

Klinik Örneklerden Elde Edilen Albicans ve Non-albicans Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Araştırılması ve Türlerine Göre Dağılımı

Investigation of Biofilm Formation in Albicans and Non-Albicans Candida Species Obtained from Clinical Specimens and Distribution by Species

Yeşim Alpay¹, Canan Ağalar², Nilgün Karabıçak³, Dilek Kılıç⁴, Sedat Kaygusuz⁴, Ergin Ayaşlıoğlu⁴, Berrin Esen⁵

1Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

2Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

3Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikoloji Referans Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

4Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

5Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Candida türleri, dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli nedenleri arasında kabul edilmektedir. Başlıca virülans faktörleri; biyofilm oluşumu, fosfolipaz ve asit proteaz üretimidir. Biyofilm üretimi türleri Candida'lar için önem taşımaktadır ve antifungal direnç ile ilişkilidir. Çalışmada; non-albicans Candida'lar ve C. albicans türlerinde biyofilm oluşumu araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışmaya, klinik örneklerden izole edilen 53 Candida suşu alındı. 37°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası sabouraud dekstroz agarda (SDA) saf olarak üretilen kolonilerin tiplendirilmesinde; mikroskopik değerlendirme, germ tüp testi, ve API ID 32C (bio Mérieux, Fransa) kullanıldı. Tüm suşlarda biyofilm üretimi araştırıldı. Biyofilm varlığı tespiti için glukozlu triptik soy broth (modifiye tüp adherens yöntemi) kullanıldı.

BULGULAR: Elli üç Candida suşunun 34'ü (%64,1) C. albicans, 11'i (%20,7) C. parapsilosis, 4'ü (%7,5) C. kefir, 3'ü (%5,6) C. tropicalis ve 1'i (%1,8) C. glabrata olarak saptandı. Tüm suşlar değerlendirildiğinde; biyofilm oluşumu % 47,2 olarak saptandı. Albicans türü Candida'larda %38,2 oranında, non-albicans Candida'larda ise %63,1 oranında biyofilm oluşumu gözlemlendi.

C albicans suşlarının %38,2'inde (13), C parapsilosis suşlarının %63,6'sinde (7), C. kefir suşlarının %50'sinde (2), C. tropicalis suşlarının %66,6'sinde (2) ve bir C glabrata (1) suşunda biyofilm üretimi tespit edildi. Biyofilm pozitifliği gösteren suşların; %96'sının, servis ve yoğun bakımlarda yatmakta olan ve uzun süreli antibiyotik tedavisi alan hastalardan izole edildiği gözlemlendi.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Doğada mikrobiyal büyümede ve klinik enfeksiyonların gelişmesinde biyofilm oluşumu büyük önem taşımakta olup, mikroorganizmayı konak savunmasından ve antimikrobiyalardan korumaktadır. İlişkili mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç yüksektir. Son yıllarda invazif uygulamaların artışı ile fungal patojenler için risk artışı da söz konusudur. Non-albicans kandidemilerin artışı ve biyofilm oluşumu artan antifungal direnç neden olmaktadır. Etken profili ve antimikrobiyal duyarlılıkta epidemiyolojik değişimler göz önüne alındığında Candida suşları da dikkatli şekilde değerlendirilmelidir. Etken dağılımı, biyofilm oluşumu, antifungal duyarlılık durumlarının bilinmesi, uygun tedavinin belirlenmesi, lokal verilerin ışığında ampirik tedavi seçimlerinin doğru yapılması ve sonuçlar açısından yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, candida, non-albicans candida

ABSTRACT

INTRODUCTION: Candida species are one of the important causes of hospital-acquired infections worldwide. Major virulence factors are; biofilm formation, phospholipase and acid protease production. Biofilm production are important for Candida species and associated with antifungal resistance. In the study; Biofilm formation in non-albicans Candida and C. Albicans species was investigated.

MATERIAL and METHOD: Fiftythree Candida species isolated from clinical specimens. Typing of purely produced colonies on sabouraud dextrose agar (SDA) after 48-72 hours incubation at 37° C; microscopic evaluation, germ tube test, and API ID 32C (bio Mérieux, France) were used. In all cases, biofilm production was investigated. Glucose tryptic soy broth (modified tube adherens method) was used to detect biofilm presence.

RESULTS: Biofilm formation was observed in 38.2% of albicans Candida species and 63.1% in non-albicans Candida species. Of the thirty three candida species, 34 (64.1%) were C. albicans, 11 (20.7%) were C. parapsilosis, 4 (7.5%) were C. kefir, 5,6) C. Tropicalis and 1 (1.8%) C. Glabrata were detected. When all species are evaluated; biofilm formation was found to be 47.2%. Biofilm production in C. Albicans 38.2% (13), in C. parapsilosis 63.6% (7), in C. kefir 50% (2), in C. glabrata (1) was detected. Species showing biofilm positivity; 96% were isolated from patients receiving long-term antibiotic therapy in the service and intensive care unit.

DISCUSSION and CONCLUSION: Biofilm formation is very important factor in microbial growth and in the development of clinical infections. It protects the microorganism from host defense and antimicrobials. Antimicrobial resistance is high in bacteria producing biofilms. In recent years, the risk for fungal pathogens has increased within invasive procedures.

Non-albicans candidiasis and biofilm formation associated antifungal resistance. Considering the epidemiological changes in the efficacy profile and antimicrobial susceptibility, Candida species should also be evaluated carefully. Distribution of microorganism, biofilm formation, knowledge of antifungal susceptibility, local datas will be useful choices of empirical appropriate treatment.

Key Words: Biofilm, candida, non-albicans candida

İletişim / Correspondence:

Dr. Yeşim ALPAY

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

E-mail: yesim.alpay@hotmail.com

Başvuru Tarihi: 03.08.2016

Kabul Tarihi: 08.01.2017

GİRİŞ

Candida türleri deri ve mukozaların normal flora üyeleridir. Patolojik süreçlere katılan mantarlar, son yıllarda önemli hale gelmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli nedenleri arasında kabul edilmektedir (1). Epidemiyolojik değişimlerin gözlenmesi, kandidemi sebeplerini öngörmede ve antifungal tedavi seçimleri açısından önem taşımaktadır (2).

Candida'lar kommensal mikroorganizmalar olup, patojenik etki için immün sistem fonksiyonlarını olumsuz etkileyen durumlar gerekmektedir. Diabetes mellitus, antibiyotik kullanımı, immünsüpresif ilaç kullanımı, invazif uygulamalar ve cerrahi girişimler, hiperalimentasyon sıvıları ve organ nakli gibi risk faktörleri varlığında, Candida enfeksiyonları fırsatçı enfeksiyon olarak ortaya çıkabilmektedir (3).

Candida türleri için başlıca virülans faktörleri; biyofilm oluşumu, fosfolipaz ve asit proteaz üretimidir. Biyofilm üretiminin başlıca avantajları; mikroorganizmanın çevreden korunması, besinlere ulaşılabilirlik, metabolik işbirliği ve yeni genetik özelliklerin kazanılmasıdır (3).

Biyofilmler; mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik polimerik matriksle kaplı hücre kolonileri olup, genel bir mikrobiyal büyüme faktörünü temsil etmektedir ve invazif aletlerin yüzeyinde saptanabilmektedir (4, 5).

Biyofilm üretimi non-albicans Candida'lar ve C. albicans türleri için, önem taşımaktadır ve antifungal direnç ile ilişkilidir (6, 7). Burada yer alan çalışmada; non-albicans Candida'lar ve C. albicans türlerinde biyofilm oluşumu araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya; klinik örneklerden izole edilen 53 Candida suşu alındı. 37°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası sabouraud dekstroza (SDA) saf olarak üretilen kolonilerin tiplendirilmesinde; mikroskopik değerlendirme, germ tüp testi, ve API ID 32C (bio Mérieux, Fransa) kullanıldı. Tüm şuşlarda biyofilm üretimi araştırıldı. Biyofilm varlığı tespiti için glukozlu triptik soy broth (modifiye tüp adherens yöntemi) kullanıldı.

Tüp adherens yöntemi için; SDA içeren plaktan bir öze dolusu organizma son konsantrasyonu %8 olacak şekilde glukoz ile zenginleştirilmiş, 10 ml sabouraud likid medium içeren tüplere inoküle edildi. Tüpler 37° C de, 24 saat inkübe edildikten sonra tüp içeriği aspire edildi ve distile su ile yıkandı. %1 Safranin ile boyanarak 7 dakika bekletildi. Tüpler ters çevrilerek süzdürüldü. Biyofilm oluşumu tüp içerisinde oluşan kırmızı pembe renkli yapışkan film tabakanın oluşması ile değerlendirilerek, pozitiflik kabul edildi. Farklı üç gözlemci ile doğrulandı (8).

İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 programı kullanıldı. Tanımlayıcı analizler yapıldı ve yüzde ve frekanslar hesaplandı. Kategorik değişkenler için ki kare testi kullanıldı.

BULGULAR

İncelenen örneklerin; 32'si idrar, 8'i yara, 5'i boğaz, 4'ü balgam, 2'si kan, 1'i kateter ve 1'i de trakeal aspirattan izole edilen suşlar idi. 53 Candida suşunun 34'ü (%64,1) C. albicans, 11'i (%20,7) C. parapsilosis, 4'ü (%7,5) C. kefyr, 3'ü (%5,6) C. tropicalis ve 1'i (%1,8) C. glabrata olarak saptandı. Tüm suşlar değerlendirildiğinde; biyofilm oluşumu %47,2 olarak saptandı. Albicans türü Candida'larda %38,2 oranında, non-albicans Candida'larda ise %63,1 oranında biyofilm oluşumu gözlemlendi.

C. albicans suşlarının %38,2'inde (13), C. parapsilosis suşlarının %63,6'sinde (7),

C. kefyr suşlarının %50'sinde (2), C. tropicalis suşlarının %66,6'sinde (2) ve bir C. glabrata suşunda biyofilm üretimi tespit edildi.

Çalışmamızda yer alan biyofilm pozitifliği gösteren albicans ve non-albicans Candida suşlarının; %96'sının servis ve yoğun bakımlarda yatmakta olan ve uzun süreli antibiyotik tedavisi alan hastalardan elde edilen örneklerden izole edildiği gözlemlendi. Antibiyotik kullanım oranı biyofilm oluşturan non-albicans suşlarda %75, albicans Candida'larda %48 olarak saptandı.

Tablo-1: Biyofilm Üretimini Türlerine Göre Dağılımı

<i>Candida</i> türleri	n(%)	Biyofilm üretimi n(%)
<i>C. albicans</i>	64,1	38,2
<i>C. parapsilosis</i>	20,7	63,6
<i>C. kefyr</i>	7,5	50,0
<i>C. tropicalii</i>	5,6	66,6
<i>C. glabrata</i>	1,8	100

TARTIŞMA

Candida türleri doğada ve insanda yaygın olarak bulunmakla birlikte, bir kısmı insanda patojendir. Yüzeysel mikozlardan sistemik mikozlara kadar değişen derecelerde hastalık oluşturma yeteneğine sahiptirler (3). Doğada mikrobiyal büyümede ve klinik enfeksiyonların gelişmesinde biyofilm oluşumu büyük önem taşımakta olup, mikroorganizmayı konak savunmasından ve antimikrobiyallerden korumaktadır. İlişkili mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç yüksektir (9). Mantarların, protez cihazlarda ve kateter yüzeylerinde biyofilm oluşturma yeteneği, intravasküler nozokomial enfeksiyonların yüksek prevalansına katkıda bulunmakta ve bağışıklık sistemi baskılanmış, kritik hastalarda, kandidiyazisten ölüm oranlarını arttıran bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (10, 11).

Çalışmamızda; *Candida* örneklerinde biyofilm oluşumu %42,7 oranında saptanmıştır. Biyofilm pozitifliği albicans türü *Candida*'larda %38,2 iken, non-albicans *Candida*'larda %63,1 oranında bulunmuştur. Arslan ve ark.ın çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 100 *C. albicans* suşunu değerlendirdikleri çalışmada, benzer şekilde %48 oranında biyofilm üretimi saptanmıştır (12). Biyofilm üretiminin tüm *Candida* izolatlarında %12 oranında saptandığı bir diğer çalışmada ise; *C. albicans* kökenlerinde %8,3, non-albicans kökenlerde ise bu oran %25 olarak bulunmuştur (13).

Çalışmada yer alan izolatlardan; *C. albicans* suşlarının 13'ünde (%38,2), *C. parapsilosis* suşlarının 7'sinde (%63,6), *C. kefyr* suşlarının 2'sinde (%50), *C. tropicalis* suşlarının 2'sinde

(%66,6) ve bir *C. glabrata* suşunda (%100) biyofilm üretimi saptanmıştır.

Kaskatepe ve ark. ın yaptığı çalışmada da biyofilm oluşumu non-albicans *Candida*'larda

C. albicans suşlarına göre anlamlı oranda yüksek bulunmuş ve %66,6 oranıyla en yüksek oranda *C. parapsilosis* izolatlarında saptanmıştır (14). Biyofilm üretiminin çalışmamızda olduğu gibi *C. parapsilosis* suşlarında yüksek oranlarda saptandığını bildiren diğer çalışmalar da mevcuttur (15, 16). Agwan ve ark. ın çalışmasında da; %40 oranında *C. albicans*, %50 oranında non-albicans *Candida* suşlarında biyofilm üretimi saptanmış ve non albicans *Candida*'lardan en fazla *C. tropicalis* (%44,4) te pozitif bulunmuştur (17).

Üriner kateter ilişkili kandidüri etkeni izolatlarda; biyofilm oranları non-albicans *Candida*'larda (%63), albicans *Candida*'larda (%40) olarak saptanmıştır (18).

Son yıllarda mikrobiyal biyofilm nedeniyle kalıcı tıbbi cihazlar ile ilgili enfeksiyonlarda artış önem kazanmıştır (4). Hastanede yatan hastalarda kalıcı cihazlarda sık görülmesinin önemi, mukozal yüzeylerde ve kalıcı cihazların yüzeyinde biyofilm oluşumunun sıklığı ile ilgilidir ve bu yüzeylerde maya mikrokolonilerini, hiflerini ve psödohiflerini kapsayan bir komplekstir (18). Antibiyotik kullanımları *Candida* enfeksiyonları için risk faktörüdür (3, 19).

Çalışmamızda izole edilen ve biyofilm oluşturan *Candida* suşlarının çoğunluğu hastanede yatmakta olan hastalardan izole edilmiş olup, %96'sının servisler ve yoğun bakımdan, %4'ünün ise polikliniklerden gönderilen örneklerden elde edildiği gözlenmiştir. Yine antibiyotik kullanımı açısından değerlendirildiğinde biyofilm oluşumu gözlenen non-albicans suşlarda antibiyotik kullanım oranı %75 oranında saptanırken, albicans *Candida*'larda bu oran %48 olarak saptanmıştır.

Candida'lar dahil pek çok patojen, kolonizasyon, invazyon ve patogeneze yardımcı olmak üzere virülans faktörü olarak kabul edilen etkili güçler ve spesifik stratejilere sahiptir. *Candida*'ların dış yüzeyindeki katmanların çoğu konak hücreye tutunma için gereklidir ve kandidiazis patofizyolojisinde önemli rol oynar (20). Biyofilm mantarların yaşam ve patojenitesi için konak immün mekanizmalarından korunmada, antifungal

tedaviye dirençte ve diğer mikroorganizmalarla yarış baskısına dayanabilmede yardımcı olabilmektedir ve nihayetinde; biyofilme ilgili enfeksiyonlarda, yüksek düzey antimikrobiyal dirençle ve tedavi zorluğu ile karşı karşıya kalınmaktadır (15, 21). *Candida*'lar ve antifungal direnç ilişkisinde non-albicans *Candida* kökenlerinin, *C.albicans* suşlarına göre genellikle daha fazla dirençli olduğu bildirilmektedir (22). Dolayısı ile, antifungal dirençle birlikte yüksek biyofilm üretimi, bu kökenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde güçlükler yol açabilmektedir.

Bu durum biyofilm oluşumunun, non-albicans *Candida*'larda daha fazla görülmesiyle ilişkili görünmektedir.

Çalışmamızda antifungal duyarlılıkların yer almaması kısıtlılıklardan biri olup, daha büyük örneklerde, antifungal direncin de değerlendirildiği detaylı çalışmaların dizayn edilmesi düşüncesi oluşmuştur.

Sonuç olarak; son yıllarda invazif uygulamaların artışı ile fungal patojenler için risk artışı da söz konusudur. Non-albicans kandidemilerin artışı ve biyofilm oluşumu artan antifungal dirence neden olmaktadır. Etken profili ve antimikrobiyal duyarlılıkta epidemiyolojik değişimler göz önüne alındığında *Candida* suşları da dikkatli şekilde değerlendirilmelidir. Etken dağılımı, biyofilm oluşumu, antifungal duyarlılık durumlarının bilinmesi; lokal verilerin ışığında uygun tedavinin belirlenmesi, ampirik tedavi seçimlerinin doğru yapılması ve sonuçlar açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Calderone RA, Clancy CJ. *Candida* and Candidiasis: ASM Press, Washington, DC, 2012:1-5
2. Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V et al. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001. *Revista Argentina de microbiologia*. 2004;36:107-12.
3. Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *Journal of global infectious diseases*. 2011;3:4-8.

4. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R et al. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical mycology*. 2005;43:191-208.

5. Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;1:1-8.

6. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2004;7:301-9.

7. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS et al. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* Sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian journal of microbiology*. 2011;51:273-8.

8. Karabıçak N, Kurtoğlu E, Sovuksu K ve ark. Hastanede Yatan Bir Grup Hastanın Ağız Florasından İzole Edilen Mayaların Tiplendirilmesi ve 'Slime' Üretimlerinin Gösterilmesi. *Flora*. 2004;1:61-5.

9. Ozkan S, Kaynak F, Kalkancı A ve ark. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:319-23.

10. Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 2002;154:63-9.

11. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45:1843-50.

12. Arslan U, Fındık D. In vitro investigation of virulence factors (proteinase, slime and phospholipase) in clinical isolates of *Candida albicans*. *Turkish Journal of Infection*. 2003;17:471-81.

13. Yakupoğulları Y, Toraman ZA. Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* Kökenlerinde Slime Faktörü Üretiminin Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2004;34:78-181.

14. Kaskatepe B, Yıldız S. Investigation of Association between Slime Production by *Candida* Spp and Susceptibility to Fluconazole and Voriconazole. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:821-5.
15. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32:452-6.
16. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:9-14.
17. Agwan V, Butola R, Madan M. Comparison of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species in a tertiary care center, North India. . *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2015;58:475-8.
18. Rishpana MS, Kabbin JS. Candiduria in Catheter Associated Urinary Tract Infection with Special Reference to Biofilm Production. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015;9:11-3.
19. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 2016;18:310-321.
20. Senet JM. *Candida* adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 1998;1:117-22.
21. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanç A et al. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:319-24. .
22. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA et al. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1998;30:121-9.