

Mantarlarda Biyofilm: Oluş Mekanizmaları ve In-vitro Saptama Yöntemleri

Dr Beyza Ener

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mantar Enfeksiyonu Açısından Riskli Hastalar

- ❑ Kanser hastaları
 - Özellikle hematolojik maligniteler
- ❑ Kemik iliği ve organ nakli yapılan hastalar
- ❑ HIV (+) hastalar
- ❑ Yoğun bakım hastaları
- ❑ Uzun cerrahi müdahale geçiren hastalar
- ❑ Yeni doğanlar

Bu Hastalar Neden Risk Altında ?

- ❑ Uzun süre geniş spektrumda antibiyotik kullanılması
- ❑ Nötropeni
- ❑ Parenteral beslenme
- ❑ Damar içi kateterler
- ❑ İmmun baskılayıcı tedavi
- ❑ Kortikosteroid tedavi
- ❑ Mukoza bariyerlerinin bozulması
 - Cerrahi
 - Travma
 - Kemoterapi
 - Radyoterapi

Tıbbi Cihazlar ve Biyofilm Enfeksiyonları

- Yerleştirilmiş çeşitli tıbbi cihazlar
 - Damar içi kateterler
 - Üriner kateterler
 - Kalp pili
 - Prostetik kalp kapakları
 - Vasküler greftler
 - Santral sinir sistemi şantları
 - Eklem protezleri.....v.s.
- Topikal cihazlar
 - Kontakt lensler
 - Diş protezleri

Biofilm Enfeksiyonuna Yol Açan Mantarlar

- ❑ *Candida* türleri $\Longrightarrow$ *C. albicans*
- ❑ *Cryptococcus neoformans*
- ❑ *Blastoschizomyces* türleri
- ❑ *Malassezia* türleri
- ❑ *Trichosporon* türleri
- ❑ *Pneumocystis* türleri
- ❑ *Saccharomyces* türleri
- ❑ *Aspergillus* türleri $\Longrightarrow$ *A. fumigatus*
- ❑ *Coccidioides immitis*

Tarihi Gelişme

- ❑ Saf kültürlerdeki serbest yaşayan canlılar
- ❑ Planktonik şekil
- ❑ 1980'li yılların başında toplu halde yaşam üzerine yoğunlaşma
- ❑ Doğada %80 mikroorganizma biofilm oluşturmakta
- ❑ Enfeksiyonların %65'i biofilm ile ilişkili
 - Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8:881-90.

Biyofilm

Koruyucu ekstrasellüler bir matriks içinde
birbirlerine bağlı ve/veya yüzey ile ilişkili
mikroorganizmalar topluluğu

Biyofilmin Yararları

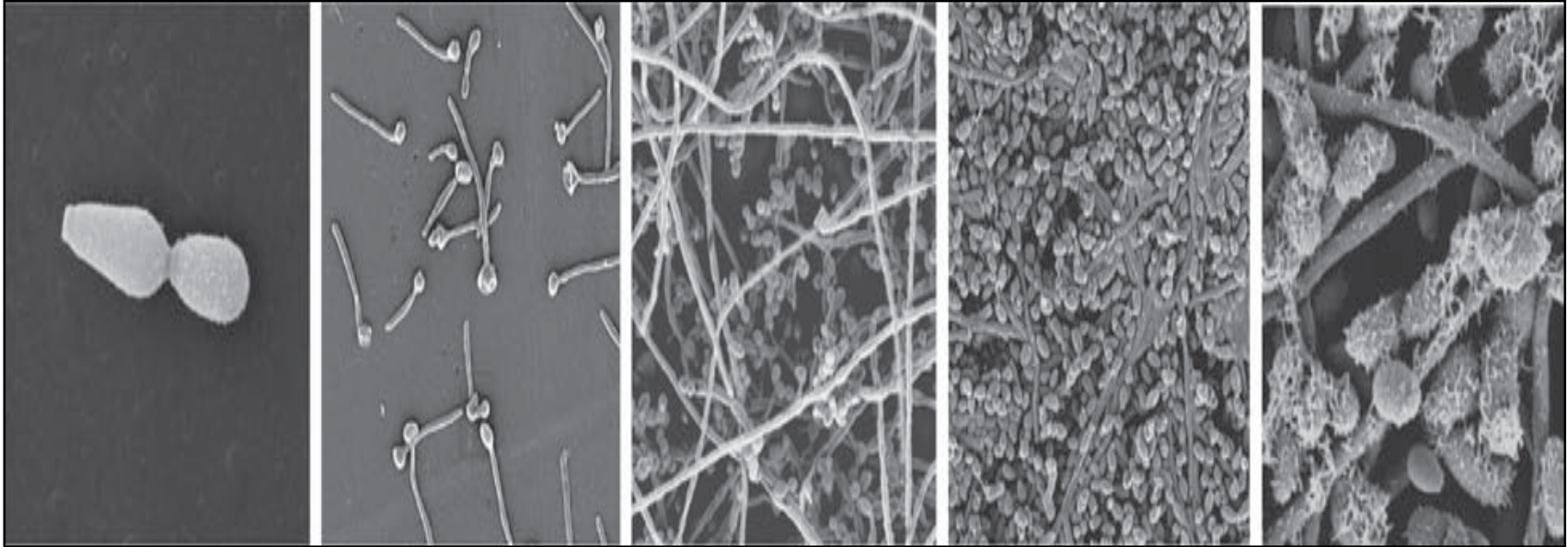
- Çevreden korunma
- Hücrelerin fiziksel veya kimyasal etkilerle yüzeylerden kopmalarına engel olma
- Hücreler arası metabolik ilişki ve gen aktarımını kolaylaştırma
- Konak immun sistemine direnç
- Antimikrobik ajanlara dirençli olma
 - İlaç geçişinin zor olması
 - Kısıtlı besin
 - Üreme hızının azalması
 - Antimikrobikleri parçalayan enzimler

Biyofilm oluřumunun evreleri

Erken faz
0-11 saat

Ara Dönem
12-30 saat

Maturasyon
31-72 saat



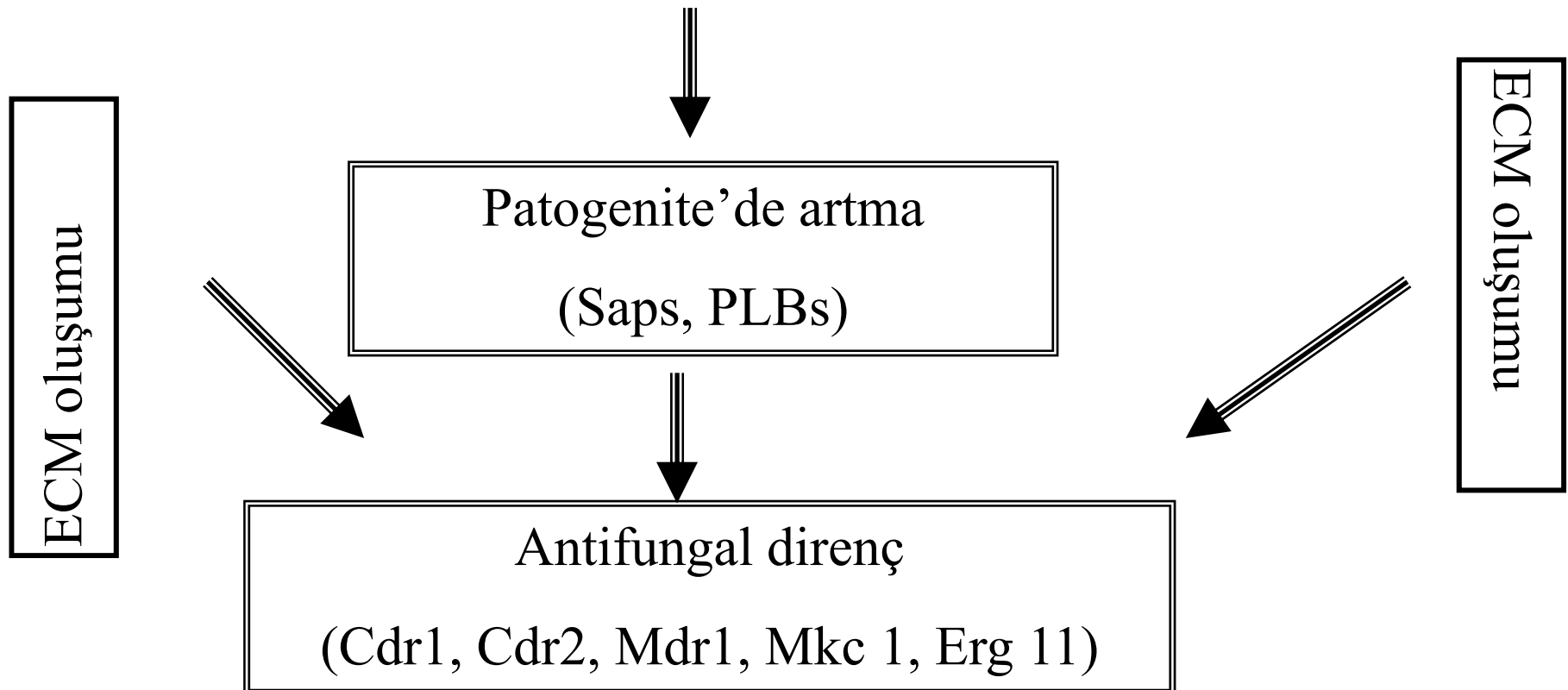
İlk Basamak: Adezyon

- Non-spesifik: Yüzey hidrofobik moleküller
- Spesifik: Reseptör-ligand düzeyi
 - Als 1, Als 3, Ace 2, Bcr 1, Hwp 1, Sun 41, Eap 1, Mnt 1, Mnt 2, Och 1, Pmr 1

- Ener B, Douglas LJ. FEMS Microbiol Letts 1992; 99:37-42
- Hawser SP, Douglas LJ. Infect Immun 1994; 62: 915-921

Gelişme

- Hif yapısına dönüşme: Efg 1, Tec 1, Suv 3, Nup 85, Ume 6, Nrg 1



Biyofilm Modelleri

- In-vitro biyofilm modelleri
 - Kalitatif yöntemler
 - Modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi)
 - Mikroplak yöntemi
 - Kongo kırmızısı içeren agar yöntemi
 - Semi-kantitatif / Kantitatif yöntemler
 - Kuru ağırlığın saptanması
 - Metabolik aktivitenin saptanması
 - Mikroskopik metotlar
 - Floresan mikroskopik yöntemler
 - Konfokal lazer scanning mikroskopik yöntem
 - Elektron mikroskopik yöntemler
- In-vivo biyofilm modelleri

- Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü mayamantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. İnfek Derg. 2003;17:471-81.
- Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia 2007; 164:265–269.
- Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde Slaym (Slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfek Derg. 1999;13: 183-6.
- Kalkancı A, Çırak Yalınay M, Mansuroğlu H, Kuştımur S. *Candida* türlerinde slime faktör belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 1999; 29:183-5.
- Kalkancı A, Kuştımur S. *Candida albicans*'ın konak hücreye adezyonu ve klinik önemi. İnfek Derg. 2004; 18:373-80.
- Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slime aktiviteleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2001;31:224-6.
- Karagöz S, Koç AN, Çetinkaya F. Hastane infeksiyon etkeni olarak düşünülen maya izolatlarının slime ve proteinaz aktiviteleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Serbest Bildiri Özetleri 1999: 39.
- Kiraz N. Koagülaz negatif stafilokokların “Slime” oluşturmaları ve bazı antibiyotiklerin “Slime” oluşumuna etkileri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 1993; 23: 219-25.
- Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Arısoy AS. İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 1998;28:103-6.
- Ozkan S, Kaynak F, Kalkancı A, Abbasoğlu U, Kustımur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100:319–24.
- Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. Detection of slime production among isolates of *Candida albicans*. İnfek Derg. 1996;10: 267-9.
- Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bült. 2004;38: 91-8.

Biyofilm modelleri

- In-vitro biyofilm modelleri
 - Kalitatif yöntemler
 - Modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi)
 - Mikroplak yöntemi
 - Kongo kırmızısı içeren agar yöntemi
 - **Semi-kantitatif / Kantitatif yöntemler**
 - **Kuru ağırlığın saptanması**
 - **Metabolik aktivitenin saptanması**
 - **Radyoaktif**
 - **Tetrazolyum tuzları**
 - Mikroskobik metotlar
 - Floresan mikroskobik yöntemler
 - Konfokal lazer scanning mikroskobik yöntem
 - Elektron mikroskobik yöntemler
- In-vivo biyofilm modelleri

Hawser SP & Douglas LJ. Infect Immun 1994; 62: 915- 921

- *Candida* türleri için ilk model
- *Escherichia coli* ve diğer gram negatif bakterilerde kullanılan model
- 15 *C albicans*; 8 diğer *Candida* türleri kullanılmış

In-vitro biyofilm oluşturulması

Semi-kantitatif / kantitatif yöntemler

- ❑ Suşların üretildiği besiyerleri (37°C'da 24)
 - YNB (Yeast nitrogen base)
 - YPD (Yeast peptone dextrose)
- ❑ İnokulum ayarlanması
 - Spektrofotometrik: 520 nm 0.8 abs
 - Sayma kamerası: 1×10^7 hücre/ml
- ❑ Diskler (0.5-1.5 cm²)
- ❑ Adezyon aşaması (37°C'da 1 saat)
- ❑ Biyofilm aşaması (37°C'da 24-72 saat)

Biyofilm Belirlenmesi

- Kuru ağırlığın hesaplanması
 - Biyolojik diskler üzerinden biyofilm tabakası kazınarak alınır
 - 0.45 μm por çaplı 25 mm'lik filtrelerden süzülür
- Radyoaktif belirleme (radyoaktif lözin=[3H]leucine)
 - Biyofilm oluşumundan sonra her disk üzerine radyoaktif lözin içeren solüsyon konur
 - 37°C'da 4 saat inkübe edilir
 - Biofilm hücreleri tarafından radyoaktif lözinin kullanılması hesaplanır
- Tetrazolium tuzlarının indirgenmesi
 - MTT veya XTT
 - 37°C'da 5 saat inkübe edilir
 - Spektrofotometrik olarak Formazan tuzların ölçümü (540 nm)

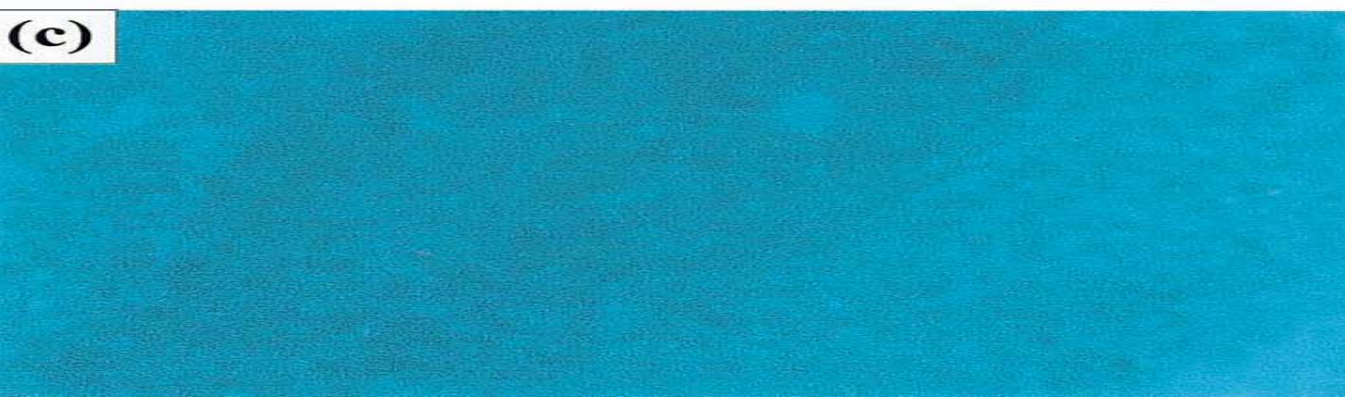
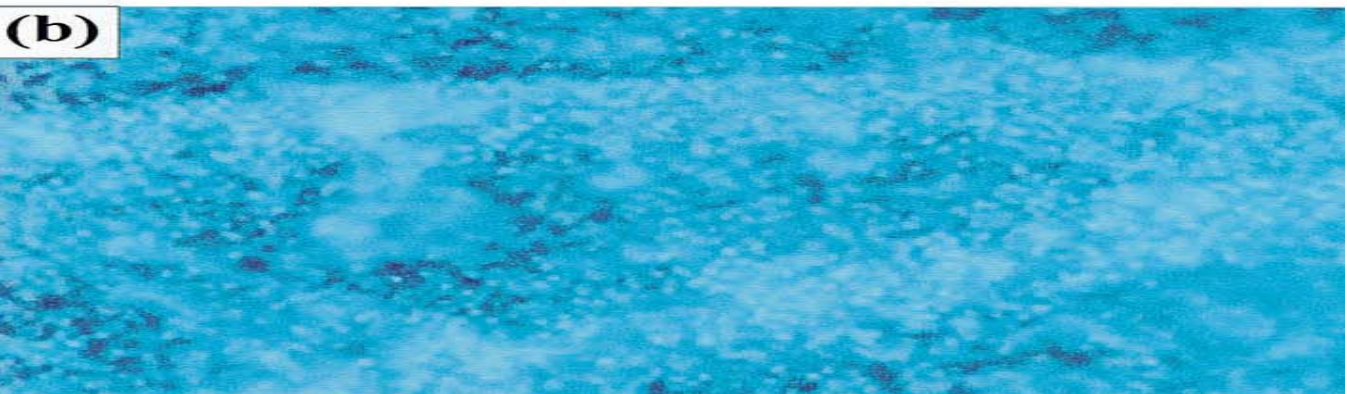
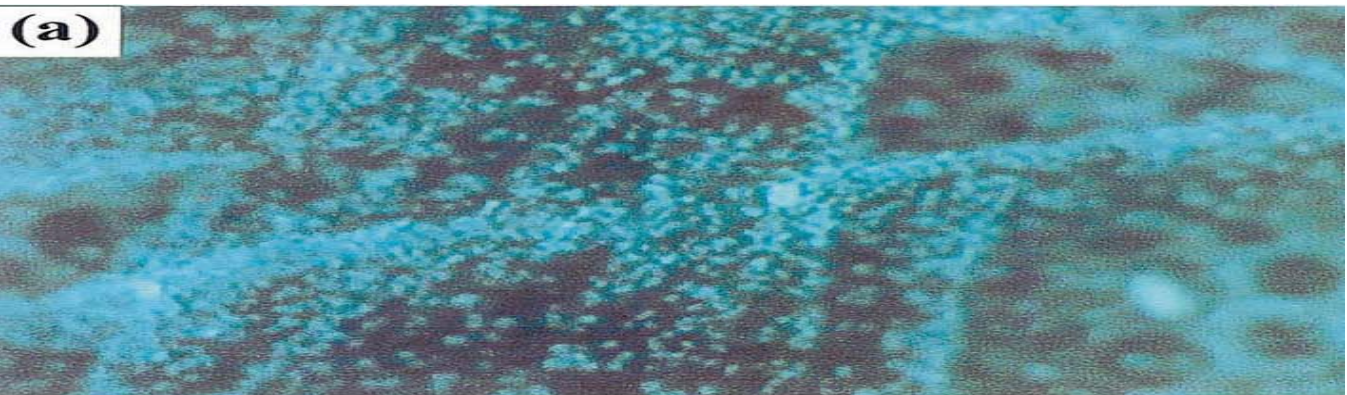
0,94-0,99

Biyofilm Modelleri

- In-vitro biyofilm modelleri
 - Kalitatif yöntemler
 - Modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi)
 - Mikroplak yöntemi
 - Kongo kırmızısı içeren agar yöntemi
 - Semi-kantitatif / Kantitatif yöntemler
 - Kuru ağırlığın saptanması
 - Metabolik aktivitenin saptanması
 - Radyoaktif
 - Tetrazolyum tuzları
 - Mikroskopik metotlar
 - Floresan mikroskopik yöntemler
 - Konfokal lazer scanning mikroskopik yöntem (CLSM)
 - Elektron mikroskopik yöntemler
- In-vivo biyofilm modelleri

Floresan Mikroskopik İnceleme

- Biyofilm oluşumunu takiben disk üzerindeki materyal lama aktarılır
- Kalkoflor beyazı ile boyanır (Kitin ve β -glukan boyanır)
- Oluşan biyofilm floresans mikroskop ile incelenir

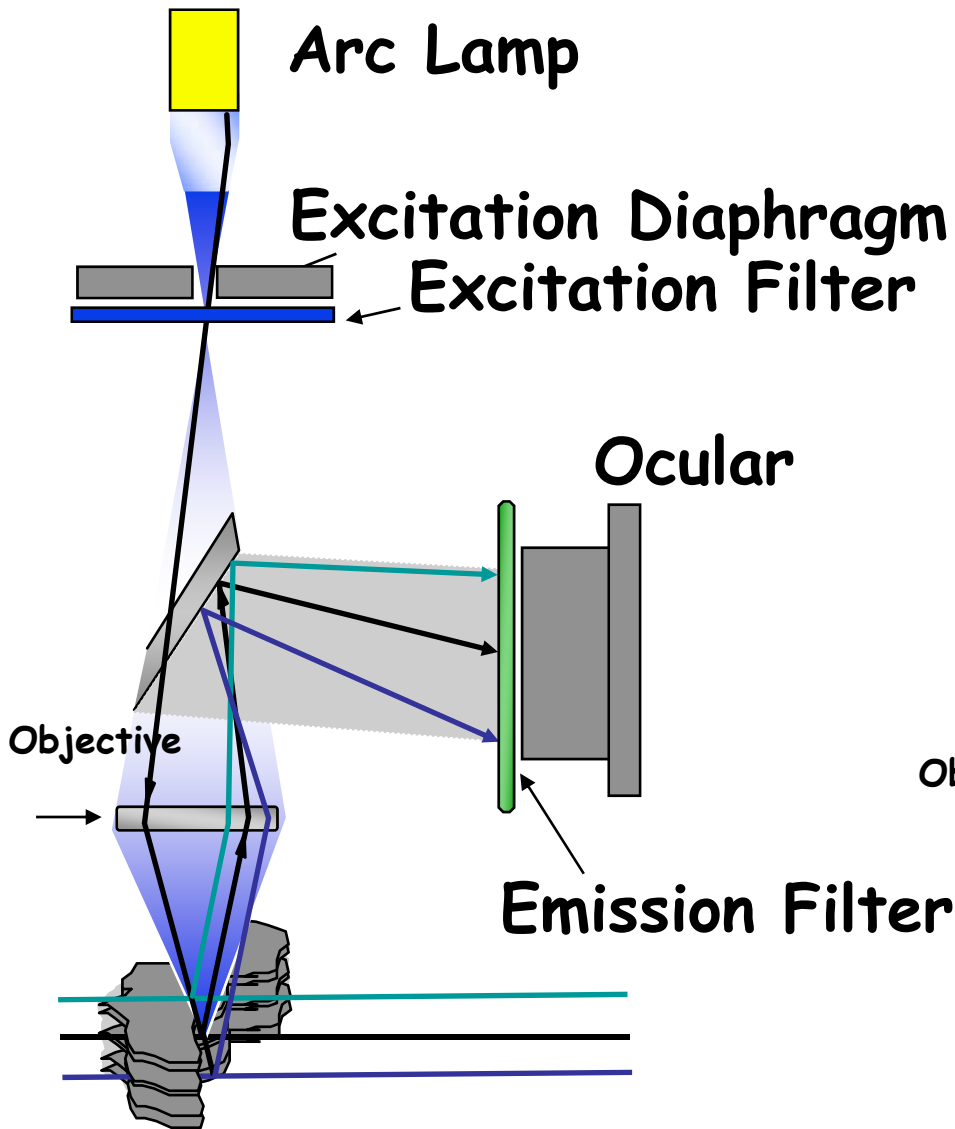


Konfokal Lazer Scanning Mikroskopik İnceleme

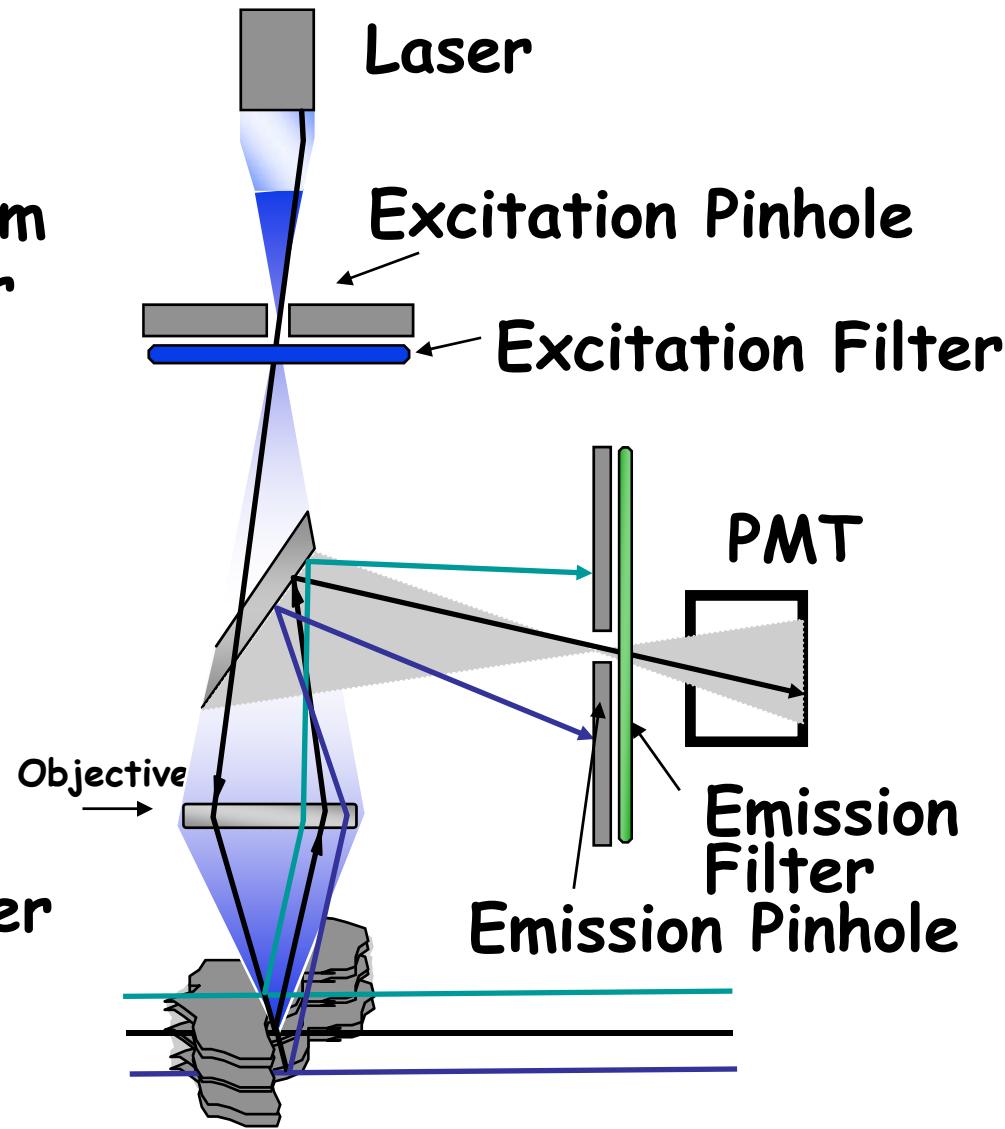
Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

- Biyofilm oluşmuş diskler hücre kültür kuyucuklarına konur
- Floresan boyalarla boyanır (37°C'da 45 dak)
 - FUN-1
 - Metabolik olarak aktif olan hücrelerde hücre içini turcu kırmızı olarak gösteriyor (canlı hücreler)
 - ConA
 - Hücre duvarında bulunan glikoz ve mannoza bağlanarak yeşil renk oluşturuyor (canlı-ölü hücreler)
- Boyama aşamasından sonra diskler petri kutularına konur
- Argon veya He-Ne lazer kullanan scanning lazer mikroskop ile inceleniyor
- Biyofilmin yapısını anlaya bilmek için üç boyutlu ölçümler yapılabiliyor
 - Horizontal boyut (xy)
 - Derinlik 0,44-0.9 μm

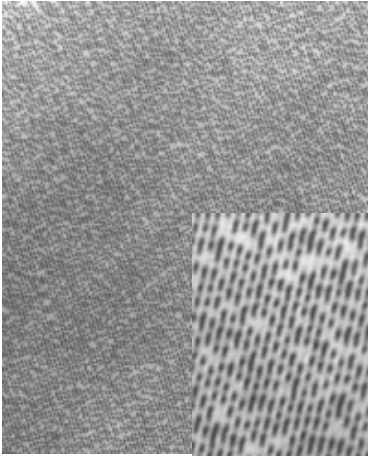
Fluorescent Microscope



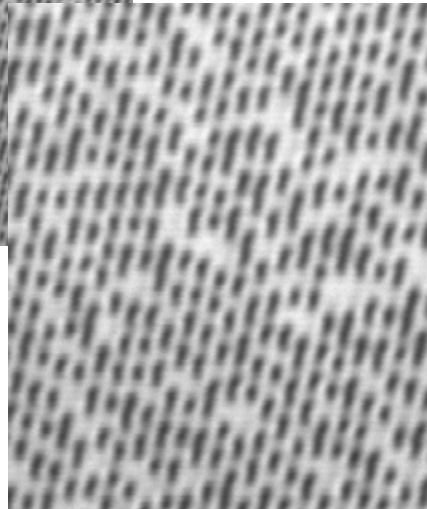
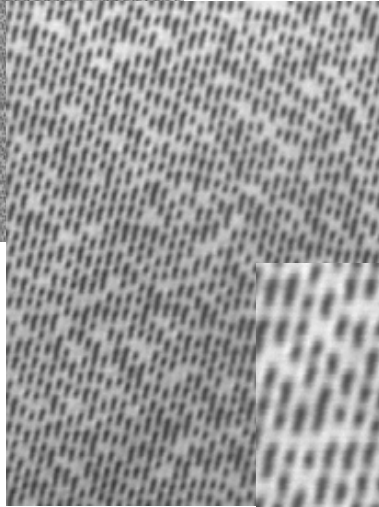
Confocal Microscope



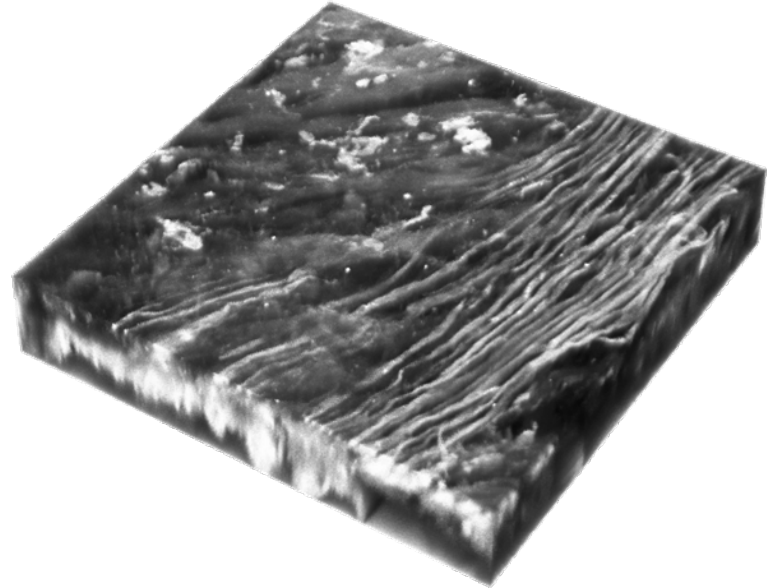
Yansıtılmış Işık Görüntüleri

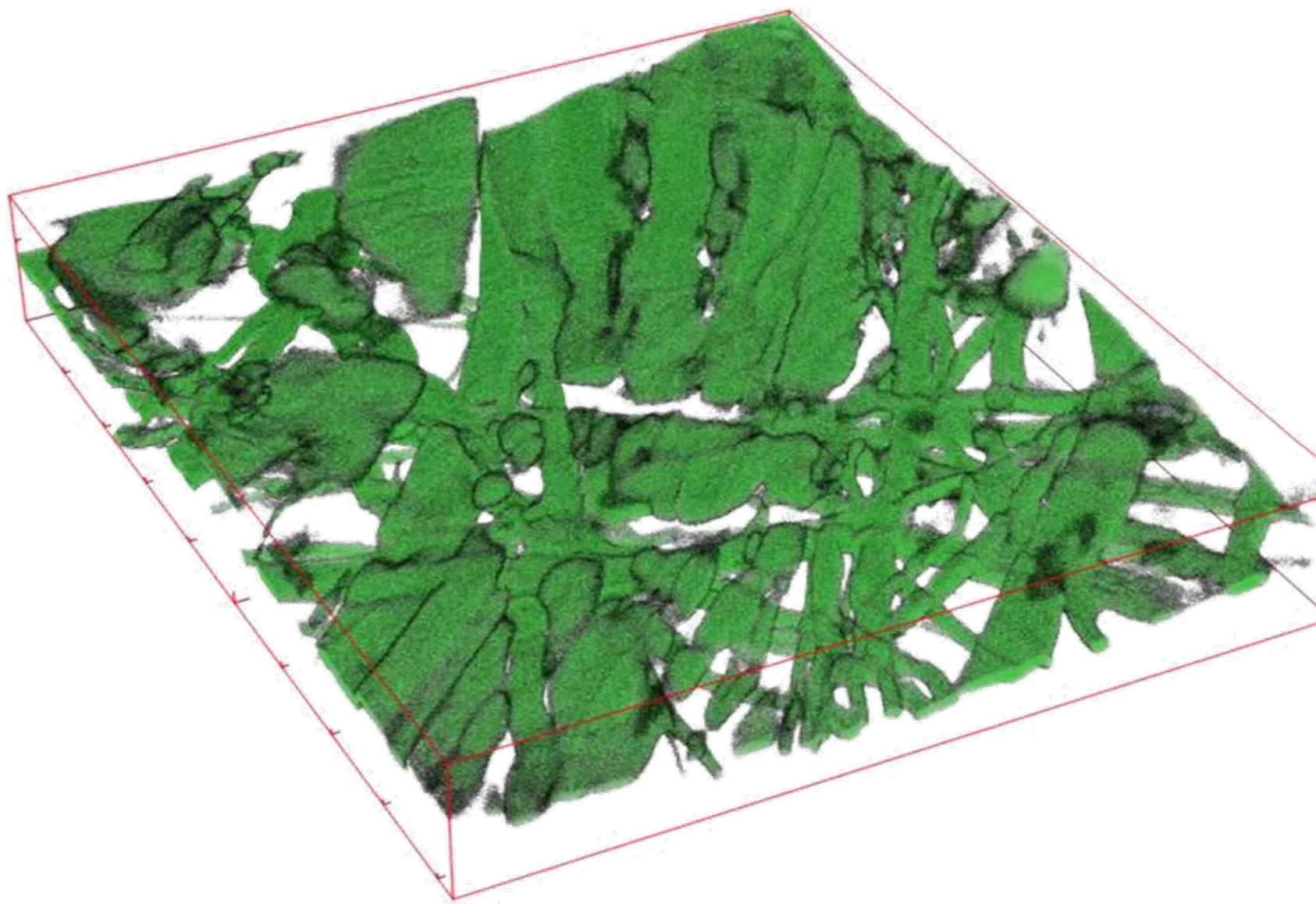


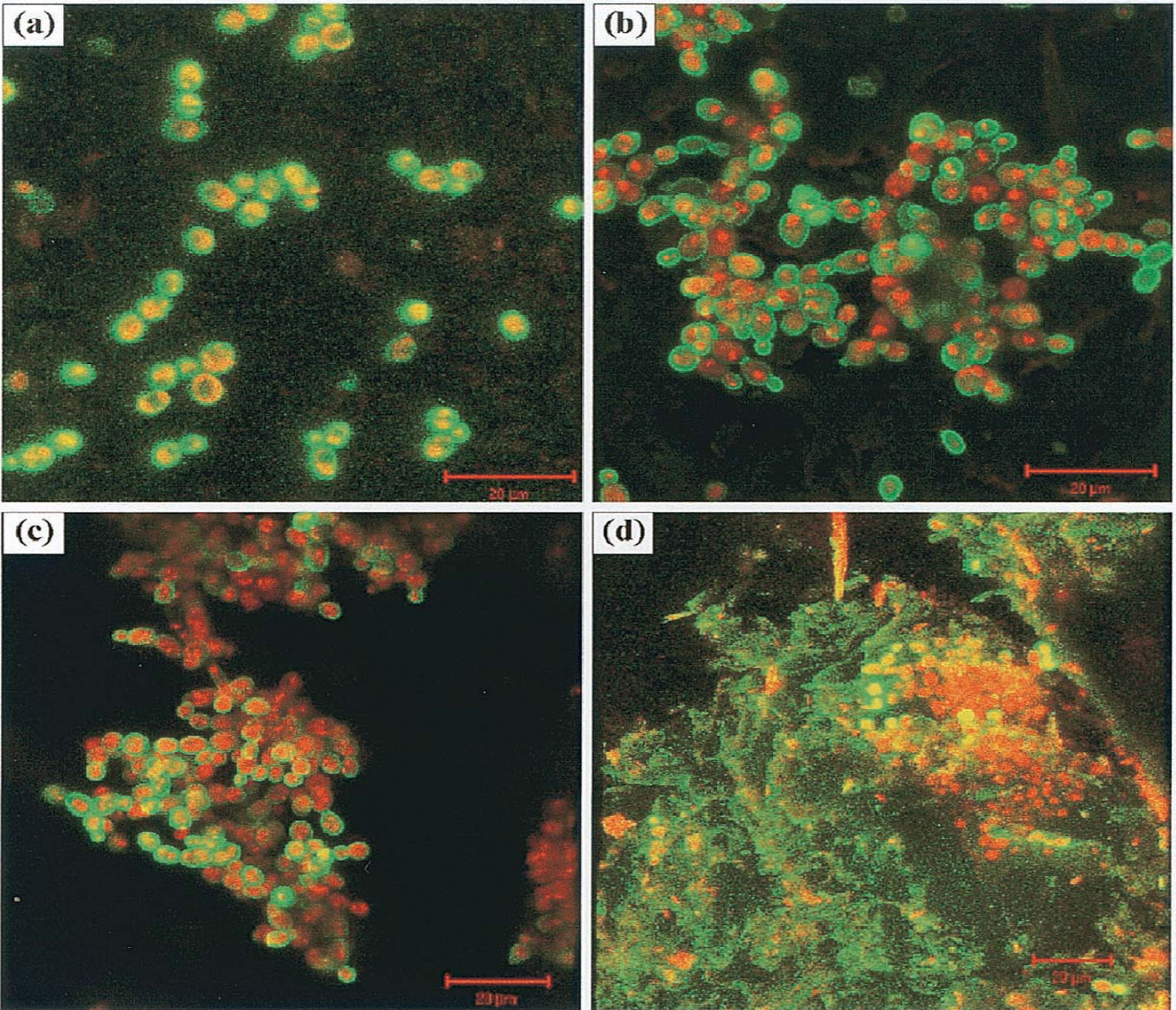
CD-ROM on a
1024 Bio-Rad
Konfokal

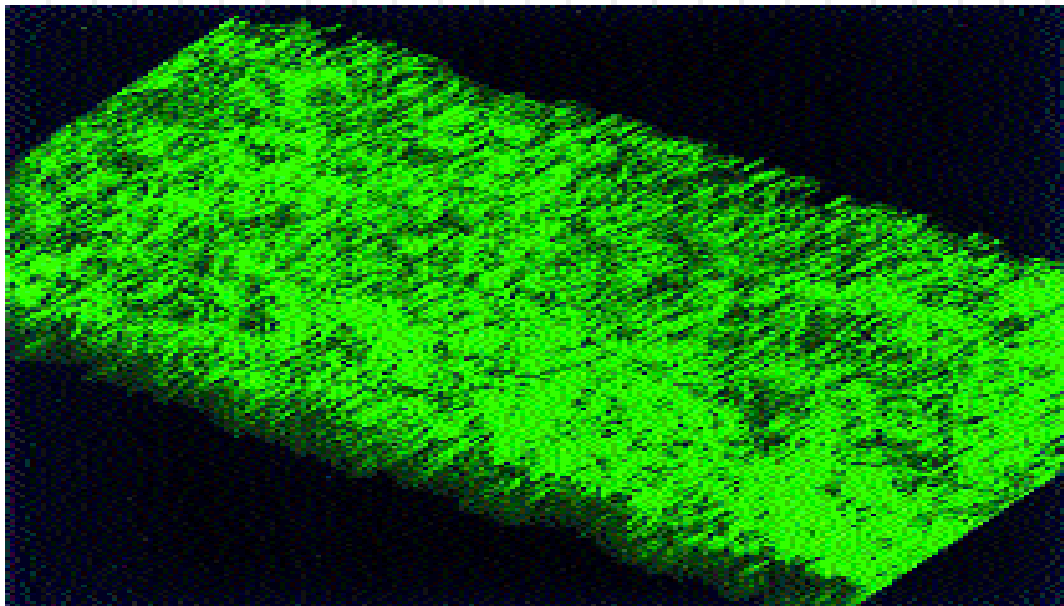
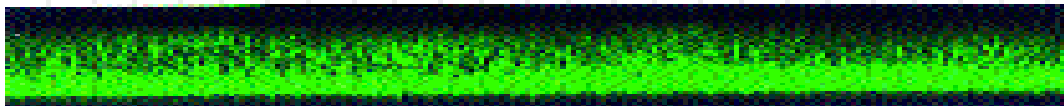
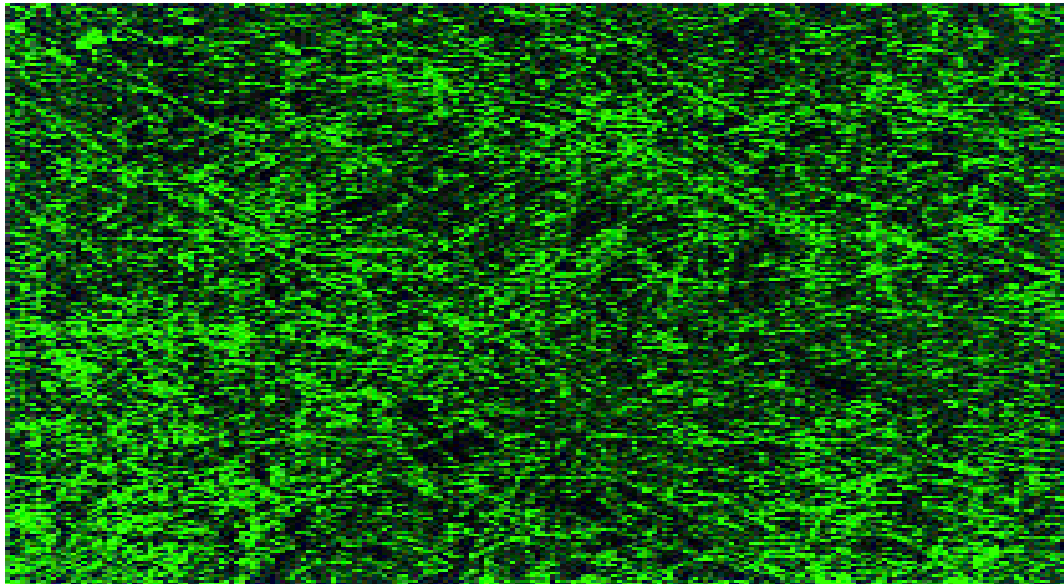


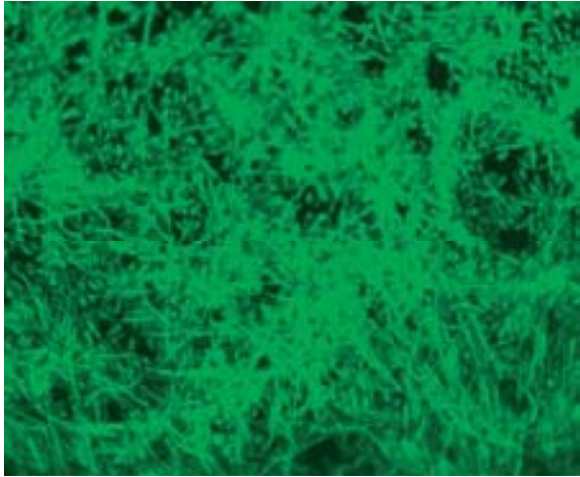
Collagen 1024 Konfokal



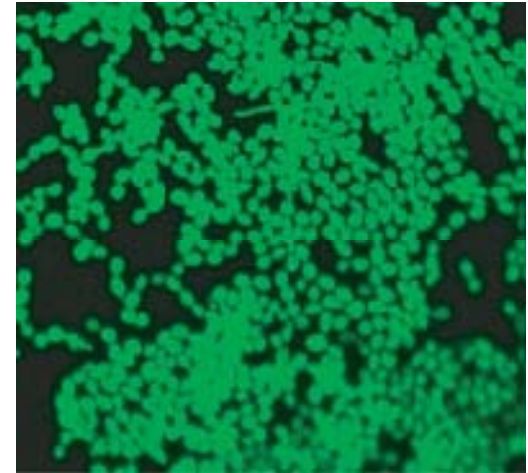








C tropicalis



C glabrata



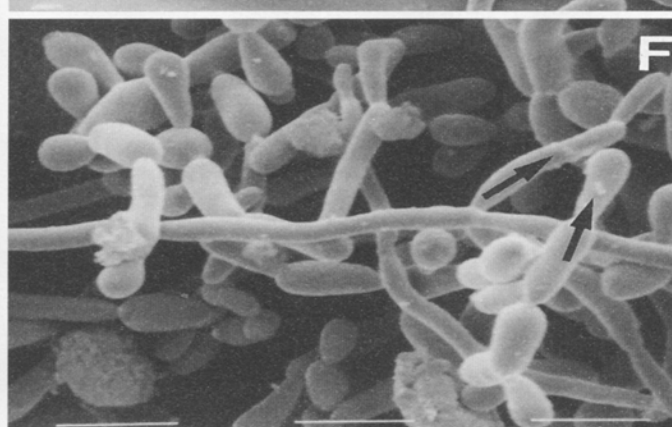
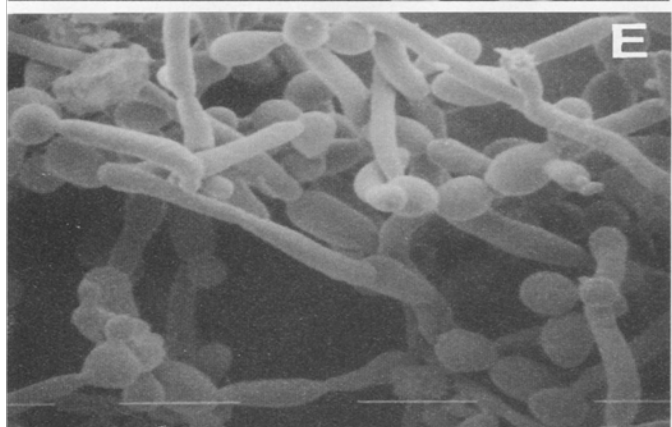
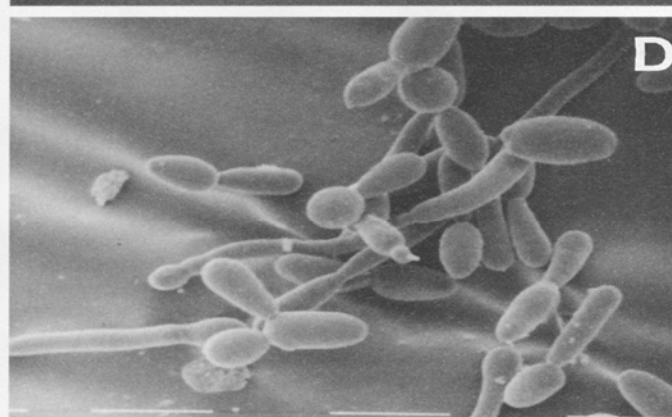
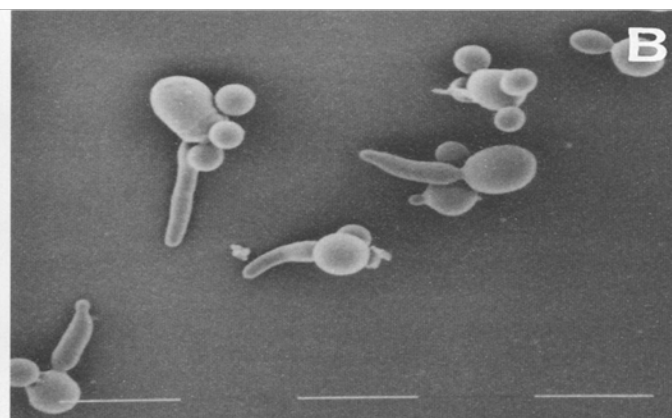
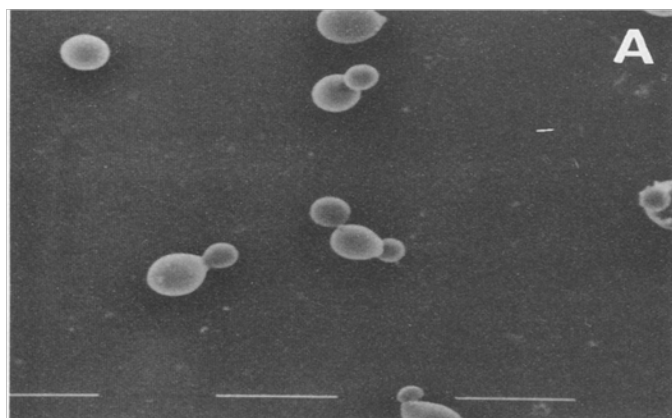
C parapsilosis



C krusei

SEM

- ❑ Gluteraldehit fiksasyonu
- ❑ Osmium tetroksit ve/veya diğer kimyasallar ile muamele
- ❑ Etanol ile birkaç basamaklı dehidratasyon
- ❑ Altın ile kaplama
 - Fiksasyon ve dehidratasyon aşamaları biyofilm yapısını bozmakta



In-vitro Biyofilm Modelleri

- Suş, tür farklılıkları
 - Enfeksiyon etkeni suşlar / Kolonize olan suşlar
 - *Candida albicans* / diğer *Candida* türleri
 - *Aspergillus fumigatus* / diğer *Aspergillus* türleri
- İnokulum miktarı
 - 1×10^7 hücre/ml
- Besiyerleri
 - YNB (50mM/500mM; glikoz/galaktoz)
 - RPMI 1640 (hif oluşumunu indüklemek için)
- İnkübasyon zamanları
 - 24-72 saat
- İnkübasyon koşulları
 - Statik
 - Hareketli
- Kullanılan disklerin yapısı
- Kullanılan disklerin ön muamelesi
 - Tükrük, serum, fibrin, fibronektin v.s.

In-vitro Biofilm Modelleri

□ Materyal

■ Polyvinl chloride (PVC)

■ Polyurethane

■ Silicone elastomer

■ Silicone

■ Latex

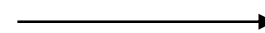
■ Polymethylmethacrylate



Damar içi kateterler

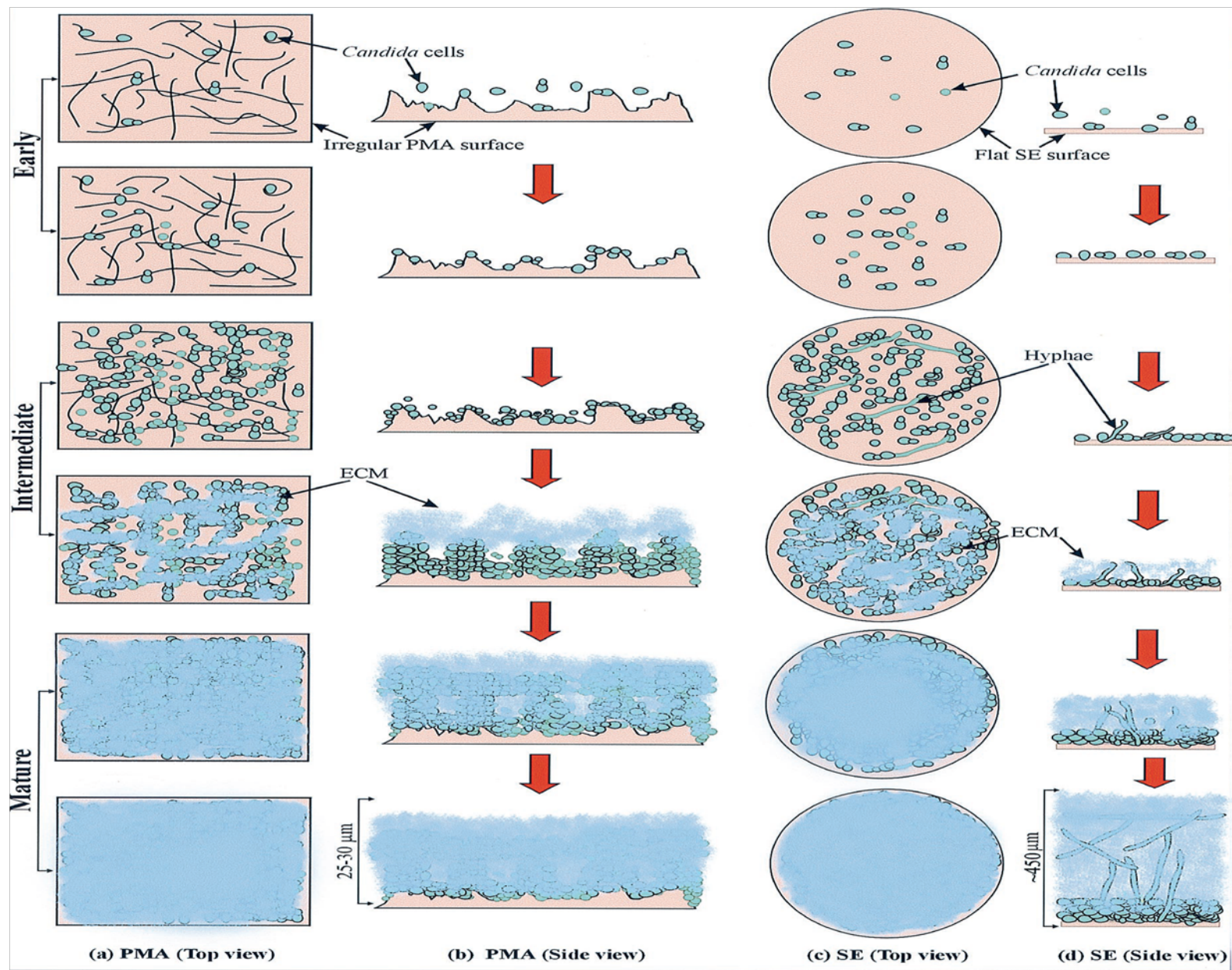


İdrar sondaları



Diş protezleri

96 kuyulu mikroplaklar



In-vivo Biyofilm Modelleri

- ❑ In-vitro sistemler tamamen in-vivo ortamı yansıtamaz
 - Konak-patojen ilişkisi
- ❑ Konak proteinlerinin hepsini birden ortama eklemek mümkün değil
- ❑ Oluşturulan hareket in-vivo hareket ile eş değer değil
- ❑ Konak hücreleri in-vitro modellerde yok
- ❑ Besin maddeleri in-vitro modellerde azalmakta

In-vivo Biyofilm Modelleri

- Deney hayvanlarında tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonlar oluşturulmuş
 - Tavşanda ve sıçanda kateter enfeksiyonları
 - Diş protez enfeksiyonları
- In-vitro sistemlerden farklı olarak biyofilmlerde konak hücreleri de görülmüş

Sonuç

- ❑ Mantarlarda biyofilm ile ilgili çalışmaların artması
- ❑ Özellikle in-vivo sistemlerin yaygınlaşması
- ❑ Biyofilm ile ilişkili genlerin ve gen ürünlerinin analizi (proteomiks çalışmaları)
- ❑ Biyofilm oluşumunu engelleyici moleküllerin bulunması