombine MİK}_B / \text{tek başına MİK}_B$

FİK = anidulafungin ve meropenem MİK / tek başına meropenem MİK

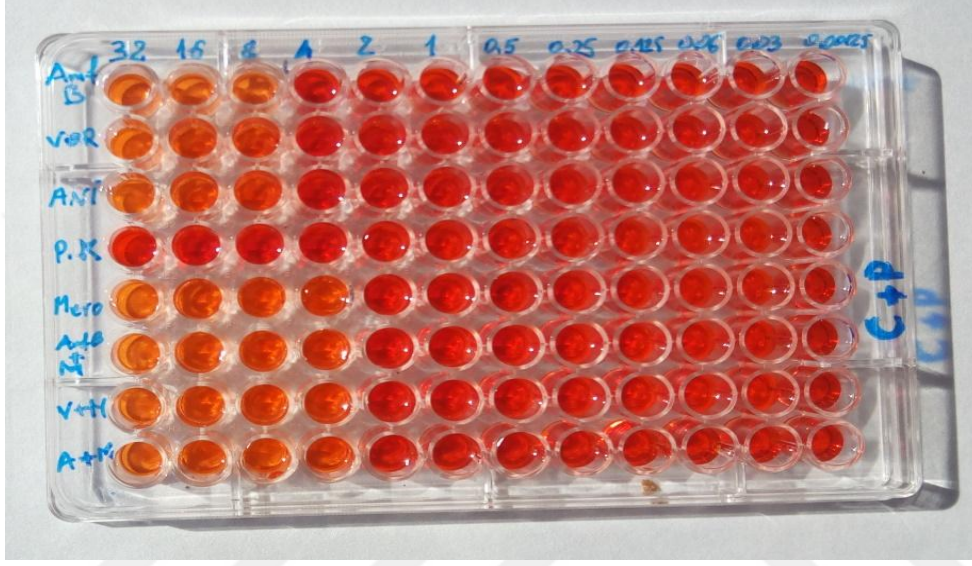
Anidulafungin için FİK değeri (FİK anidulafungin) = 4/8=0,5

Meropenem için FİK değeri (FİK meropenem) = 4/8=0,5

$$FİK_i = FİK \text{ anidulafungin} + FİK \text{ meropenem} = 0,5 + 0,5 = 1$$

Anidulafungin ve meropenem $FİK_i=1$ (aditif yani ek etki).

Bu yapılan hesaplamalara göre antifungallerle birlikte meropenem kullanımının test edildiği çalışmaların sonucunda, meropenem antibiyotiklerinin *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminde amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin antifungalleriyle birlikte kullanıldığında aditif etkisi olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.12. *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilminde antifungal ile birlikte meropenem duyarlılığının belirlenmesi.

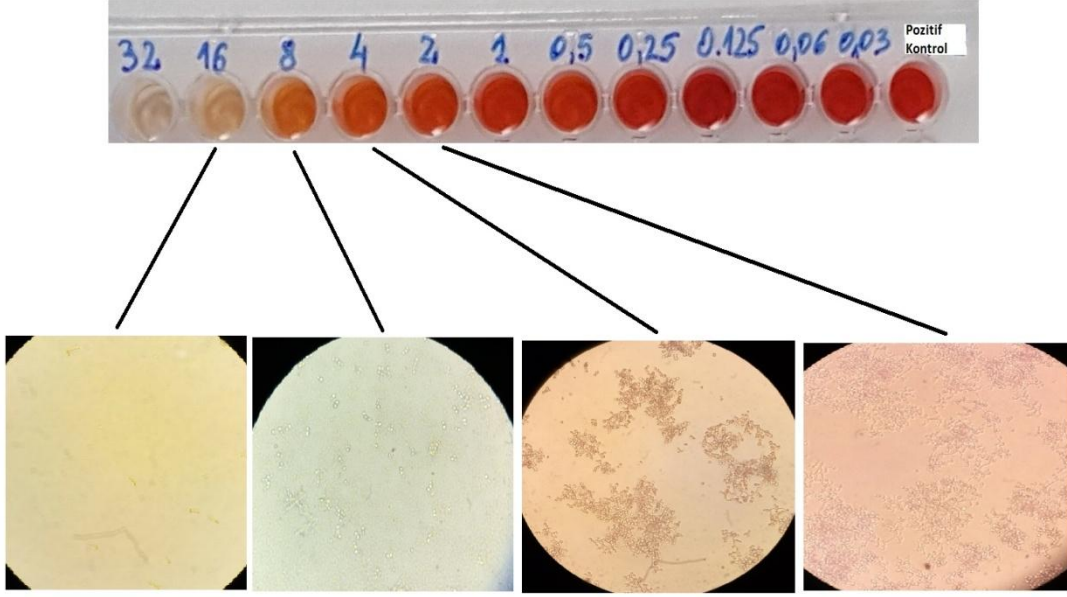
Polimikrobiyal biyofilme karşı amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafunginin daptomisin ve meropenem ile olan kombinasyonundaki etkileşim türleri tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 4.9. Checkerboard analizi ile polimikrobiyal biyofilmlerin antifungal ve antibiyotik kombinasyonuna karşı gösterdikleri etkileşim türleri.

| Polimikrobiyal biyofilm | Etkileşim Türü | | |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| | <i>Amfoterisin B</i> + <i>daptomisin</i> | <i>Vorikonazol</i> + <i>daptomisin</i> | <i>Anidulofungin</i> + <i>daptomisin</i> |
| <i>C. albicans</i> + <i>S. epidermidis</i> biyofilm | fark yok | antagonistik | antagonistik |
| | <i>Amfoterisin B</i> + <i>meropenem</i> | <i>Vorikonazol</i> + <i>meropenem</i> | <i>Anidulafungin</i> + <i>meropenem</i> |
| <i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i> biyofilm | aditif | aditif | aditif |

4.6. *C. albicans* Biyofilminin Amfoterisin B Duyarlılığının İverted Mikroskopi ile İncelenmesi

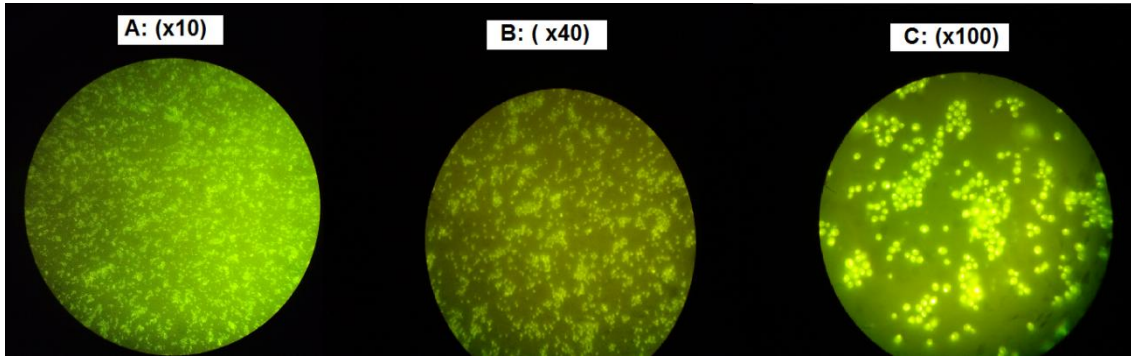
C. albicans biyofilmin (48 saatlık) amfoterisin B etkisini Şekil 3.6.da gösterilmiş ve plak kuyucuklarından alınan örnekler inverted mikroskopta gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (8 µg/ml ve 16 µg/ml) spor miktarı azalmış ve hifsiz biyofilm gözlenmiştir. Antifungalın konsantrasyonu azaldıkça (< 4 µg/ml) mikroskobik alanda spor yoğunluğu ile beraber hif oluşumu da görülmektedir.



Şekil 4.13. *C. albicans* biyofilminin amfoterisin B duyarlılığının inverted mikroskopi ile incelenmesi (40X).

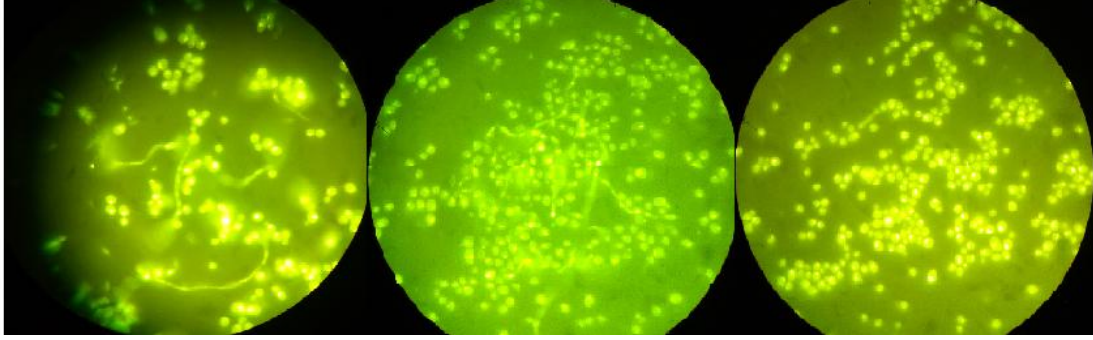
4.7. Floresan Mikroskobik İncelenmesi

Candida'nın biyofilm hücreleri kalkoflor beyaz ile boyanarak floresan mikroskobu altında incelendi. Canlı biyofilm hücreleri boyandıktan sonra farklı mikroskop büyütmelerde canlı varlığı belirlendi. Aşağıdaki şekilde 10X, 40X, 100X'lük farklı büyütmede floresan mikroskopi ile incelemede *C. albicans* biyofilmi gösterilmiştir.

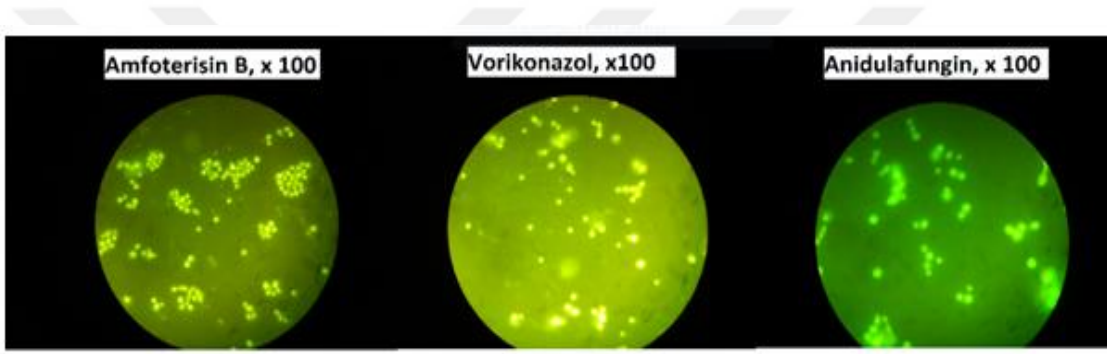


Şekil 4.14. Floresan mikroskopi ile incelemede *C. albicans* biyofilminin A: (10X); B: (40X); C: (100X) büyütmede görüntüsü.

Aşağıdaki şekilde (Şekil 3.8.) floresan mikroskopi ile 48 saatlik 100X'lük büyütmede *C. albicans* biyofilmi ve hif oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 4.15. *C. albicans* biyofilmi (Floresan Mikroskopik İncelemesi) 100X'lük büyütmede (hif oluşumu).

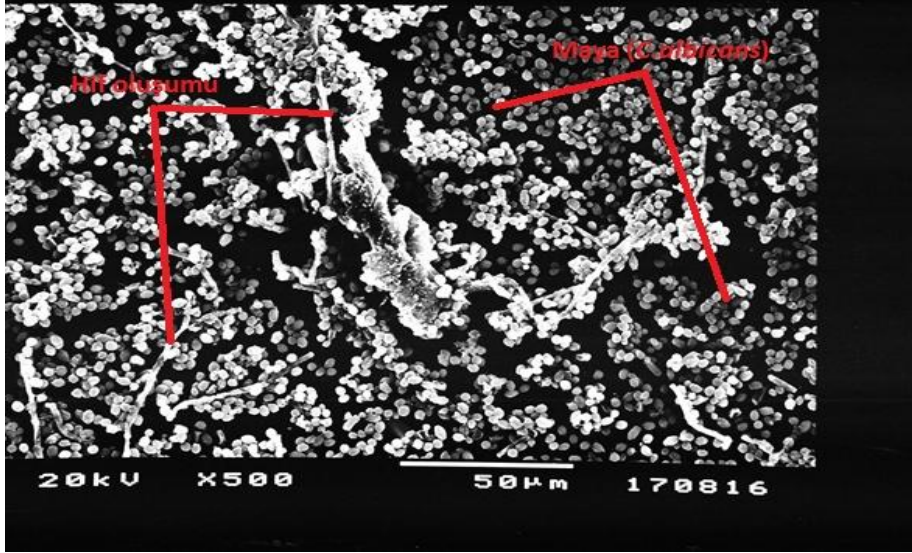


Şekil 4.16. *C. albicans* biyofilmi (Floresan Mikroskopik İncelemesi) 100X'lük büyütmede antifungal (amfoterisin B (2 µg/ml), vorikonazol (1 µg/ml) ve anidulafungin (0,25 µg/ml)) etkisinin gösterilmesi.

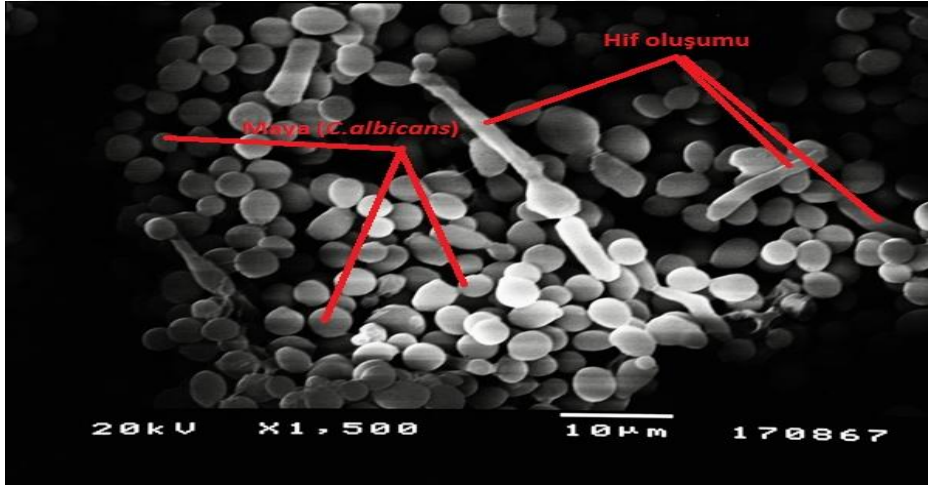
4.8. Taramalı Elektron Mikroskopik İncelenmesi

Mikrobiyal biyofilmlerin yapısal özellikleri ve morfolojileri hakkında bilgi verir, *C.albicans*'da biyofilm oluşumunu incelemek için Taramalı Elektron Mikroskopik (TEM) kullanıldı. Ayrıca bu mikroskop ile *C.albicans*'larda maya ve antifungal kullanılmadığı için hif oluşumu da incelenmiştir. *C.albicans*'ın 48 saat inkübasyon sonrası farklı büyütmelerdeki biyofilmin görüntüsü aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

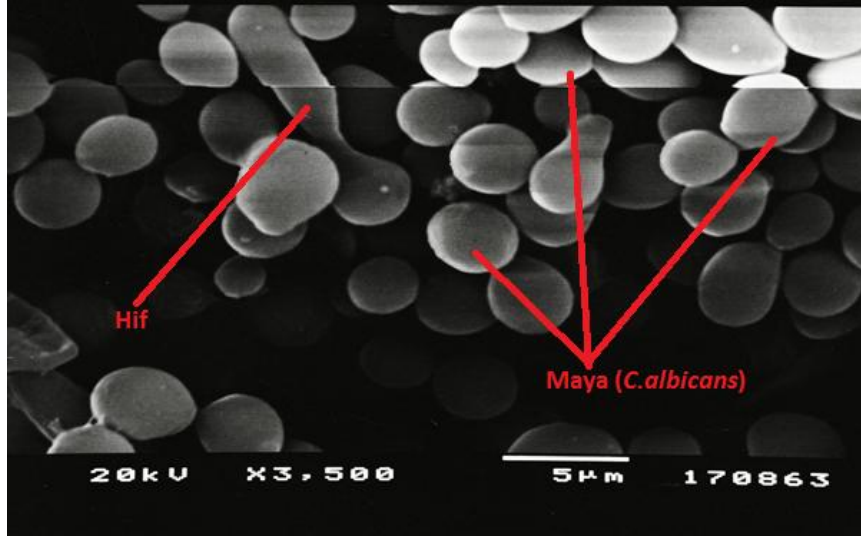
C. albicans biyofilminde antifungal kullanılmadan alınan görüntüde hif oluşumu görülebilmektedir (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. *C. albicans* biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 500X'lük büyütmede.

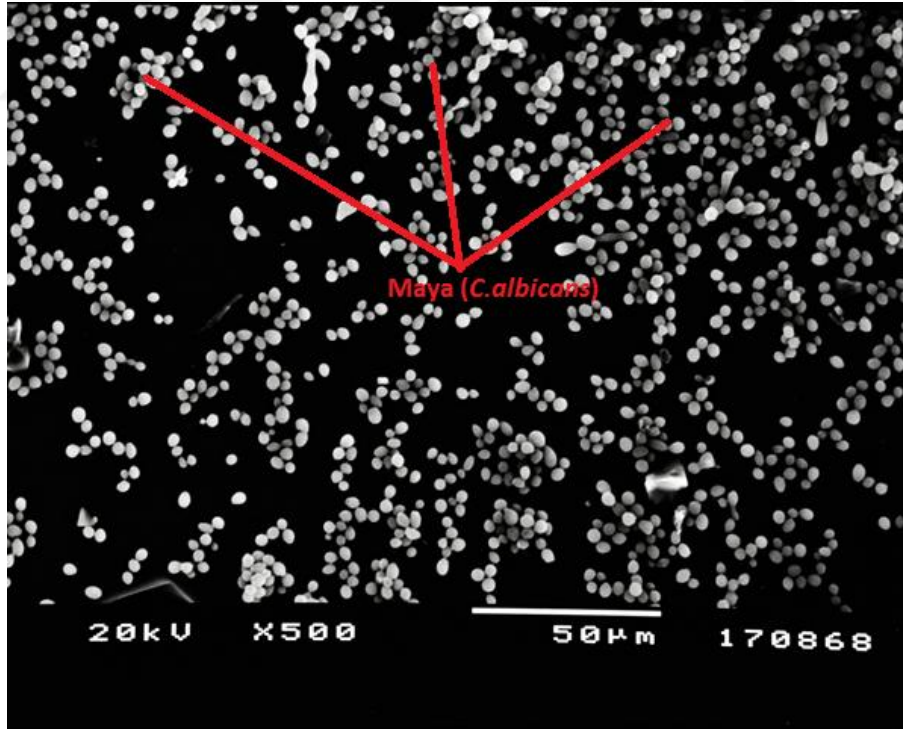


Şekil 4.18. *C. albicans* biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 1,500X'lük büyütmede.



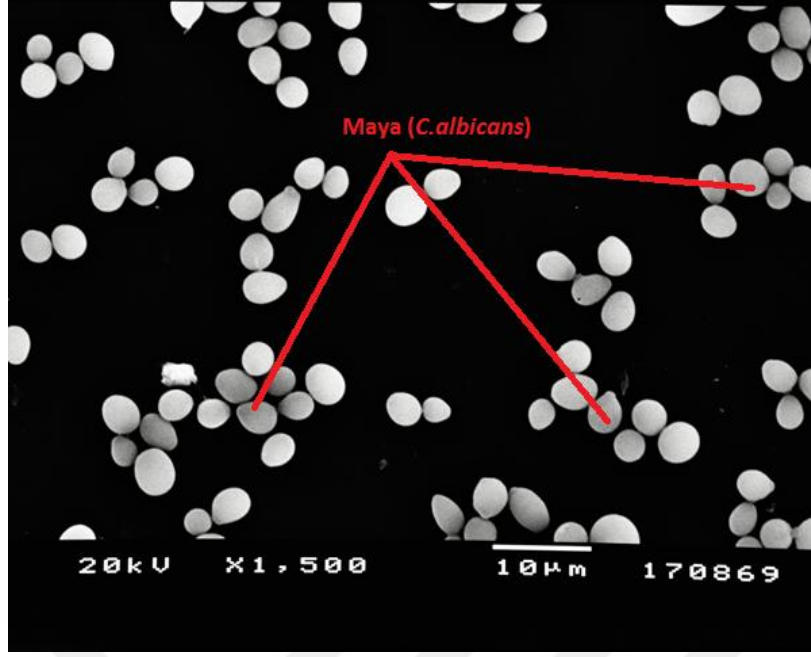
Şekil 4.19. *C. albicans* biyofilmi (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede blastosporların görünümü.

Aşağıdaki şekillerde *C. albicans* biyofilmi 2 µg/ml amfoterisin B'ye karşı duyarlılığı gösterilmiştir. Hif yapısının inhibe eden amfoterisin B ile incelemelerde hif oluşumu gözlemlenememiştir (Şekil 4.20.).

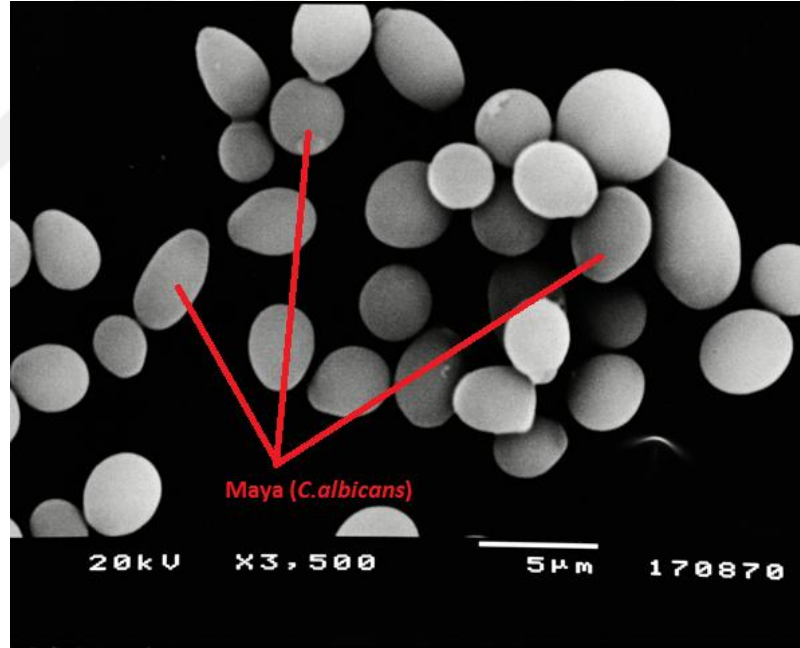


Şekil 4.20. *C. albicans* biyofilminin 2 µg/ml amfoterisin B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 500X'lük büyütmede görüntüsü.

Yukarıdaki görüntüde antifungal ilacı kullanıldığı için hif oluşumunun inhibisyonu ve aynı zamanda biyofilm yoğunluğunun azalmasının gösterilmiştir.

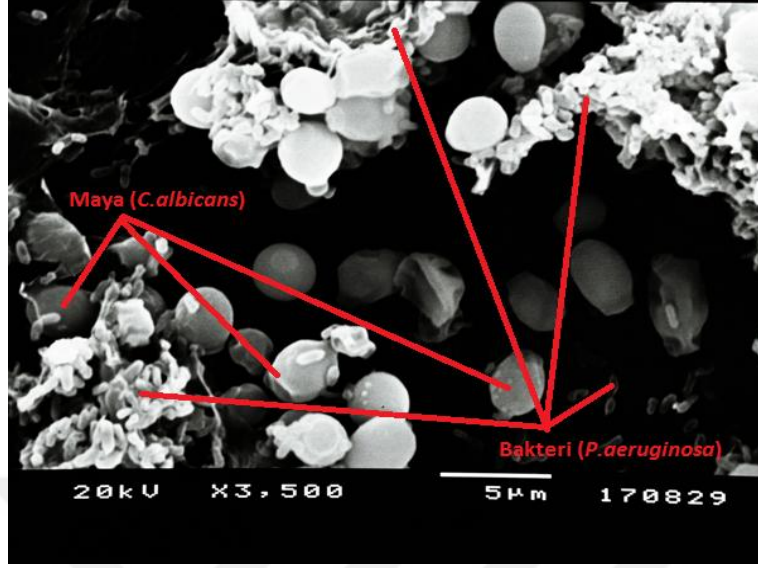


Şekil 4.21. *C. albicans* biyofilminin 2 µg/ml amfoterisin B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 1,500X'lük büyütmede gösterilmesi.



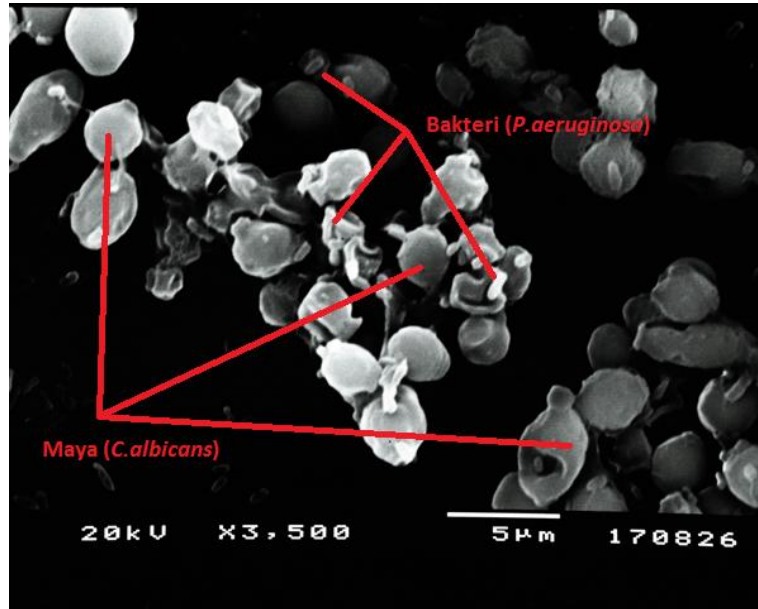
Şekil 4.22. *C. albicans* biyofilminin amfoterisin 2 µg/ml B'ye karşı duyarlılığının (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede gösterilmesi.

C.albicans ve *P.aeruginosa*'nın kombine biyofilminin 24 saat inkübasyon sonrası görüntülemesi:



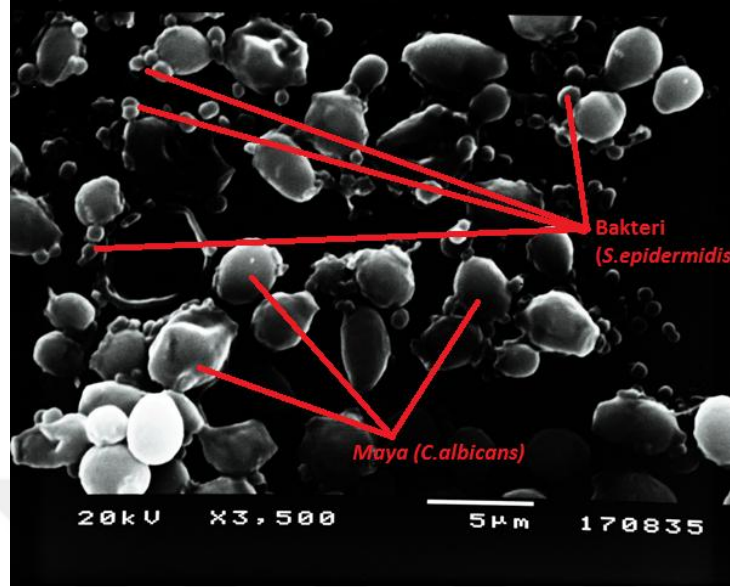
Şekil 4.23. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede antifungalsız ve antibiyotiksiz *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminin görünümü.

C. albicans ve *P. aeruginosa* biyofilminin amfoterisin B (4 µg/ml) ve meropenemin (4 µg/ml) birlikte kullanılması sonrası görünümü:



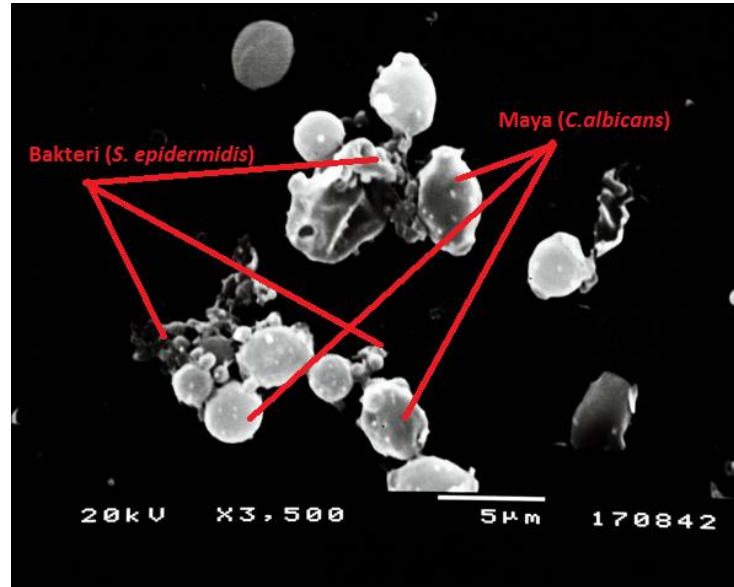
Şekil 4.24. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede amfoterisin B ve meropenem ile *C. albicans* ve *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminin görüntüsü.

C. albicans ve *S. epidermidis* kombine biyofilminin 24 saat inkübasyon sonrası görüntülenmesi:



Şekil 4.25. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede antifungalsız ve antibiyotiksiz *C. albicans* ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminin görüntüsü.

C. albicans ve *S. epidermidis* biyofilminin amfoterisin B (128 µg/ml) ve daptomisin (128 µg/ml) birlikte kullanıldığındaki görüntüsü:



Şekil 4.26. (Taramalı Elektron Mikroskopik incelenmesi) 3,500X'lük büyütmede amfoterisin B ve daptomisin ile *C. albicans* ve *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilmi.

5. TARTIŞMA

Biyofilm vücut dokusu ve vücutta kullanılan tıbbi cihazlar üzerinde meydana gelir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar, konak immün sisteminin zayıflamasıyla biyofilmden bir şekilde ayrılan planktonik mikroorganizmaların sebebiyet verdiği akut veya kronik enfeksiyonlardır. Ayrıca vücut içerisine yerleşimi söz konusu olan yabancı cisimler örneğin kateterler, kalp pilleri, protez kalp kapakçıkları, ortopedik protezler ve kontakt lensler gibi çeşitli tıbbi malzemelerin yüzey alanlarında da oluşabilmekte ve ciddi hastalıklara neden olmaktadır (Khardori & Yassien, 1995).

Candida türlerinin tıbbi gereçlere slime faktörü aracılığı ile tutunması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynaması, hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilmesi nozokomiyal mantar enfeksiyonları açısından önemli bir durumdur. *Candida* türlerinin, günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan ana etkenler arasında sıklığı artmakta ve Gram-negatif bakterilerden sonra 3. veya 4. sıklıkta izole edilmektedirler (Ozcan, Mutlu, Dundar, & Willke, 2010).

Son zamanlardaki hastane enfeksiyonlarının yaklaşık % 60 ila % 70'i vücuda yerleştirilen tıbbi cihazlarla ilişkilendirilmiştir ve bakteri ve mantarların biyofilm oluşturmak için birlikte etkileştikleri doğrulanmıştır (Li, Yan, & Xu., 2003).

C. albicans'ın en sık görülen mantar türlerinden biridir. Özellikle tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumu ile ilişkilidir ve bu cihazlarda ortaya çıkan enfeksiyonlardaki yüksek ölüm oranları ile bağlantısı vardır. *C. albicans* biyofilm oluşumunun ilk aşaması bir yüzeye yapışmasıdır, daha sonra bakteri çoğalması ile birlikte biyofilm yapıya sahip koloniler oluşturmak için çeşitli hücre dışı polimerlerle bir araya gelir. *C. albicans*'ın bir yüzeye yapışması için hücre yüzeyi hidrofobikliği ve elektrostatik kuvvet gibi spesifik olmayan faktörler ve adezin ile reseptörler gibi spesifik faktörler de gereklidir (Chandra, Kuhn, ve ark., 2001; Nett ve ark., 2008).

C. albicans biyofilminin bakteri biyofilmleri ile birlikte olduğunda biyofilmin etkinliğini değerlendiren birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada bakteri biyofilmi ile birlikte olduğunda *C. albicans*'ın biyofilm oluşumu azalmış ve bakteri biyofilmi tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu olumsuz etkinin sebebinin, *C. albicans*'ın hif geçişiyle ilişkili genlerin baskılanması ve bakteri partiküllerinin biyofilm mimarisini fiziksel olarak olumsuz etkilemesi olduğu ileri sürülmüştür (Park ve ark., 2014).

Bakteriler veya mantarlar tarafından diğer popülasyonların tanınması Quorum Sensing ile açıklanabilir. Bakterilerin, çevresindeki diğer popülasyonların yoğunluğuna ve büyüme oranlarına göre mikrofilm oluşumunu kontrol ettiği bilinmektedir (El-Azizi, Starks, & Khardori, 2004; Uppuluri, Chaturvedi, & Lopez-Ribot, 2009).

C. albicans ve bakterilerin birlikte olduğu ve inkübe edildiği durumlarda, biyofilmin mimarisi ve bunun sonucunda ortaya çıkan biyolojik fonksiyonlar tam olarak tanımlanamamıştır, çünkü karışık bir inkübasyon ortamından yaratılan suşlar arasındaki etkileşimler iyi anlaşılammıştır. Yapılan bu çalışmada bakteri ve mantarlar ayrı ayrı inkübe edilerek oluşan biyofilm tespit edildikten sonra bakteri varlığında mikrofilm oluşumunun nasıl etkilendiği belirlenmeye çalışılmıştır.

C. albicans'ın tek başına inkübe edildiğinde oluşan biyofilm oranı ile karşılaştırıldığında, *C. albicans*'ın altı farklı bakteri tipinin (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *S. salivarius*) her biri ile inkübe edildiğinde oluşturduğu biyofilmin azaldığı saptanmıştır. Biyofilm oluşumundaki azalmanın, yüksek biyofilm oluşumuna sahip suşlarda daha belirgin olduğu görülmüştür. Örneğin *P. aeruginosa*, *C. albicans* ile inkübe edildiğinde, *P. aeruginosa*'nın *C. albicans*'ın hif oluşumunu baskılayarak *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunu inhibe etme yeteneğinin sonuçları ile tutarlı olarak *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür (Park ve ark., 2014).

Bakterilerin inhibe edici etkisinin sadece çoğalma ve büyüme aşamasında bakterilerce sentezlenen bir metabolitin değil, aynı zamanda *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunu azaltan biyofilm oluşumundaki yapısal değişiklikleri de indüklediği düşünülmüştür (Özcan Keceli, 2007).

Bizim çalışmamızda da yapılan kantitatif çalışmalarda bu sonuçlarla uyumlu olarak *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in *C. albicans* biyofilmini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir. *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm miktarına (OD: 2,502) kıyasla *S. epidermidis* ile birlikte oluşturduğu biyofilm miktarında (OD: 0,420) %83,2 oranında bir azalma saptanmıştır. *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm miktarına kıyasla, *P. aeruginosa* ile birlikte oluşturduğu biyofilmdeki miktarda (OD: 1,092) ise %56,3 lük bir azalma saptanmıştır (Tablo 3.1.)

Taramalı elektron mikroskopunda, *C. albicans* biyofilminin birkaç katmandan oluştuğu, yoğun olduğu ve yüzey boyunca eşit olarak geliştiği görülürken, *E. coli* biyofilminin ise tek bir katmandan oluştuğu, düşük yoğunlukta olduğu ve tek bir yerde yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. *C. albicans* ve *E. coli* kompleks suşları birlikte

kültürlendiğinde biyofilmin büyütülmüş görüntüsünde, *E. coli* suşlarının *C. albicans* suşları arasında bulunduğu ve biyofilm yoğunluğunun sadece *Candida* ile karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir (Park ve ark., 2014).

Çalışmamızda ise *C. albicans*'ın tek başına biyofilm değeri bir bakteri ile birleştirildiğinde biyofilm değerine kıyasla daha yüksektir, bu sonuç yukarıda belirtilen çalışmalar ile desteklenmektedir.

Biyofilm oluşturan bazı *Candida* türlerinin aynı zamanda antifungal ajanlara direnç kazanması önemli bir tedavi problemi haline gelmiştir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi biyofilmlerin antimikrobiyal tedaviye azalmış olan duyarlılıklarından dolayı oldukça zordur (Ramage, Saville, Wickes, & Lopez-Ribot, 2002).

Antifungallerin *C. albicans* biyofilmine karşı etkinliği birçok çalışmada araştırılmış ve biyofilm oluşturulduktan sonra antifungallerin MİK değerlerinde yükselme gözlenmiştir (Jacobson ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde tek başına *C. albicans* veya *C. albicans*'ın *S. epidermidis* veya *P. aeruginosa* ile birlikte oluşturdukları biyofilme karşı antifungallerin MİK değerlerindeki artış biyofilmin antifungallere karşı direnci arttırdığı görüşünü desteklemektedir.

Yapılan bir çalışmada, *C. albicans* biyofilmlerindeki flukonazol ve amfoterisin B'ye karşı MİK değerleri araştırılmıştır. Bu çalışmada yer alan sonuçta biyofilmin erken dönemi için amfoterisin B'nin MİK değerini 0,5 µg/ml bulurken, biyofilmin geç dönemi için MİK değeri 8 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca *C. albicans* biyofilmlerinin, erken, olgun ve geç fazındaki flukonazol MİK değerlerini saptayarak bu değerleri birbirleriyle kıyaslamışlardır. Biyofilm formunun erken dönemi için belirlenen flukonazol etkinliği 1µg/ml iken, biyofilmin geç döneminde bu değer 128 µg/ml olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuç, biyofilmin ilk döneminde fungal biyofilmlerdeki karmaşık yapıyı oluşturan ve ilaç direncinin asıl etkeni olan maya-psödohif ve hif gibi yapıların olgunlaşmaması nedeniyle antifungallerin daha etkin oldukları şeklinde yorumlanmıştır (Chandra, Mukherjee, ve ark., 2001).

Jacobson ve arkadaşları (Jacobson ve ark., 2008) yaptığı çalışmada 30 planktonik *C. albicans* izolatu için anidulafungine karşı MİK değerleri ≤ 2 µg/ml bulunmuş, anidulafungine karşı biyofilm SMİK aralığı $\leq 0,03$ ile >16 µg/ml saptanmıştır. Shuford ve ark.'nın çalışmasında amfoterisin B, vorikonazol ve kaspofunginin planktonik MİK90'ları aynı izolatlara karşı sırasıyla 0,25, 0,06 ve 0,5 µg/ml bulunurken; biofilm MİK değerleri (SMİK90) ise sırasıyla 2, >256 ve 2 µg/ml bulmuşlardır (Shuford, Piper, Steckelberg, & Patel, 2007).

Jacobson ve Shuford'un çalışmalarına benzer şekilde, bizim çalışmamızda da, *C. albicans* biyofilmindeki SMİK50 değerleri planktonik hücrelere göre sırasıyla amfoterisin B'de 4 kat ve vorikonazol'de 4 kat artış saptanmıştır, anidulafungin'de ise bu değer eşit bulunmuştur. SMİK80 değerleri için ise bu artış sırasıyla amfoterisin B'de 16 kat, vorikonazol'de 32 kat ve anidulafungin'de ise 8 kat fazla bulunmuştur.

Bir çalışmada akrilik takma diş şeritleri (acrylic denture strips) üzerinde *C. albicans* biyofilmi oluşturulmuştur ve bu akrilik şeritler üzerinde büyüyen *C. albicans* biyofilme karşı amfoterisin B, nistatin, klorheksidin ve flukonazol etkinliği denenmiştir. Aynı antifungallerin planktonik MİK değerleri sırasıyla 0,25, 1, 4 ve 0,5 µg/ml saptanırken, biyofilme karşı XTT testi ile elde edilen verilere (SMİK50) göre değerlerde artış saptanmış ve sırasıyla amfoterisin B 8, nistatin 16, klorheksidin 128 ve flukonazol >64 µg/ml bulunmuştur. Bu sonuçlar, antifungal konsantrasyonunun biyofilm hücrelerde planktonik hücrelere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, biyofilm hücrelerinin antifungal direncinin artmasına neden olabilecek faktörler sırasıyla:1-biyofilmdeki maya hücrelerinin düşük büyüme hızı, 2-besin sınırlamasından kaynaklanan fenotipik değişiklikler, 3-ekstrasellüler matriks içeriğinin olası koruyucu etkisi ve 4-çeşitli direnç genlerinin artmış ekspresyonu (örn. CDR, MDR) olarak sıralanmıştır (Chandra, Mukherjee, ve ark., 2001).

Vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafunginin *C. albicans* M61, *C. albicans* GDH2346 ve *C. parapsilosis* PA/71 izolatlarına karşı planktonik ve biyofilm hücrelerindeki MİK değerleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada her iki *C. albicans* izolatının biyofilmlerinin metabolik aktivitelerinde %50 azalma saptanmış vorikonazol ve posakonazol için biyofilmdeki MİK değerleri sırasıyla 256 ve 64 µg/ml bulunmuştur. Kaspofungin'in *C. albicans* biyofilmlerine karşı maksimum inhibitör etkisi olduğu saptanmış ve her iki izolat için biyofilmdeki MİK değeri 2 µg/ml olarak kaydedilmiştir. Anidulafungin için ise planktonik MİK değeri 0,5 µg/ml iken, biyofilmdeki MİK değeri 8 µg/ml olarak saptanmıştır (Katragkou ve ark., 2010).

Zambrano'nun çalışmasında fungemiye neden olan 301 *C. albicans* izolatının farklı derecelerde (düşük, orta ve yüksek) metabolik aktivitesi ve biyokütle üretimi ile oluşturdukları biyofilmlerine karşı mikafungin, anidulafungin ve kaspofunginin antifungal aktivitesi karşılaştırılmıştır. Biyofilm kantitasyonu XTT yöntemi ile değerlendirilmiş ve buna göre düşük, orta veya yüksek metabolik aktiviteye sahip veya kristal viyole boyamasına göre düşük, orta veya yüksek biyokütleyle sahip olarak sınıflandırılmıştır.

Mikafungin ve anidulafungin, kaspofunginden daha etkili olmasına rağmen, her üç antifungalın planktonik hücrelere karşı yüksek antifungal aktivitesi görülmüştür.

Çalışmanın sonucunda mikafunginin, biyokütle üretiminin veya biyofilmin metabolik aktivitesine göre anidulafungin ve kaspofunginden daha etkili görülmüştür, anidulafungin yüksek ve orta metabolik aktif biyofilmlere karşı sadece yüksek konsantrasyonlarda (16 µg/ml) daha etkili olduğu saptanmış, kaspofunginin ise biyofilmin metabolik aktivitesine göre mikafungin ve anidulafunginden en az etkili antifungal olduğunu bulunmuştur (Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, & Guinea, 2016).

Bizim çalışmamızda Tablo 3.4.'de belirtildiği gibi anidulafunginin planktonik hücrelerin MİK değerlerine kıyasla biyofilmdeki MİK değeri (SMİK50) değişmemiş (0,25 µg/ml) fakat SMİK80 değeri yükselerek 2 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuç anidulafunginin biyofilmin erken fazında diğer antifungaller ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğunu ve direnç gelişmediğini, bununla birlikte SMİK80 değerindeki yükselmeninde direnç sınırında olmadığı da <2 µg/ml gözlenmiştir. Anidulafungin için ≤2 µg/ml sınır değer olarak bilinmektedir (Pfaller ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada ise kandan izole edilmiş 15 *C. albicans* izolatının planktonik ve biyofilm hücrelere karşı anidulafungin, kaspofungin ve mikafunginin etkinliği belirlenmiştir. XTT yöntemi kullanarak biyofilm MİK değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre anidulafunginin, kaspofungin ve mikafungine göre daha etkili olduğunu saptanmıştır (Simitsopoulou ve ark., 2013).

Bu çalışmaya benzer şekilde, bizim çalışmamızda da anidulafungin *C. albicans* biyofilm üzerine biyofilm MİK değerleri hesaplayarak amfoterisin B ve vorikonazolden daha etkili olduğunu saptanmıştır.

İmplantla ilişkili enfeksiyonların çoğunluğuna stafilokoklar; özellikle *S. epidermidis* ve *S. aureus* neden olmaktadır. Endotrakeal tüplerin, safra stentlerinin, silikon ses protezlerinin ve akrilik protezlerin enfeksiyonları da polimikrobiyal (bakteri-mantar) biyofilmler ile ilişkilidir.

Bir çalışmada, *S. epidermidis* – *C. albicans* biyofilmine karşı antifungal olarak flukonazol, antibiyotik olarak ise vankomisin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada iki *S. epidermidis* suşu (slime üreten bir vahşi tip -RP62A suşu- ve bir slime negatif mutant -M7 suşu-) kullanılmıştır. Karışık mantar-bakteriyel biyofilmlerde her iki stafilokok suşu *C. albicans* ile geniş etkileşimler göstermiştir. 48 saatlik biyofilmlerin flukonazol, vankomisin ve ikili kombinasyonların duyarlılığı kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre

vahşi tip *S. epidermidis* RP62A tarafından üretilen hücre dışı polimerin (ekstrasellüler polimer) karışık mantar-bakteriyel biyofilmlerinde flukonazol penetrasyonunu inhibe edebileceğini gösterilmiştir. *C. albicans* ve slime negatif mutant (*S. epidermidis* M7) suşu ise, bu karışık biyofilme *C. albicans*'ın varlığının, slime negatif mutant (*S. epidermidis* M7) suşunu vankomisine karşı koruduğu görülmüştür. Bu bulgular mantar hücrelerinin antibiyotiklerin etkisini değiştirebileceğini ve bakterilerin karışık mantar-bakteriyel biyofilmlerinde antifungal aktiviteyi etkileyebileceğini göstermiştir (Adam, Baillie, & Douglas, 2002). Çalışmamızda gösterildiği gibi, *C. albicans* ve *S. epidermidis*'in birlikte oluşturdukları biyofilme antifungallere karşı saptanan yüksek MİK değerleri bu bulguları desteklemektedir.

Son yıllarda *C. albicans* biyofilm ile ilgili yapılmış bir çalışmada antifungal antibiyotik kombinasyonu olarak kaspofungin ve doksisisiklin kullanılmıştır. Kaspofungin ve doksisisiklin arasındaki etkileşimin *C. albicans* olgun biyofilmine karşı indifferant (yani etkisiz) olduğu gösterilmiştir (Lown ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda bu sonuçtan farklı olarak *C. albicans* ve *S. epidermidis* kombine biyofilminin amfoterisin B, vorikonazol, anidulafungin antifungallerine daptomisin eklendiğinde yapılan checkerboard (dama tahtası) analiz sonuçlarına göre, amfoterisin B ve daptomisin kombinasyonunun etkisiz olduğu saptanmıştır. Vorikonazol ve anidulafungin ile birlikte daptomisin kullanıldığında ise antagonist etki gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, febril nötropenik hastaların kandidiyazis nedeni *C. albicans* ise ve beraberinde *S. epidermidis* enfeksiyonu da var ise, daptomisin tedavisi vorikonazol veya anidulafunginin etkinliğini azaltacağı düşünüldüğünden tedavi protokolünde bu ilaçlar birarada kullanıldığında antagonistik etki olabileceği akılda tutulmalıdır. Bu sonuç, bu konu ile ilgili literatürde bilgi bulunmaması açısından önemlidir.

C. albicans ve *S. aureus* kombine biyofilminde bizim çalışmamıza benzer şekilde flukonazol, vankomisin etkinliği stafilokinaz (SAK) eklenerek denendiğinde polimikrobiyal biyofilm kütlelerinde azalma saptanmıştır (Liu ve ark., 2019).

In vitro sonuçlar, hem metisiline duyarlı (MSSA) hem de metisiline dirençli (MRSA) *S. aureus* klinik suşlarının, *S. aureus* monomikrobiyal biyofilmlerine kıyasla *C. albicans* ile polimikrobiyal biyofilmlerde vankomisine daha az duyarlı olduğunu göstermektedir. Biyofilmlerin tedavisinde amfoterisin B veya kaspofungin ile vankomisin kullanıldığında, *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmlerinde MSSA ve MRSA'nın daha fazla inhibisyonuna ve hatta ortadan kaldırılmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, kombinasyon tedavisinin özellikle *C. albicans* - *S. aureus*

polimikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (She ve ark., 2020).

C. albicans'a özgü monoklonal fungal hücre duvarı polisakkaritlerinin *S.aureus* bakteri hücrelerini hızlı bir şekilde kapladığı gösterilmiştir. Biyofilmdeki bakteri hücrelerinin kandidadan salgılanan polisakkaritler tarafından kaplanması, antibiyotığın hücresel hedefine ulaşmasını önleyerek bakterilere ilave koruma sağlayabileceği gösterilmiştir (Kong ve ark., 2016).

Rogiers ve ark.'ın çalışmasında anidulafungin ve tigesiklin'in *C. albicans*-*S. aureus* biyofilmlerine karşı aktivitesini incelemek için intraperitoneal yabancı cisim enfeksiyonu modeli oluşturulması denenmiştir. Bu polimikrobiyal biyofilm deneyinde sadece en yüksek tigesiklin dozu (10 mg/kg vücut ağırlık/gün) *S. aureus* hücre sayısını (CFU) azaltabilmiştir. Bu da *C. albicans*'ın biyofilm içerisinde, *S. aureus*'u koruduğunu göstermektedir. Bunun sebebi, antibiyotiğe bakteriyel tolerans sağlayabilecek olan ve mantarın hücre duvar yapısında bulunan β -1,3 glukanın olabileceği düşünülmektedir. Anidulafungin bir antifungal olarak *C. albicans* biyofilmine karşı etki gösterirken fungal hücrelerin sayısını azaltarak korumasız kalan *S.aureus*'u tigesiklin'e karşı daha duyarlı hale getirmiş olabileceği ileri sürülmüştür. Anidulafunginin *S. aureus*'un biyofilm matriksindeki N-asetil glukozamin (NAG) üretimini bozduğunu ve anidulafungin ile tigesiklin kombinasyonunun *C. albicans*-*S. aureus* biyofilminde sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (Rogiers ve ark., 2018).

Benzer şekilde, Siala ve ark. kaspofunginin stafilokok biyofilmine etkisini NAG sentezini inhibe ederek yaptıklarını bulmuşlar ve bu etkinin florokinolon penetrasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Siala ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda anidulafunginin tek başına test edilmesine kıyasla anidulafungin-daptomisin kombinasyonu test edildiğinde *C. albicans*-*S. epidermidis* kombine biyofilminde daha yüksek MİK değeri elde edilmiştir. Bunun nedeni polimikrobiyal biyofilm matriksinin kalın ve kompleks olması ve ayrıca iki antimikrobiyalin antagonistik etkisinin bulunmuş olmasıdır. Yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi anidulafungin ile tigesiklin veya kinolon grubu denenmiş olsaydı antagonistik etki dışında farklı bir etkileşim gösterilebilirdi. Bu sonuçlarımıza göre, *C. albicans* ve *S. epidermidis* enfeksiyonlarının birarada olduğu durumlarda tedavide anidulafungin ile antibiyotik kombinasyonu tercihi daptomisin yerine başka bir tedavi seçeneğinin düşünülmesi önerilmektedir.

Stewart ve ark.'ın çalışmasında daptomisin'in *S. epidermidis* biyofilmindeki penetrasyon hızı ölçülmüştür. Bu çalışmada, floresan işaretli daptomisinin, kalın *S. epidermidis* biyofilmlerine kolayca penetre olabildiği ve biyofilm penetrasyonunun bir iki dakika içerisinde gerçekleştiği görülmüştür. Diğer antibiyotiklerde zaman olarak onlarca saatte penetrasyon görülürken daptomisinde çok daha kısa bir sürede penetrasyon kaydedilmiştir. Bu sonuç, daptomisinin *S. epidermidis* biyofilmine penetrasyonunun çok kısa sürede gerçekleştiğini göstermiştir, anca deneyin *in vitro* olduğu ve tek bir bakteri suşu ile gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Stewart, Davison, & Steenbergen, 2009).

Bizim çalışmamızda ise *S. epidermidis* ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilminde daptomisin ile amfoterisin B kombinasyonunda indiferent, vorikonazol ve anidulafungin birlikte olduğunda ise antagonist etki saptanmıştır. Daptomisin'in tek başına *S. epidermidis* biyofilminde etkili olduğu gösterilmesine rağmen (Stewart ve ark.) bizim çalışmamızda *S. epidermidis*'in *C. albicans* ile kombine biyofilminde etkisiz veya antagonistik etki bulunması her iki mikroorganizmanın birbirlerine koruyucu bir kalkan oluşturarak antimikrobiyal etkiyi azalttıklarını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, *P.aeruginosa* ve *C.albicans* arasındaki karmaşık etkileşimler hakkındaki son çalışmaların ışığında, bu iki türe antibiyotik ve antifungal ajanlar kullanarak tek başına ve kombine antimikrobiyal tedaviye nasıl tepki verdiğinin araştırılması da amaçlanmıştır.

Bakteri-mantar kombine enfeksiyonlarında, bağışıklık sisteminin çapraz etkileşimleri nedeniyle virülans mekanizmaları arttırarak hastalığın ilerlemesine neden olabilir (Bergeron ve ark., 2017).

C. albicans ve *P. aeruginosa*, yanık yaraları, kontamine kateterler ve akciğer enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyon bölgelerinde birlikte izole edilebilir ve birbirlerinin virülansını etkiler (Peleg & Hooper, 2010).

P. aeruginosa, eksozom ile toksinlerin üretimi ve biyofilmlerin oluşumu da dahil olmak üzere sofistike virülans mekanizmalarına sahip bir başka fırsatçı patojendir. *P. aeruginosa*'nın başka bir virülans faktörü olan LasR transkripsiyon faktörüdür. LasR, hücre yoğunluğunu algılayan quorum-sensing algılama sisteminin ana düzenleyicisidir (Bergeron ve ark., 2017).

C. albicans ve *P. aeruginosa*'nın antifungallere karşı duyarlılık çalışmalarında elde edilen MİK sonuçlarına göre meropenem eklendiğinde aditif (ek etki) gösterdiği saptanmıştır. O halde *C. albicans* ve *P. aeruginosa* kombine enfeksiyonunda antifungal

tedavi başlandığında meropenem kullanılması antifungal etkiyi arttıracığı sonucuna varılmıştır.

Keceli S. ve ark.'ları tarafından yapılmış *in vivo* çalışmasında kaspofungin ve meropenem kullanıldığında sinerji olduğu saptanmıştır. Bu sinerji, *in vitro* olarak antimikrobiyal duyarlılıkları checkerboard analizi ve *in vivo* olarak inflamasyon derecesi ile test edilmiştir. Sonuç olarak, eşzamanlı kaspofungin ve meropenem tedavisinin faydalı olabileceği gösterilmiştir (Ozcan ve ark., 2006).

Bizim çalışmamızda ise bu bulgulara ek olarak, *C. albicans*'ın *P. aeruginosa* ile birlikte oluşturduğu biyofilmde de aynı şekilde anidulafungin ve meropenem kullanıldığında ek bir etkinin saptanması tedavi etkinliğinin artırılması açısından önem taşımaktadır.

Rodrigues ve ark.'ları tarafından ventilatörle ilişkili pnömoninin (VAP) polimikrobiyal doğası, VAP'de endotrakeal tüp yüzeyini kolonize eden polimikrobiyal bakteri-fungal biyofilmleri ile polimiksin B (PolyB) ve amfoterisin B (AmB) kombinasyonu hakkında araştırma yapılmıştır. Buna göre bu kombinasyon *P. aeruginosa* ve *C.albicans*'ı içeren polimikrobiyal topluluklara karşı potansiyel bir sinerjik terapötik etki göstermiştir.

Ancak sadece yüksek dozda (256 µg/ml) PolyB, monomikrobiyal ve polimikrobiyal biyofilmleri ortadan kaldırmıştır. Antimikrobiyal tedavi sonrası, *P. aeruginosa*, 2 saatte inhibisyon gösterirken *C. albicans* 14 saat sonra inhibe olmaya başlamıştır (Rodrigues ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda ise *C. albicans* ve *P. aeruginosa* biyofilminde meropenem ile birlikte AmB kullanılmıştır ve bu iki antimikrobiyal ajan birlikte kullanıldığında ek bir etki (aditif) saptanmıştır. Rodriguez'in çalışmasında PolyB antibiyotiği ve AmB ile elde edilen sinerjizm PolyB'nin yüksek konsantrasyonunda (256 µg/ml) bulunmuştur, bununla birlikte bizim çalışmamızda meropenem ile AmB aditif etkileşimi her iki ajanın daha düşük bir konsantrasyonda (4 µg/ml) bulunmuştur.

Brucker ve ark., tarafından *E.coli*'nin, bir *E.coli-C. albicans* polimikrobiyal biyofilmindek *C. albicans*'ın amfoterisin veya kaspofungine toleransına etki etmediği kanıtlanmıştır. (Cümle düşük) Buna karşılık, *E. coli* ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmindeki *E. coli*'nin ofloksasin toleransı *E. coli* monomikrobiyal biyofilmindeki toleransına kıyasla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. *E. coli*'nin artan ofloksasin toleransı esas olarak biyofilme spesifiktir, çünkü *E. coli*'nin ofloksasin toleransı

polimikrobiyal *E. coli* ve *C. albicans* biyofilminde daha az belirgindir. Ayrıca, bu polimikrobiyal biyofilmde *E. coli*'nin ofloksasin toleransının β -1,3-glukan inhibisyonu yapan litikaz enzimi verildiğinde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Biyofilmde *E. coli*'nin ofloksasin toleransına aracılık etmede β -1,3-glukanın rolü doğrultusunda, *E. coli*'nin ofloksasin toleransının yüksek β -1,3-glukan içeren *E. coli* ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmlerinde daha da arttığı bulunmuştur. Ek olarak, *E. coli* biyofilmine esas olarak poli- β -1,3-glukandan oluşan bir polisakkarit olan laminarin ilavesi de ofloksasin toleransının artmasına neden olmuştur. Tüm bu veriler, *C. albicans*'tan β -1,3-glukanın, bir *E. coli* ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilminde *E. coli*'nin ofloksasin toleransını arttırdığını göstermektedir (De Brucker ve ark., 2015).

Alam ve ark.'ın çalışmasında, polimikrobiyal bir biyofilmde *P. aeruginosa* ile birlikte *C. albicans*'ın varlığının meropenem toleransını artırıp arttırmadığı belirlenmiştir. Mikrotitre plaklarda mono ve polimikrobiyal biyofilmler oluşturulmuş ve klinik olarak ilgili antibiyotiklerle yapılan tedavinin ardından her bir türün canlılığı ölçülmüştür. Biyofilm yapısını görüntülemek için taramalı elektron mikroskobu ve konfokal mikroskopi kullanılmıştır (Alam ve ark., 2020).

Sonuçlara göre *C. albicans*'ın klinik olarak ilgili 5 μ g/ml'lik meropenem konsantrasyonunda *P. aeruginosa* biyofilm toleransını arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkinin biyofilm kültürlerine özgü olduğu ve *C. albicans*'ın hücre dışı matriks polisakkaritleri, mannan ve glukan'a bağlı olduğu gösterilmiştir.

Mantar yapıları olan mannan ve glukanın *P. aeruginosa* ve *C. albicans* polimikrobiyal biyofilminde hücre dışı matriksine salgılandığı ve bunun da *P. aeruginosa*'nın meropenem toleransının artmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür. Bu nedenle, her iki tür ile ko-enfekte hastaların tedavi protokolünde meropenem var ise, muhtemelen artmış olabilecek toleransın düşünülmesi gerektiği savunulmuştur.

Diğer bir sonuç ise, salgılanan *C. albicans* ECM polisakkaridinin, meropenemin etkinliğini azaltarak *P. aeruginosa*'yı koruduğunun gösterilmesidir. Klinik olarak, bu durumun, korunan hücrelerin yapıları nedeniyle kalıcı bakteri enfeksiyona neden olabileceği ve bunun da subMİK antibiyotik konsantrasyonlarına sürekli maruz kalmanın bir sonucu olarak gerçek direnci oluşturabileceği ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar ile polimikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarının erken teşhisinin önemi vurgulanmış olup,

antibiyotik/antifungal kombinasyon tedavisi gibi daha etkili tedavi seçeneklerinin düşünölebileceği sonucuna varılmıştır (Alam ve ark., 2020).

Kart ve ark'ların çalışmasında, polimikrobiyal biyofilmler 96 kuyucuklu mikrotitre plaklarında tekrarlanabilir şekilde oluşturulmuştur. Piyasada bulunan dokuz dezenfektanın, polimikrobiyal biyofilmlerde *S. aureus*, *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliği belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Polimikrobiyal biyofilmdeki hangi türe etki ettiği ve etkinin gücünün, biyofilmdeki hangi mikroorganizma türüne ve dezenfektana bağlı olduğu, ayrıca polimikrobiyal biyofilmlerdeki mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı monomikrobiyal biyofilmlerden her zaman daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir (Kart ve ark., 2014).



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, in vitro olarak 96 kuyucuklu ELISA plakları kullanılarak öncelikle monomikrobiyal daha sonra da polimikrobiyal biyofilm oluşturulmuştur. Ayrıca, *C. albicans* monomikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarına karşı yaygın kullanılan amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafungin olmak üzere 3 farklı antifungalin etkisi araştırılmıştır. *C. albicans* ile *S.epidermidis* ve *C. albicans* ile *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilmi üzerinde Checkerboard analizi kullanılarak antifungaller ile daptomisin ve meropenemin etkisi araştırılmıştır.

Biyofilm kantitasyonu, kolorimetrik XTT yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Yapılmış kantitasyon deneyleri ile iki farklı mikroorganizmanın birbiriyle biyofilm oluşumunu engellediği saptanmıştır.

Bu sonuç taramalı elektron mikroskopik inceleme sonuçları ile kanıtlanmıştır.

C. albicans ile *S.epidermidis* polimikrobiyal biyofilm kombinasyonu sırasında *C. albicans* biyofilmine kıyasla %83,2 lük bir biyofilm inhibisyonu saptanmıştır. *C. albicans* ile *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminde ise bu inhibisyon *C. albicans* biyofilmine kıyasla %56,3 olarak gözlenmiştir.

Antifungaller, planktonik kandida hücrelerine karşı daha etkiliyken, biyofilme karşı aynı antifungallerin daha yüksek MİK değerlerinde kullanılması gerektiği bulunmuştur ve anidulafunginin amfoterisin B ve vorikonazole kıyasla *C. albicans* biyofilmine karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre *C. albicans* biyofilminin antifungal direnci artmaktadır.

C. albicans ile *S. epidermidis* polimikrobiyal biyofilminde antifungallerle birlikte daptomisin kullanılmıştır. Checkerboard analizi kullanılarak amfoterisin B ile daptomisin etkisiz, vorikonazol ve anidulafungin ile daptomisin antagonistik etkili bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bu tür enfeksiyonlarda antifungallerle birlikte daptomisinin iyi bir tedavi seçeneği olmadığı, literatürde faydalı bir bilgi olarak kullanılabilir.

C. albicans ile *P. aeruginosa* polimikrobiyal biyofilminde ise antifungallerle birlikte meropenem kullanılmıştır. Amfoterisin B, vorikonazol, anidulafungin meropenemle birlikte kullanıldığında ek etki (aditif) saptanmıştır. *C. albicans* ile *P. aeruginosa* polimikrobiyal enfeksiyonu olan hastalarda antifungal tedavinin yanısıra antibiyotik tedavisi de almak zorunda kaldığında, çalışmamızda saptanan meropenemin ek etkisi ile amfoterisin B, vorikonazol ve anidulafunginin etkisini arttırması bilgisi klinisyenin antibiyotik tercihinde yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Adam, B., Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*, *51*(4), 344-349. doi:10.1099/0022-1317-51-4-344
- Ahmer, B. M. (2004). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, *52*(4), 933-945. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04054.x
- Alam, F., Catlow, D., Di Maio, A., Blair, J. M. A., & Hall, R. A. (2020). *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *J Antimicrob Chemother*, *75*(4), 925-935. doi:10.1093/jac/dkz514
- Alem, M. A., Oteef, M. D., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*, *5*(10), 1770-1779. doi:10.1128/EC.00219-06
- Allison, D. G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, *19*(2), 139-150. doi:10.1080/0892701031000072190
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, *44*(7), 1818-1824. doi:10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000
- Araujo, D., Henriques, M., & Silva, S. (2017). Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends Microbiol*, *25*(1), 62-75. doi:10.1016/j.tim.2016.09.004
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, *33*(26), 5967-5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031
- Arendrup, M. C., Garcia-Effron, G., Lass-Flörl, C., Lopez, A. G., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., & Perlin, D. S. (2010). Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(1), 426-439. doi:10.1128/AAC.01256-09
- Arnold, J. W., & Silvers, S. (2000). Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poult Sci*, *79*(8), 1215-1221. doi:10.1093/ps/79.8.1215
- Ashby, M. J., Neale, J. E., Knott, S. J., & Critchley, I. A. (1994). Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, *33*(3), 443-452. doi:10.1093/jac/33.3.443
- Aykan, S. B., & Ciftci, I. H. (2015). [Changes in antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates over the past 11 years in Turkey: a meta-analysis]. *Mikrobiyol Bul*, *49*(3), 352-365. doi:10.5578/mb.9734
- Bajwa, S., & Kulshrestha, A. (2013). Fungal infections in intensive care unit: challenges in diagnosis and management. *Ann Med Health Sci Res*, *3*(2), 238-244. doi:10.4103/2141-9248.113669
- Bergeron, A. C., Barker, S. A., Brothers, K. M., Prasad, B. C., & Wheeler, R. T. (2017). Polyclonal anti-*Candida* antibody improves phagocytosis and overall outcome in zebrafish model of disseminated candidiasis. *Developmental & Comparative Immunology*. doi:doi.org/10.1016/j.dci.2016.11.017

- Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Fiandaca, M. J., Pedersen, J., Hansen, C. R., Andersen, C. B., . . . Hoiby, N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*, 44(6), 547-558. doi:10.1002/ppul.21011
- Bouffartigues, E., Joana A. Moscoso, J. A., Rachel Duchesne, R., Thibaut Rosay, T., Laurene Fito-Boncompte, L., Gwendoline Gicquel, G., . . . Sylvie, C. (2015). The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00630
- Bourgeois, N., Dehandschoewercker, L., Bertout, S., J. Bousquet, P. J., Rispaïl, R., & Lachaud, L. (2010). Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and E-test methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 154-161. doi:10.1128/JCM.01096-09
- Brown, G. D., Denning, D. W., & Levitz, S. M. (2012). Tackling human fungal infections. *Science*, 336(6082), 647. doi:10.1126/science.1222236
- Camara, M. (2007). Quorum Sensing: A Cell-Cell Signalling Mechanism Used to Coordinate Behavioral Changes in Bacterial Populations. *Membrane Computing*, 4361. doi:doi.org/10.1007/11963516_3
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 183(18), 5385-5394. doi:10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001
- Chandra, J., Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Faddoul, F. F., Hoyer, L. L., Douglas, L. J., & Ghannoum, M. A. (2001). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*, 80(3), 903-908. doi:10.1177/00220345010800031101
- Costerton, Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Costerton, Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Costerton, Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2), 114-122. doi:10.1038/nrd1008
- De Brucker, K., Tan, Y., Vints, K., De Cremer, K., Braem, A., Verstraeten, N., . . . Thevissen, K. (2015). Fungal beta-1,3-glucan increases ofloxacin tolerance of *Escherichia coli* in a polymicrobial *E. coli/Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(6), 3052-3058. doi:10.1128/AAC.04650-14
- Dobell, C. (1960). Antony van Leeuwenhoek and his "Little animals". *New York: Dover Publications INC*, 3, 239-255.
- Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*, 46(4), 207-214. doi:10.1053/jinf.2002.1120
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2), 167-193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
- Douglas, L. J. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*, 19(3), 139-143.

- Douglas, L. J. (2003a). Candida biofilms and their role in infection *Trends in Microbiology*, *11*. doi:10.1016/S0966-842X(02)00002-1
- Douglas, L. J. (2003b). Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, *11*(1), 30.
- Duane, K., & Costerton, J. W. (2018). Effects of Oral Biofilm on the Immune System. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*.
- El-Azizi, M. A., Starks, S. E., & Khardori, N. (2004). Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol*, *96*(5), 1067-1073. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02213.x
- Elder, M. J., Stapleton, F., Evans, E., & Dart, J. K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)*, *9* (Pt 1), 102-109. doi:10.1038/eye.1995.16
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, *8*(9), 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Fratesi, S. E., Lynch, F. L., Kirkland, B. L., & Brown. (2004). Effects of sem preparation techniques on the appearance of bacteria and biofilms in the carter sandstone *JOURNAL OF SEDIMENTARY RESEARCH*, *74*, 858–867.
- Fujishige, N., Kapadia, N., & Hirsch, A. (2006). A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Bot J Linnean Soc*, *150*(1), 79-88.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, *67*(3), 159-173.
- George S. Baillie, & Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*(3), 397–403., doi:doi.org/10.1093/jac/46.3.397
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention-- a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*, *198*(1), 1-15. doi:10.1007/s00203-015-1148-6
- Hall, M. R., McGillicuddy, E., & Kaplan, L. J. (2014). Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. *Surg Infect (Larchmt)*, *15*(1), 1-7. doi:10.1089/sur.2012.129
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(9), 3914-3922. doi:10.1128/AAC.00657-09
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2010). Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(9), 3746-3755. doi:10.1128/AAC.00573-10
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., & Gotz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*, *24*(5), 1013-1024. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.4101774.x
- Heinrichs, M., Baumgartner, T., Kirschbaum, C., & Ehlert, U. (2003). Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biological psychiatry*, *54*(12), 1389-1398.
- Hogan, D. A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, *5*(4), 613-619. doi:10.1128/EC.5.4.613-619.2006

- Hogan, D. A., & Kolter, R. (2002). Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 296(5576), 2229-2232. doi:10.1126/science.1070784
- Hogberg, L. D., Magiorakos, A. P., Heuer, O. E., & Monnet, D. L. (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe: regional pooling of national data from a small number of sites can be misleading. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80(1), 90. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.015
- Hoiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*, 125(4), 272-275. doi:10.1111/apm.12686
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*, 88(11), 982-990. doi:10.1177/0022034509346811
- Holcombe, L. J., Patel, N., Colyer, A., Deusch, O., O'Flynn, C., & Harris, S. (2014). Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *PLoS One*, 9(12), e113744. doi:10.1371/journal.pone.0113744
- Hsueh, Y., Somers, E., Lereclus, D., & Wong, A. (2006). Biofilm Formation by Bacillus cereus Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5089-5092.
- Hunt, T. A., Peng, W. T., Loubens, I., & Storey, D. G. (2002). The Pseudomonas aeruginosa alternative sigma factor PvdS controls exotoxin A expression and is expressed in lung infections associated with cystic fibrosis. *Microbiology*, 148(Pt 10), 3183-3193. doi:10.1099/00221287-148-10-3183
- Hussain, M., Wilcox, M. H., & White, P. J. (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev*, 10(3-4), 191-207. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb05867.x
- Ibrahima, N. H., Melake, N. A., Somilyd, A. M., Zakaria, A. S., Baddourf, M. M., & Mahmoud, A. Z. (2015). The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug resistance genes in clinical isolates of Candida species induced biofilms. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi:doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.007
- Inigo, M., Peman, J., & Del Pozo, J. L. (2012). Antifungal activity against Candida biofilms. *Int J Artif Organs*, 35(10), 780-791. doi:10.5301/ijao.5000170
- Inweregbu, K., Dave, J., & Pittard, A. (2005). Nosocomial infections. *Critical Care and Pain*, 5, 14-17.
- Jacob, M. H., Ellen, C. J., Amber, D. L., Joseph, J. T., Brandon, J., Richard, S., . . . Kenneth, W. N. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus Candida albicans Is Mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2982-2992. doi:10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001
- Jacobsen, S., Stickler, D., Mobley, H., & Shirliff, M. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(1), 26-59.
- Jacobson, M. J., Piper, K. E., Nguyen, G., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2008). In vitro activity of anidulafungin against Candida albicans biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(6), 2242-2243. doi:10.1128/AAC.00211-08
- Jahid, I. K., & Ha, S. H. (2014). The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:doi.org/10.1111/1541-4337.12087
- James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., . . . Stewart, P. S. (2008). Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 16(1), 37-44. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, 236(2), 163-173.

- Jones, R. N., Nilius, A. M., Akinlade, B. K., Deshpande, L. M., & Notario, G. F. (2007). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from a 2005 clinical trial of uncomplicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(9), 3381-3384. doi:10.1128/AAC.01588-06
- Kalkancı, Yalınay, Ç. M., Mansuroglu, H., & Kustimur, S. (1999). *Candida* türlerinde slaymfaktör belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, *29*, 183–185.
- Kalkancı, A. (2003). *Yeni antifungaller ve direnç mekanizmaları*. Paper presented at the 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı, Bodrum, Türkiye.
- Kart, D., Tavernier, S., Van Acker, H., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2014). Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, *30*(3), 377-383. doi:10.1080/08927014.2013.878333
- Katragkou, A., Kruhlak, M. J., Simitopoulou, M., Chatzimoschou, A., Taparkou, A., Cotten, C. J., . . . Roilides, E. (2010). Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combinatio. *The Journal of Infectious Diseases*, *201*(12), 1941–1949 doi:10.1086/652783
- Keceli Ozcan, S., Dundar, D., & Sonmez Tamer, G. (2012). [Anti-candidal activity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains and in vitro inhibition of *Candida* biofilm formation]. *Mikrobiyol Bul*, *46*(1), 39-46.
- Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P. J., & Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol*, *52*(5), 385-387. doi:10.1136/jcp.52.5.385
- Khardori, N., & Yassien, M. (1995). Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol*, *15*(3), 141-147. doi:10.1007/BF01569817
- Kim, J., & Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*, *49*(2), 171-177. doi:10.1007/s12275-011-1064-7
- Kong, E. F., Tsui, C., Kucharikova, S., Andes, D., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2016a). Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *mBio*, *7*(5). doi:10.1128/mBio.01365-16
- Kong, E. F., Tsui, C., Kucharikova, S., Andes, D., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2016b). Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *American Society for Microbiology*, *7*(5). doi:10.1128/mBio.01365-16
- Kucharikova, S., Tournu, H., Holtappels, M., Van Dijck, P., & Lagrou, K. (2010). In vivo efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(10), 4474-4475. doi:10.1128/AAC.00697-10
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol*, *41*(1), 506-508. doi:10.1128/jcm.41.1.506-508.2003
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, *70*(2), 878-888. doi:10.1128/iai.70.2.878-888.2002

- Lasa, I., & Penades, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, *157*(2), 99-107. doi:10.1016/j.resmic.2005.11.003
- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., & Jeffers, A. K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol*, *175*(11), 7512-7518. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7512
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(4), 999-1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*, *5*(1), 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557
- Li, X., Yan, Z., & Xu. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans* *Microbiology*, *149*, 353–362 doi:DOI 10.1099/mic.0.25932-0
- Lin, Y. J., Alsad, L., Vogel, F., Koppar, S., Nevarez, L., Auguste, F., . . . Loomis, J. S. (2013). Interactions between *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* within mixed species biofilms *BIOS*, *84*(1), 30-39. doi:doi.org/10.1893/0005-3155-84.1.30
- Liu, H., Chen, H., Sun, Y., Zhang, X., Lu, H., Li, J., . . . Zhou, T. (2019). Characterization of the mechanism and impact of staphylokinase on the formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *J Med Microbiol*, *68*(3), 355-367. doi:10.1099/jmm.0.000914
- Lown, L., Peters, B. M., Walraven, C. J., Noverr, M. C., & Lee, S. A. (2016). An Optimized Lock Solution Containing Micafungin, Ethanol and Doxycycline Inhibits *Candida albicans* and Mixed *C. albicans* - *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS One*, *11*(7), e0159225. doi:10.1371/journal.pone.0159225
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, *15*(2), 194-222. doi:10.1128/cmr.15.2.194-222.2002
- Malik, A., Erginkaya, Z., & Erten, H. (2019). *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies* doi:doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8
- March, J. C., & Bentley, W. E. (2004). Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, *15*(5), 495-502. doi:10.1016/j.copbio.2004.08.013
- Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2016). Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. *Medical Mycology*, 155–161 doi:doi: 10.1093/mmy/myv094
- Matthews, P. C., Berendt, A. R., McNally, M. A., & Byren, I. (2009). Diagnosis and management of prosthetic joint infection. *BMJ*, *338*, b1773. doi:10.1136/bmj.b1773
- Millsap, K. W., Bos, R., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999). Influence of aeration of *Candida albicans* during culturing on their surface aggregation in the presence of adhering *Streptococcus gordonii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *26*(1), 69-74.
- Mosel, D. D., Dumitru, R., Hornby, J. M., Atkin, A. L., & Nickerson, K. W. (2005). Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol*, *71*(8), 4938-4940. doi:10.1128/AEM.71.8.4938-4940.2005
- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., & Pfaller, M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology 9th ed.* Washington DC: Amerikan Society for Microbiology.

- Nett, J. E., & Andes, R. D. (2015). Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. *Microbiol Spectr*, 3(3). doi:10.1128/microbiolspec.MB-0008-2014
- Nett, J. E., Guite, K. M., Ringeisen, A., Holoyda, K. A., & Andes, D. R. (2008). Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(9), 3411-3413. doi:10.1128/AAC.01656-07
- Nira, R., Yue, Z., Clement, O.-T., Yixuan, D., Eric, B., & Herman, O. S. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiolytic agents. *Future Med Chem.*, 7(4), 493-512.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*, 69, 71-92. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104330
- Novick, R. P., & Muir, T. W. (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2(1), 40-45. doi:10.1016/s1369-5274(99)80007-1
- O'Gara, J. P., & Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*, 50(7), 582-587. doi:10.1099/0022-1317-50-7-582
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 30(2), 295-304. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x
- Odds, F. C., Nuffel, L. F., & Gow, N. A. (2000). Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host *Microbiology*, 146, 1881-1889.
- Oh, K. B., Miyazawa, H., Naito, T., & Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4664-4668. doi:10.1073/pnas.071404698
- Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 207-228. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_10
- Özcan Keceli, S. (2007). *Candida* biofilm and infections related to medical devices: medical education *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27, 589-600.
- Ozcan, S. K., Budak, F., Willke, A., Filiz, S., Costur, P., & Dalcik, H. (2006). Efficacies of caspofungin and a combination of caspofungin and meropenem in the treatment of murine disseminated candidiasis. *APMIS*, 114(12), 829-836. doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm_450.x
- Ozcan, S. K., Mutlu, B., Dundar, D., & Willke, A. (2010). [Comparison of broth microdilution and E-test methods for the antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. strains isolated from blood cultures]. *Mikrobiyol Bul*, 44(2), 263-271.
- Padera, R. F. (2006). Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol*, 15(5), 264-270. doi:10.1016/j.carpath.2006.04.008
- Palleroni, N. J. (2003). Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, 149(Pt 1), 1-7. doi:10.1099/mic.0.25952-0
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34(9), 577-588. doi:10.1007/s10295-007-0234-4
- Pammi, M., Liang, R., Hicks, J., Mistretta, T. A., & Versalovic, J. (2013). Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *BMC Microbiol*, 13, 257. doi:10.1186/1471-2180-13-257

- Park, S. J., Han, K. H., Park, J. Y., Choi, S. J., & Lee, K. H. (2014). Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. *Yonsei Med J*, 55(2), 449-458. doi:10.3349/ymj.2014.55.2.449
- Pasteur, L. (1864). Memoire sur la fermentation acetique. *Ann. Scient. L'Ecole Normale Superiure*, 133-158.
- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F., & Koch, C. (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 47(1), 6-13. doi:10.1136/thx.47.1.6
- Peleg, Hogan, & Mylonakis. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*, 8(5), 340-349. doi:10.1038/nrmicro2313
- Peleg, & Hooper, D. C. (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria *The New England Journal of Medicine*.
- Percival, S. L., Knottenbelt, D. C., & Cochrane, C. A. (2011). Introduction to Biofilms, in Biofilms and Veterinary Medicine. *Springer: Verlag Berlin Heidelberg*.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*, 25(1), 193-213. doi:10.1128/CMR.00013-11
- Peters, B. M., Ovchinnikova, E. S., Krom, B. P., Schlecht, L. M., Zhou, H., Hoyer, L. L., . . . Shirtliff, M. E. (2012). Staphylococcus aureus adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology*, 158(12), 2975–2986. doi:10.1099/mic.0.062109-0
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Andes, D., Arendrup, M. C., Brown, S. D., Lockhart, S. R., . . . Perlin, D. S. (2011). Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resistance Updates*, 14(3), 164-176.
- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tummala, S., & Lopez-Ribot, J. L. (2010). A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp*(44). doi:10.3791/2287
- Poulsen, L. V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *Lebensm c. Wiss. u. Techn*, 32(6), 321-326.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*, 7(4), 493-512. doi:10.4155/fmc.15.6
- Raffa, R., Iannuzzo, J., & Levine, D. (2005). Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Pharmacol Exp Ther*, 312, 417-423.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, 2012, 528521. doi:10.1155/2012/528521
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5459-5463. doi:10.1128/aem.68.11.5459-5463.2002
- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, 18(4), 163-170.

- Rasmussen, B. T., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 149-161.
- Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*, 36(5), 347-355. doi:10.1557/mrs.2011.65
- Ribeiro, S. M., Felicio, M. R., Boas, E. V., Goncalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., . . . Franco, O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther*, 160, 133-144. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.02.006
- Rodrigues, M. E., Lopes, S. P., Pereira, C. R., Azevedo, N. F., Lourenco, A., Henriques, M., & Pereira, M. O. (2017). Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia: Fighting In Vitro *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms with Antifungal-Antibacterial Combination Therapy. *PLoS One*, 12(1), e0170433. doi:10.1371/journal.pone.0170433
- Rogiers, O., Holtappels, M., Siala, W., Lamkanfi, M., Van Bambeke, F., Lagrou, K., . . . Kucharikova, S. (2018). Anidulafungin increases the antibacterial activity of tigecycline in polymicrobial *Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* biofilms on intraperitoneally implanted foreign bodies. *J Antimicrob Chemother*, 73(10), 2806-2814. doi:10.1093/jac/dky246
- Saginur, R., Stdenis, M., Ferris, W., Aaron, S. D., Chan, F., Lee, C., & Ramotar, K. (2006). Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(1), 55-61. doi:10.1128/AAC.50.1.55-61.2006
- Savage, V. J., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(4), 1968-1970. doi:10.1128/AAC.02008-12
- Saxena, N., Maheshwari, D., Dadhich, D., & Singh, S. (2014). Evaluation of Congo Red Agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*(3(59)), 13234 – 13238.
- Sbordone, L., & Bortolaia, C. (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin. Oral Investig*, 7(4), 181–188
- Schlecht, L. M., Peters, B. M., Krom, B. P., Freiberg, J. A., Hansch, G. M., Filler, S. G., . . . Shirliff, M. E. (2015). Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology*, 161(Pt 1), 168-181. doi:10.1099/mic.0.083485-0
- Sellam, A., Al-Niemi, T., McInnerney, K., Brumfield, S., Nantel, A., & Suci, P. A. (2009). A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. *BMC Microbiol*, 9, 25. doi:10.1186/1471-2180-9-25
- Serena Leone, Antonio Molinaro, Fabiana Alfieri, Valeria Cafaro, Rosa Lanzetta, & Parrillia, A. D. D. a. M. (2016). The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res.*, 341, 2456 – 2461.
- She, P., Liu, Y., Wang, Y., Tan, F., Luo, Z., & Wu, Y. (2020). Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* sp. *J Appl Microbiol*, 128(1), 88-101. doi:10.1111/jam.14443
- Shin, J. H., Kee, S. J., Shin, M. G., Kim, S. H., Shin, D. H., Lee, S. K., . . . Ryang, D. W. (2002). 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. doi:10.1128/jcm.40.4.1244-1248.2002
- Shirtliff, M. E., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 299(1), 1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x
- Shuford, J. A., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2007). 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(3), 277-281. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.004
- Siala, W., Kucharikova, S., Braem, A., Vleugels, J., Tulkens, P. M., Mingeot-Leclercq, M. P., . . . Van Bambeke, F. (2016). The antifungal caspofungin increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting N-acetylglucosamine transferase. *Nat Commun*, 7, 13286. doi:10.1038/ncomms13286
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 19(5), 241-247. doi:10.1016/j.tim.2011.02.003
- Simitsopoulou, M., Peshkova, P., Tasina, E., Katragkou, A., Kyrpitzis, D., Velegriaki, A., . . . Roilides, E. (2013). Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(6), 2562-2570. doi:10.1128/AAC.02541-12
- Soll, D. R., & Daniels, K. J. (2016). Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 565-595. doi:10.1128/MMBR.00068-15
- Solomon, S. L., & Oliver, K. B. (2014). Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink. *Am Fam Physician*, 89(12), 938-941.
- Stewart, P. S., Davison, W. M., & Steenbergen, J. N. (2009). Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8), 3505-3507. doi:10.1128/AAC.01728-08
- Suci, P., Mittelman, M., Yu, F., & Geesey, G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*(38(9)), 2125–2133
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(Pt 1), 3-9. doi:10.1099/00221287-147-1-3
- Taff, H. T., Nett, J. E., Zarnowski, R., Ross, K. M., Sanchez, H., Cain, M. T., . . . Andes, D. R. (2012). A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*, 8(8), e1002848. doi:10.1371/journal.ppat.1002848
- Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M., & Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World J Urol*, 24(1), 13-20. doi:10.1007/s00345-005-0050-2
- Tormo, M. A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., & Penades, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, 151(Pt 7), 2465-2475. doi:10.1099/mic.0.27865-0
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2005). Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*, 135(17-18), 243-251. doi:2005/17/smw-10934

- Tümbay, E. (1999). *Kandida Türleri*. ANKARA: Öncü Basımevi. Güneş Kitabevi.
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., & Lopez-Ribot, J. L. (2009). Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. *Mycopathologia*, *168*(3), 101-109. doi:10.1007/s11046-009-9205-9
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., . . . Lopez-Ribot, J. L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLOS Pathog.*, *6*. doi:doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828
- Weist, K., & Diaz Hogberg, L. (2014). ECDC publishes 2013 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Euro Surveill*, *19*(46). doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.46.20962
- Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F., & Wenzel, R. P. (1988). Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*, *148*(12), 2642-2645. doi:10.1001/archinte.148.12.2642
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, *39*(3), 309-317. doi:10.1086/421946
- Wong, A. C. (1998). Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci*, *81*(10), 2765-2770. doi:10.3168/jds.s0022-0302(98)75834-5
- Yücel, A., & Kantarcıoğlu, A. (2000). *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. *Cerrahpasa J Med.*, *31*, 172-186.
- Yücesoy, M. (2005). *Candida türlerinde antifungal direnç mekanizmaları*. Paper presented at the 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı, Konya, Türkiye.
- Yücesoy, M. (2006). *Antifungallere direnç*. İstanbul, Türkiye: 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı.
- Zhang, L., & Mah, T. F. (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol*, *190*(13), 4447-4452. doi:10.1128/JB.01655-07
- Zobell, C. E., & Allen, E. C. (1935). The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *J Bacteriol*, *29*(3), 239-251. doi:10.1128/JB.29.3.239-251.1935

8. ÖZGEÇMİŞ

| <u>Kişisel Bilgiler</u> | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adı Soyadı | Agim OSMANI |
| Doğum Yeri ve Tarihi | Makedonya 10.06.1982 |
| İletişim Adresi | Kavacık, Subayevleri Mahallesi Paşabahçe Sokak 15/2 Keçiören, ANKARA, |
| Telefon | +905362077739 |
| E-posta | gimi84@hotmail.com |
| Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre) | Lisans : 2002 - 2009 Aziz ve Kiril Üniversitesi Tıp Fakültesi – Üsküp 2011 – 2012 Gazi Üniversitesi TÖMER (1 yılı Türkçe hazırlık programı) - Ankara Doktora : 2012 - 2020 Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |
| Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri | Pratisiyen Doktor: 2010 – 2011 ‘‘ GETOAR ‘‘ Özel Polikliniği Asistan: 2012 – 2018 Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |
| Yabancı Dil Bilgileri | İngilizce, Almanca, Türkçe, Makedonca, Boşnakça |
| Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar | Tabipler Odası – Üsküp |
| <u>Bilimsel Etkinlikler</u> | |
| Makaleler | Er DK, Dundar D, Uzuner H, Osmani A. , Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of Escherichia coli. Microb Pathog. 2015 |

| | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Dec;89:188-94. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.014. Epub 2015 Oct 28. |
| | Uzuner H, Karadenizli A, Er DK, Osmani A. , Investigation of the efficacy of alcohol-based solutions on adenovirus serotypes 8, 19 and 37, common causes of epidemic keratoconjunctivitis, after an adenovirus outbreak in hospital. J Hosp Infect. 2018 Nov;100(3):e30e36. doi: 10.1016/j.jhin.2018.05.011. Epub 2018 May 21. |
| | Ustalar a., Yılmaz M., Osmani A. , Keçeli S. A., Synthesis and antifungal activity of new dihydrofurocoumarins and Dihydrofuroquinolines. Turk. J. Chem. 2017 Feb; 41, 80-88, doi:10.3906/kim-1604-22. 2017.02.22. Epub 11.04.2016 |
| Projeler | TÜBİTAK Projesi Antifungal-daptomisin kombinasyonlarının <i>Candida albicans-Staphylococcus epidermidis</i> biyofilmine, antifungal-meropenem kombinasyonlarının <i>Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa</i> biyofilmine etkisinin araştırılması. (Araştırmacı) Proje No: 315S187. |
| Bildiriler | ER D. K. , DÜNDAR D. , UZUNER H. , OSMANİ A. , Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of Escherichia coli. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, İspanya, 10 - 13 Mayıs 2014, ss.11-15 (Uluslararası) |
| | UZUNER H. , KARADENİZLİ A. , ER D. K. , OSMANİ A. , Epidemik Keratokonjunktivit Etkeni Adenovirüs19 Ve 37 Üzerine Antiseptik Kombinasyonlarının Etkisinin Araştırılması. 37. Türk Mikroblyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16 - 20 Kasım 2016 (Ulusal) |

| | |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>DUYMAZ F. Z. , GENÇ S., OSMANİ A., UZUNER H. , DÜNDAR D., Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus Suşlarının Vankomisin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarında Yıllar İçindeki Değişim. 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Türkiye, 12 - 16 November 2014 (Ulusal)</p> |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

