

Vajinal Yakınması Olan Kadınların Vajen ve Rahim İçi Araç İpi Örneklerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin İn Vitro Biyofilm Oluşturma Özellikleri ve Antifungal Direnç ile İlişkisi

In Vitro Biofilm Formation and Relationship with Antifungal Resistance of *Candida* spp. Isolated from Vaginal and Intrauterine Device String Samples of Women with Vaginal Complaints

Şeyda ÇALIŞKAN¹, Sema KEÇELİ ÖZCAN¹, Selvi ÇINAR², Aydın ÇORAKÇI³, Eray ÇALIŞKAN³

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

² Kocaeli Merkez Ana Çocuk Sağlığı Kliniği, Kocaeli.

² Kocaeli Mother-Child Health Center Clinic, Kocaeli, Turkey.

³ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Kocaeli.

³ Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Gynecology, Kocaeli, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 27.12.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.07.2011

ÖZET

Aile planlamasında yaygın olarak kullanılan rahim içi araçlar (RIA), etkin, güvenli ve ekonomik olmalarına karşın, vajinal ekosistemi değiştirerek mikrofloranın bozulmasına ve fırsatçı patojen birçok mikroorganizmanın kolonizasyonunda artışa neden olabilmektedir. Bu çalışmada, RIA kullanan kadınlarda vajen ve RIA ipi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin in vitro biyofilm oluşturma özellikleri ve bu biyofilmlerin antifungal direnç ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, vajinal semptomları (akıntı ve kaşıntı) olan ve bakırlı RIA kullanan (CuT380a tipi RIA; ortalama kullanım süresi: 59.8 ± 42.4 ay) 250 kadın olgu (yaş ortalaması: 34.4 ± 7.6 yıl) dahil edilmiştir. RIA çıkarılmaksızın iplerinden kesilerek alınan örnekler ile vajinal sürüntü örneklerinin kültürleri yapılmış; izole edilen *Candida* türleri, konvansiyonel yöntemler ve API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) sistemiyle tanımlanmıştır. İzolatların flukonazol, itraconazol ve amfoterisin B'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI önerilerine göre belirlenmiştir. Biyofilm oluşumunun saptanmasında XTT-indirgeme ve kristal viyole boyama yöntemleri kullanılmış; her iki yöntemle de biyo-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Sema Keçeli Özcan, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 41380 Umuttepe, Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 303 7541, **E-posta (E-mail):** keceliozcan@yahoo.com

film oluşumunun saptandığı *Candida* suşları pozitif kabul edilmiştir. Çalışmamızda olguların %33.2 (83/250)'sinin vajen, %34 (85/250)'ünün ise RİA ipi örneğinden *Candida* spp. izole edilmiş; en sık rastlanılan tür *C.albicans* (örnekler için sırasıyla, 54 ve 66 suş) olmuştur. İn vitro biyofilm oluşturma oranları tüm vajen izolatları için %25 (21/83), tüm RİA ipi izolatları için ise %44.7 (38/85) olarak saptanmıştır. Vajinal *C.albicans* izolatlarının, vajinal albicans-dışı *Candida* izolatlarından daha düşük oranda biyofilm oluşturma özelliği taşıdığı görülmüştür (sırasıyla, %14.8 ve %44.8; $p = 0.003$). Vajen ve RİA ipi örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarının biyofilm oluşturma oranları sırasıyla %14.8 (8/54) ve %45.5 (30/66) olarak belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Albicans-dışı türlerin biyofilm oluşturma oranları ise örnek tipine göre farklılık göstermemiştir [sırasıyla, %44.8 (13/29) ve %42.1 (8/19); $p > 0.05$]. Biyofilm oluşturan vajinal *Candida* spp. izolatlarının flukonazole direnç oranı (%52.4), oluşturmayanlardan (%16.1) önemli düzeyde yüksek bulunmuş ($p = 0.001$); itraconazol direnci ise biyofilm oluşturan (%47.6) ve oluşturmayan (%32.3) izolatlar için benzer olarak saptanmıştır ($p > 0.05$). RİA ipi örneklerinden izole edilen *Candida* spp. suşları değerlendirildiğinde, hem flukonazol hem de itraconazol direnci, biyofilm oluşturan grupta (sırasıyla, %39.5 ve %52.6), biyofilm oluşturmayan gruba (sırasıyla, %10.6 ve %29.8) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla, $p = 0.002$ ve $p = 0.03$). Çalışmamızda, biyofilm oluşumundan bağımsız olarak *C.albicans* ve albicans-dışı *Candida* türlerinde flukonazole direnç oranları sırasıyla %15 ve %54.2, itraconazole direnç oranları ise sırasıyla %24.2 ve %68.7 olarak saptanmıştır. Örneklerden izole edilen tüm *Candida* spp. suşlarının amfoterisin B için MİK değeri ≤ 1.5 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak ve-rilerimiz, *Candida* spp. suşlarının RİA ipinde biyofilm oluşturmak suretiyle vajinal enfeksiyonlara yol açabileceğini ve antifungal ajanlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür; RİA kullanan kadınların bu yönden izlenmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida* türleri; rahim içi araç; biyofilm; antifungal direnç.

ABSTRACT

Intrauterin device (IUD) application is a widely used effective, safe and economic method for family planning. However IUD use may cause certain changes in vaginal ecosystem and may disturb microflora leading to increased colonization of various opportunistic pathogen microorganisms. The aims of this study were (i) to detect the biofilm production characteristics of *Candida* spp. isolated from vaginal and IUD string samples of women with IUDs, and (ii) to investigate the relationship between biofilm production and antifungal resistance. A total of 250 women (mean age: 34.4 ± 7.6 years) admitted to gynecology outpatient clinics with vaginal symptoms (discharge and itching) were included in the study. The patients have been implanted CuT380a type IUDs for a mean duration of 59.8 ± 42.4 months. Without removing IUD, string samples were obtained by cutting and simultaneous vaginal swab samples were also collected. Isolated *Candida* spp. were identified by conventional methods and API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) system. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of fluconazole, itraconazole and amphotericin B were determined by broth microdilution method according to the CLSI guidelines. Biofilm formation was evaluated by crystal violet staining and XTT-reduction assays, and the isolates which yielded positive results in both of the methods were accepted as biofilm-producers. In the study, *Candida* spp. were isolated from 33.2% (83/250) of the vaginal and 34% (85/250) of the IUD string samples, *C.albicans* being the most frequently detected species (54 and 66 strains for the samples, respectively). The total in vitro biofilm formation rate was 25% (21/83) for vaginal isolates and 44.7% (38/85) for IUD string isolates. Biofilm formation rate of vaginal *C.albicans* isolates was significantly lower than vaginal non-albicans *Candida* spp. (14.8% and 44.8%, respectively; $p = 0.003$). Biofilm formation rate of *C.albicans* strains isolated from vaginal and IUD string samples were found as 14.8% (8/54) and 45.5% (30/66), with a statistically significant importance ($p < 0.001$). However, no statistically significant difference was detected for biofilm formation rates of non-albicans *Candida* spp. when sample types were considered [44.8% (13/29) and 42.1% (8/19), respectively; $p > 0.05$]. Fluconazole resistance was significantly higher in biofilm-producing vaginal *Candida* spp. than those of non-

producers (52.4% vs. 16.1%; $p = 0.001$), however, itraconazole resistance was found similar in biofilm-producer and non-producer isolates (47.6% vs. 32.3%; $p > 0.05$). Resistance rates for both fluconazole and itraconazole were higher in biofilm-producers (39.5% and 52.6%, respectively), than those of non-producers (10.6% and 29.8%, respectively), representing a statistical significance ($p = 0.002$ and $p = 0.03$, respectively) for *Candida* spp. strains isolated from IUD string samples. The overall resistance rates of *C. albicans* and non-albicans *Candida* spp. against fluconazole, were determined as 15% and 54.2%, respectively, while those rates were 24.2% and 68.7%, respectively, against itraconazole. MIC value of amphotericin B for all of the *Candida* spp. isolates was $\leq 1.5 \mu\text{g/ml}$. In conclusion, the data obtained from this study revealed that *Candida* spp. may lead to vaginal infections by inducing biofilm formation in IUD strings and these biofilms may be related to resistance to antifungal agents. Thus, women using IUDs should be followed-up periodically for the development of biofilms in their IUD strings.

Key words: *Candida* spp. intrauterine device; biofilm; antifungal resistance.

GİRİŞ

Vulvovajinal kandidoz genital sistem ile ilgili şikayetlerin en önemlilerinden biridir. Kadınların %75'i hayatı boyunca en az bir kez vulvovajinal kandidoz geçirmektedir¹. *Candida* türleri vajinal mikrofloranın bir elemanı olmakla birlikte, uygun ortamda blastosporların miktarında artış görülmekte ve hif formları baskınlaşarak patojenite göstermektedir. *Candida* türlerinin virülansı, konak hücreye tutunmalarına ve filamentöz formlarının artışına bağlı olup, bu durum yabancı cisim varlığında kolaylaşmaktadır. Tıbbi gereç kaynaklı fungal enfeksiyonlarda en sık izole edilen etken, *Candida albicans*'tır². Çeşitli kateterler (damar içi, periton diyalizi, idrar yolu vb.), protezler (eklem, kalp kapağı, diş vb.) ve implantlarda *Candida* biyofilmlerinin varlığı gösterilmiştir³. *Candida* türlerinin tıbbi gereçler dışında, kornea ve periodontal yüzey gibi konak dokularında da biyofilm oluşturabildiği veya konağın immün yanıtına karşı bakterilerle birlikte oluşturduğu biyofilmlerde direnç geliştirebildiği bilinmektedir⁴.

Rahim içi araçlar (RIA) etkin, güvenli ve ekonomik bir aile planlaması seçeneğidir. Bakırlı T380 tip RIA ise Türk kadınlarının %23'ünün kullandığı modern bir aile planlaması yöntemidir⁵. Ancak bazı çalışmalarda RIA kullanımının vajinal ekosistemi değiştirdiği; laktobasillerde azalmaya, *Actinomyces*, *Gardnerella*, stafilokoklar, grup B streptokoklar, enterokoklar ve *Candida* türlerinin kolonizasyonunda ise artışa yol açtığı belirtilmektedir^{1,6-8}. Literatürde RIA ipinden izole edilen *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma özellikleri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, RIA kullanan kadınlarda vajen ve RIA ipi örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin in vitro biyofilm oluşturma potansiyelleri ve bu biyofilmlerin antifungal direnç ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar

Çalışmaya, Şubat 2006-Aralık 2006 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği ile Kocaeli Ana Çocuk Sağlığı Kliniğine başvuran, vajinal akıntı ve kaşıntı semptomları olan 250 RIA'lı kadın çalışmaya alındı. Çalışma

üniversitemiz etik kurulu tarafından onaylanarak çalışmaya katılan tüm kadınlardan yazılı onam formu alındı.

Vajen ve RİA İpinden *Candida* İzolasyonu

Vajinal spekulum vajen girişine uygulandıktan sonra açılarak serviks ve RİA ipi görülmünceye kadar ilerletildi. Polipropilen RİA iplerinden bir tanesinden steril makas yardımı ile vajen duvarlarına dokunmadan 1 cm'lik örnek kesildi. Aynı hastalardan vajen yan duvarlarından, kültür, Gram boyama ve taze yayma için eküvyon ile de örnek alındı.

Her bir RİA ipi, 2 ml Sabouraud dekstrozu sıvı besiyerine yerleştirilerek 30 saniye vorteksle karıştırıldı. RİA ipli karışım ve vajinal sürüntüler ayrı ayrı Sabouraud dekstrozu agar (SDA)'a (Oxoid) ekilerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İzole edilen *Candida* türleri, germ tüp testi, mısır unlu-Tween 80 agardaki morfolojik özellikler ve API 20C AUX sistemi (BioMerieux, Fransa) kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı.

Antifungal Duyarlılık Testleri

İzolatların antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığı, flukonazol (Pfizer Inc., ABD), itrakonazol (Janssen-Cilag, Belçika) ve amfoterisin B (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI önerilerine göre araştırıldı⁹. Yöntemde kısaca, ardışık seyreltilerle hazırlanan (0.125-128 µg/ml flukonazol; 0.06-64 µg/ml itrakonazol; 0.06-64 µg/ml amfoterisin B) antifungal ilaç içeren (100 µl) kuyucuklara *Candida* spp. inokulumu (100 µl) eklendi ve mikrop plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Sonuçlar spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Flukonazol ve itrakonazol için CLSI tarafından önerilen direnç sınır değerleri kullanıldı⁹. Amfoterisin B için henüz direnç sınır değerleri kesinlik kazanmadığı için elde edilen MİK değerlerinin dağılımı verildi.

Her çalışmada kontrol olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.krusei* ATCC 6258 standart suşları kullanıldı.

İn Vitro Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Bu amaçla Ramage ve arkadaşlarının¹⁰ kullandığı yöntem uygulandı. İzole edilen *Candida* türleri maya-pepton dekstrozu besiyerinde (%1 maya, %2 pepton, %2 dekstrozu) çoğaltıldı. SDA'da üremiş olan *Candida* kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 20 ml sıvı besiyeri içeren flakslarda, bir gece, 30°C'de orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Bu ortamda tüm türler tomurcuklanan maya formunda gelişti. Hücreler toplanarak steril fosfat ile tamponlanmış izotonik çözelti [PBS: 10 mM fosfat tamponu, 2.7 mM potasyum klorit, 137 mM sodyum klorit (pH 7.4)] ile yıkandı. Hücrelerden, L-glutaminli ve 0.165 mM MOPS (morfolinepropanosulfonik asit) (Sigma) ile tamponlanmış RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak 1.0×10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Standardize edilmiş hücre süspansiyonları (10^6 hücre/ml'den 100 µl) mikrodilüsyon plaklarına pipetlenerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Besiyeri aspire edilerek steril PBS ile üç kez yıkandı ve serbest hücreler ortamdan uzaklaştırıldı.

Biyofilm oluşumunun yarı kantitatif ölçümü, XTT [2,3- bis (2-metoksi-4-nitro-S-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid] indirgemesi ile değerlendirildi¹¹. Kısaca, XTT (Sigma-Aldrich, ABD) Ringer laktat solüsyonu içinde 0.5 g/L doymuş çözelti olarak hazırlan-

dı. Çözelti 0.22 µm çaplı filtre ile sterilize edildi ve son konsantrasyon 1 µm oluncaya kadar 10 mM aseton içinde hazırlanmış menadion (Sigma-Aldrich, ABD) eklendi. Bu süspansiyondan 100'er µl, PBS ile üç kez yıkanan kuyucuklara ilave edilerek beş saat 37°C'de karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra mikrodilüsyon plağı 490 nm'de okutularak OD (optik dansitometre) değerleri belirlendi.

Biyofilm oluşumunun saptanmasında ayrıca kristal viyole (KV) analizi de uygulandı. PBS ile üç kez yıkanan kuyucuklar metanol ile fikse edildikten sonra, her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde %2'lik KV ilave edildi. Mikroplağın 20 dakika 37°C'de inkübasyonu sonrasında, kuyucuklar steril PBS ile yıkandı ve sonuçlar 490 nm dalga boyunda okutuldu.

Candida türlerinin biyofilm oluşumu, hem XTT hem de KV metodu ile biyofilm saptanılarda pozitif kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 13.5 (IBM, ABD) kullanılarak yapıldı. Çalışma için örneklem büyüklüğü; vajinal semptomu olan Türk kadınlarında *Candida* enfeksiyonu oranı %17¹² ve alfa hata değeri 0.05 kabul edilerek hesaplandı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı ve p< 0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 250 kadın hastanın yaş ortalaması 34.4 ± 7.6 yıl olup, ortalama RİA kullanım süresinin 59.8 ± 42.4 (1-180) ay olduğu belirlenmiştir. Hastalarda en sık görülen şikayet (n= 133, %53) vajinal akıntı olması; 6 (%2.4) hastanın ise cinsel olarak aktif olmadığı izlenmiştir.

Hastaların 83 (%33.2)'ünün vajen, 85 (%34)'inin ise RİA ipi örneğinden *Candida* spp. izole edilmiştir. Her iki örneğinden de aynı *Candida* türü izole edilen 53 kadının 45'inde *C.albicans*, 8'inde *C.glabrata* üremiştir. Diğer olgularda ise RİA ipi ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türleri farklı bulunmuştur (Tablo I).

Çalışmada, RİA ipi ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin sırasıyla %44.7 (38/85) ve %25 (21/83)'inin in vitro biyofilm oluşturduğu saptanmış; en çok biyofilm oluşturan tür ise bu örnekler için sırasıyla *C.albicans* (30/38) ve *C.glabrata* (10/21) olmuştur (Tablo II).

Vajen izolatları arasında albicans-dışı *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma oranı *C.albicans*'a göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuş (p= 0.01), RİA ipi izolatları arasında ise önemli bir fark (p= 0.07) saptanmamıştır (Tablo II). *C.albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri örnek tipine göre değerlendirildiğinde; RİA ipi ve vajen örnekleri için sırasıyla %45.5 ve %14.8 olarak belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0.001). Diğer türler için biyofilm oluşturma oranları örnek tipine göre farklılık göstermemiştir (p> 0.05) (Tablo II).

Tüm izolatlarda amfoterisin B için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri ≤ 1.5 µg/ml olarak saptanmıştır. İzolatların flukonazol ve itrakonazol dirençlerinin bi-

Tablo I. Hastaların Vajen ve RİA İpi Örneklerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı

RİA İpi örneği	Vajen örneği				Toplam
	Üreme yok n (%)	<i>C.albicans</i> n (%)	<i>C.glabrata</i> n (%)	<i>C.tropicalis</i> n (%)	
Üreme yok	150 (60)	9 (3.6)	4 (1.6)	2 (0.8)	165 (66)
<i>C.albicans</i>	13 (5.2)	45 (18)	3 (1.2)	5 (2)	66 (26.4)
<i>C.glabrata</i>	3 (1.2)		8 (3.2)		11 (4.4)
<i>C.tropicalis</i>			3 (1.2)		3 (1.2)
<i>C.famata</i>			2 (0.8)		2 (0.8)
<i>C.guilliermondii</i>			2 (0.8)		2 (0.8)
<i>C.kefyr</i>	1 (0.4)				1 (0.4)
Toplam	167 (66.8)	54 (21.6)	22 (8.8)	7 (2.8)	250 (100)

Tablo II. Vajen ve RİA İpi Örneklerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin İn Vitro Biyofilm Oluşturma Özelliği

<i>Candida</i> türü (n)	Biyofilm Oluşumu		p*
	Yok n (%)	Var n (%)	
Vajen			0.01
<i>C.albicans</i> (54)	46 (85.2)	8 (14.8)	
<i>C.glabrata</i> (22)	12 (54.5)	10 (45.5)	
<i>C.tropicalis</i> (7)	4 (57.1)	3 (42.9)	
RİA İpi			0.07
<i>C.albicans</i> (66)	36 (54.5)	30 (45.5)	
<i>C.glabrata</i> (11)	4 (36.4)	7 (63.6)	
<i>C.tropicalis</i> (3)	2 (66.7)	1 (33.3)	
<i>C.famata</i> (2)	2 (100)		
<i>C.guilliermondii</i> (2)	2 (100)		
<i>C.kefyr</i> (1)	1 (100)		

* *C.albicans* ve albicans-dışı *Candida* spp. arasında biyofilm oluşturma özelliğinin karşılaştırılmasıyla elde edilen p değeri.

yofilm oluşturma özelliklerine göre dağılımı Tablo III'te sunulmuştur. Vajenden izole edilen *C.albicans* suşları arasında biyofilm oluşturanların flukonazol direnci, oluşturmayanlardan daha yüksek bulunmuş ($p= 0.002$); buna karşın albicans-dışı *Candida* türlerinde biyofilm oluşturan ve oluşturmayan gruplarda flukonazol ve itraconazol direnç oranları benzer olarak saptanmıştır ($p> 0.05$). RİA İpi örneklerinden izole edilen suşlar değerlendirildiğinde, flukonazol direnç oranları biyofilm oluşturan *C.albicans* ve albicans-dışı *Candida* spp. izolatlarında oluşturmayanlardan daha yüksek bulunmuş; itraconazol direnç

Tablo III. *Candida* İzolatlarının Flukonazol ve İtrakonazol Dirençlerinin Biyofilm Oluşturma Özelliği ile Karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri (n)	Biyofilm oluşumu (n)	Flukonazol direnci n (%)	p	İtrakonazol direnci n (%)	p
Vajinal izolatlar					
<i>C.albicans</i> (54)	Var (8)	4 (50)	0.002	3 (37.5)	0.2
	Yok (46)	4 (8.7)		10 (21.7)	
Albikans-dışı <i>Candida</i> spp. (29)	Var (13)	7 (53.8)	0.3	7 (53.8)	0.6
	Yok (16)	6 (37.5)		10 (62.5)	
RİA ipi izolatları					
<i>C.albicans</i> (66)	Var (30)	8 (26.7)	0.01	13 (43.3)	0.1
	Yok (36)	2 (5.6)		10 (27.5)	
Albikans-dışı <i>Candida</i> spp. (19)	Var (8)	7 (87.5)	0.009	7 (87.5)	0.03
	Yok (11)	3 (27.3)		4 (36.4)	
RIA: Rahim içi araç.					

RIA: Rahim içi araç.

oranları ise biyofilm oluşturan ya da oluşturmeyan *C. albicans* suşlarında benzerlik gösterirken, biyofilm oluşturan albicans-dışı *Candida* spp. izolatlarında oluşturmayanlara göre daha yüksek saptanmıştır (Tablo III). RIA ipi örneklerinden izole edilen tüm *Candida* spp. dikkate alındığında, biyofilm oluşturanların flukonazol direnci (15/38, %39.5) oluşturmayanlara (5/47, %10.6) göre daha yüksek ($p = 0.002$); itrakonazol direnci de biyofilm oluşturan grupta (20/38, %52.6) oluşturmeyan gruptan (14/47, %29.8) daha yüksek saptanmıştır ($p = 0.03$).

Çalışmamızda, biyofilm oluşturan izolatların antifungal ilaçlar için MLK_{50} ve MLK_{90} değerlerinin oluşturmayanlardan daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo IV).

TARTIŞMA

Özellikle *C. albicans* başta olmak üzere *Candida* türleri tarafından oluşturulan birçok enfeksiyonda, implante edilmiş tıbbi gereçler üzerinde biyofilm oluşumu görülebilir³. Biyofilm oluşumu *C. albicans*'ın yüzeye yapışmasıyla başlar ve hücre-hücre tutunmalarıyla biyofilm katlar şeklinde oluşarak farklı bir biyolojik kütleye yol açar¹³. Maya hücrelerinin, çalışmamızdaki polipropilen RIA ipi yapay yüzeylere veya vajen gibi biyolojik yüzeylere tutunması in vivo mikroçevreden etkilenmektedir. İmplante maddeler vücuda yerleştirildiğinde yapay yüzeyde önce kolaylaştırıcı film denilen glikoprotein tabakası oluşur ve bu film mayanın yapay yüzeye tutunmasını kolaylaştırır³. Bu çalışmada kullanılan polipropilen RIA ipleri, devamlı olarak glikopropilenden zengin vajinal ve servikal salgılarla, bazen de semen ile yıkanmaktadır. RIA ipi gibi bir mikroçevrede biyofilm oluşumu bugüne kadar çalışılmamıştır.

Candida biyofilmlerinin tespitinde XTT ve KV ölçümlerinin, farklı deneylerde çok düşük absorbans değişkenliği gösteren, güvenilir ve kolay tekrar edilebilen yöntemler olduğu ifade edilmiştir¹⁴. *Candida* türlerinin biyofilm oluşturabilme etkinliği farklı çalışmalar-

Tablo IV. *Candida* İzolatlarının Antifungal MLK Değerleri ile Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Antifungal	MLK değeri (µg/ml)	Biyofilm oluşumu	
		Yok	Var
Vajinal izolatlar		(n= 62)	(n= 21)
Flukonazol	MLK ₅₀	1	32
	MLK ₉₀	64	> 128
İtrakonazol	MLK ₅₀	0.5	0.5
	MLK ₉₀	> 32	> 32
Amfoterisin B	MLK ₅₀	0.25	0.25
	MLK ₉₀	0.5	1
RIA ipi izolatları		(n= 47)	(n= 38)
Flukonazol	MLK ₅₀	1	1.5
	MLK ₉₀	128	> 128
İtrakonazol	MLK ₅₀	0.5	0.5
	MLK ₉₀	> 32	> 32
Amfoterisin B	MLK ₅₀	0.25	0.5
	MLK ₉₀	1	1.5

RIA: Rahim içi araç, MLK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

da tartışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, proteinsiz düşük glikojenli besiyeri kullanıldığında *C.albicans*'ın, albicans-dışı *Candida* türlerinden daha etkin biyofilm oluşturduğu görülmüştür^{15,16}. Diğer yandan kan gibi hem protein hem glukoz içeriği yüksek sıvılarda albicans-dışı *Candida* türlerinin *C.albicans*'a oranla biyofilm oluşturma özelliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur¹⁷. Bizim çalışmamızda, vajen ve RIA ipinden izole edilen toplam *Candida* suşlarının yaklaşık üçte birinin (59/168; %35) polisteren üzerinde in vitro biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Vajinal mikroçevreden izole edilen *C.albicans* ve albicans-dışı *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma oranları arasında anlamlı bir fark bulunmuş [sırasıyla, %14.8 (8/54) ve %44.8 (13/29); p= 0.01]; ayrıca RIA ipi örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarının, vajinal örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarından daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir [sırasıyla, %45.5 (30/66) ve %14.8 (8/54); p< 0.001]. Çalışmamızdaki RIA ipi gibi yüzeylerde *Candida* türlerinin biyofilm oluşturmalarının gösterilmesi önemlidir; zira enfeksiyonun yok edilebilmesi için RIA'nın vajenden uzaklaştırılması gerekebilir ya da RIA çekilme bile persistan veya tekrarlayan enfeksiyonları önlemek için biyofilmlere etki edebilen yeni antifungal ilaç seçenekleri kullanılabilir. Biyofilmlerin antifungal dirençlerinin planktonik hücrelerden daha yüksek olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir¹⁸. Bu çalışmada, RIA ipi örneklerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarında, biyofilm oluşturanların flukonazol ve itrakonazol direnci (sırasıyla, %39.5 ve %52.6), oluşturmayanlara göre (sırasıyla, %10.6 ve %29.8) anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (Tablo III). Bu durum, RIA kullanan kadınlarda RIA ipi yüzeyinde oluşan *Candida* biyofilminin vajinal kandidozda tekrarlayan semptomlardan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Benzer olarak, vajen örneklerle-

rinden izole edilen biyofilm pozitif *Candida* spp. suşlarında flukonazol ve itrakonazol direnci (sırasıyla, %52.4 ve %47.6), planktonik vajinal izolatlardan (sırasıyla, %16.1 ve %32.2) daha yüksektir. Ek olarak, antifungal ilaçların MİK değerlerinin de biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmaya göre daha yüksek olduğu izlenmiştir (Tablo IV).

Biyofilm içinde çoğalan *C.albicans* suşlarının antifungal ilaçlara karşı direnç mekanizmaları arasında; biyofilmin ekstraselüler matriksinin kalınlığı, ilaçların biyofilme penetrasyonundaki farklılıklar, biyofilm oluşumunda farklı evrelerin varlığı, biyofilmdaki maya hücrelerinin fizyolojik durumu ve ilaçların hücre dışına pompalanması gibi unsurlar sayılabilir⁴. Bizim çalışmamızda, *Candida* spp. izolatlarının amfoterisin B için MİK değerleri ≤ 1.5 µg/ml olarak bulunmuş; ancak direnç sınır değerleri henüz kesinlik kazanmadığından bu ilaç için duyarlı/dirençli yorumu yapılamamıştır. Lipozomal amfoterisin B'nin, kateterde biyofilm oluşturan *Candida* türlerine karşı etkin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş ve bu etkinliğin sebebinin, ilacın ekstraselüler matrikse kolay penetre olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir^{19,20}. Çalışmamızda, biyofilm oluşumundan bağımsız olarak *C.albicans* ve albicans-dışı *Candida* türlerinde flukonazole direnç oranları sırasıyla %15 ve %54.2, itrakonazole direnç oranları ise sırasıyla %24.2 ve %68.7 olarak saptanmıştır. *C.albicans* izolatlarında saptanan yüksek flukonazol direncinin (%15) nedeninin, *Candida* izolatlarının flukonazol duyarlılığını saptamada görülebilen "trailing" etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Günümüzde, RİA dışında farklı tıbbi gereçler (pelvik organ prolapsusunda kullanılan peserler, hormon salan vajinal halkalar vb.), uzun süreli tedaviler için vajinaya yerleştirilmektedir. Bu durum, vajinal mikroçevrede biyofilm oluşumunun giderek artan oranda önem kazanmasına yol açacaktır. Sonuç olarak çalışmamız, RİA kullanan semptomatik kadınlarda, *Candida* türlerinin in vitro biyofilm oluşturmalarını araştıran öncü bir çalışma olmakla birlikte, sonuçların desteklenmesi için bu konuda daha geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Chassot F, Negri MF, Svidzinski AE, et al. Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? Contraception 2008; 77(5): 355-9.
2. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995; 20(6): 1526-30.
3. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 2006; 6(7): 979-86.
4. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well designed protected environment. Med Mycol 2005; 43(3): 191-208.
5. Ünalın T, Koç İ, Sabahat Tezcan S. Family Planning, pp: 59-77. In: Turkey Demographic and Health Survey 2003. Hacettepe University Institute of Population Studies, Ministry of Health General Directorate of Mother and Child Health and Family Planning, State Planning Organization and European Union. 2004, Ankara, Turkey.
6. Marrie TJ, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. Am J Obstet Gynecol 1983; 146(4): 384-94.
7. Jacques M, Olson ME, Costerton JW. Microbial colonization of tailed and tailless intrauterine contraceptive devices: influence of the mode of insertion in the rabbit. Am J Obstet Gynecol 1986; 154(3): 648-55.

8. Ocak S, Cetin M, Hakverdi S, Dolapcioglu K, Gungoren A, Hakverdi AU. Effects of intrauterine device and oral contraceptive on vaginal flora and epithelium. *Saudi Med J* 2007; 28(5): 727-31.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2. 2007, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
10. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(9): 2475-9.
11. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 2011; 49(3): 253-62.
12. Karaer A, Boylu M, Avsar AF. Vaginitis in Turkish women: symptoms, epidemiologic - microbiologic association. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 121(2): 211-5.
13. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(6): 588-94.
14. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008; 72(2): 157-65.
15. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 1994; 62(3): 915-21.
16. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1773-80.
17. Shin JH, Kec SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1244-8.
18. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 2004; 7(4-5): 301-9.
19. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70(2): 878-88.
20. Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, et al. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5): 1727-32.