

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SANTRAL VENÖZ KATETERLERDE
KULLANILAN MATERYALLER İLE
KANDİDALARIN BİYOFİLM ÜRETİMİ
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

DR. SEVİL SAPMAZ KARABAĞ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe YÜCE**

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2010

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	III
TABLO DİZİNİ	V
ŞEKİL DİZİNİ	V
RESİM DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET	1
İNGİLİZCE İSİM VE ÖZET.....	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Biyofilm Tarihçesi	5
2.2.Biyofilm Yapısı	6
Ekstraselüler Polimerik Madde	6
Yüzey Düzensizliği	7
Öncü Film Tabaka	7
Sıvının Akım Hızı.....	8
Sıvı Ortam İçeriği.....	8
Biyofilmden Ayrılma.....	8
2.3.Biyofilm ve İnfeksiyon	9
2.4. Mantarların Mikrobiyolojik Özellikleri.....	10
2.4.1.Mantarların Üremelerini Etkileyen Faktörler	11
2.5. Kandida Türleri	11
2.5.1.Mikrobiyolojik Özellikleri	11
2.5.2.Tıbbi Önemi olan Kandidaların Morfolojik Özellikleri.....	13
2.5.3.Kandidaların Hücre Yapıları	13
Hücre iskeleti	13
Hücre Membranı	13
Hücre Duvarı.....	13
2.5.3.1 Mannoproteinler	14
Adezyon	14
Fagositozu Önleyici Özelliği	15
Hemolitik Rolü	15
Antijen Niteliği.....	15
2.5.4.Kandidaların Virulans Özellikleri	16

Aderans	16
Çimlenme Borusu.....	16
Salgısal Proteazlar	17
Fosfolipazlar.....	17
Slime üretimi	17
2.6.Kandida İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi.....	17
2.7. Kandida İnfeksiyonlarının Patogenezi.....	19
2.7.1. Biyofilm Oluşturmaları	20
2.8.KANDİDEMİ.....	24
2.9.KATETER ENFEKSİYONLARI	25
2.9.2.1. Kateter İnfeksiyonlarının Patogenezi.....	27
2.9.2. Kateter İnfeksiyonları Epidemiyolojisi	30
2.9.3. Kateter İnfeksiyonları Tanısı.....	32
Mikrobiyolojik İncelemeler	33
2.9. 4.Kateter İnfeksiyonları Yönetiminde Genel İlkeler	35
2.9.5. Kateter İnfeksiyonlarından Korunma	35
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	37
3.1.Çalışma Düzeni	37
3.2.Besiyeri ve Solusyonların Hazırlanması	37
3.3.Örnek Büyüklüğünün Saptanması.....	38
3.4.Biyofilm Saptanması.....	38
3.4.1.Plak Yöntemi ile Biyofilm Çalışılması.....	38
3.4.2. Mikroplak Yöntemi ile Kateter Yüzeylerinde Biyofilm Üretiminin Saptanması	39
3.4.3. Scanning Elektron Mikroskopi ile Biyofilm Gösterilmesi	40
3. 5.İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
PBS	Phosphate Buffer Salın
CDR-1	Candida Drug Resistance-1
CFU	Coloni Forming Unit
DMSO	Dimethyl sulfokside
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EPM	Ekstraselüler Polimerik Madde
ESM	Ekstra Selüler Matriks
GIS	Gastro İntestinal Sistem
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IDSA	Infectious Diseases Society of America
INIC	International Nosocomial Infection Control Consortium
JVK	Juguler Ven Kateter
KDİ	Kan Dolaşım İnfeksiyonu
KİKDİ	Kateter İlişkili Kan Dolaşım İnfeksiyonu
MDR-1	Multidrug resistance-1
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)]

NCSS	Number Cruncher Stastical System
NHSN	National Healthcare Safety Network
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
NOD	Nucleotide Oligomerisation Domain
PASS	Power Analysis Sample Size
PMNL	Polimorfo Nükleer Lenfosit
PVC	Polivinilklorid
QS	Quorum Sensing
SDA	Saburoud dekstroz Agar
SDB	Saburoud Dekstroz Buyyon
SEM	Scaning Electron Microscopy
SkVK	Subklaviyan Ven Kateter
SVK	Santral Venöz kateter
SVKİKDİ	Santral Venöz Kateter İlişkili Kan Dolaşım İnfeksiyonu
TPN	Total Parenteral Nutrisyon
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Hücre tutunması ve biyofilm oluşmasında önemli etkenler	9
Tablo 2: Bazı önemli kandida türlerinin biyokimyasal (asimilasyon) özellikleri.....	12
Tablo 3:Kandidaların oluşturduğu biyofilmin incelenmesinde kullanılan yöntemler.....	21
Tablo 4: Santral venöz kateterlerin yapıldıkları materyaller ve özellikleri.....	24
Tablo 5: Kateter tipleri ve özellikleri	27
Tablo 6: Kateter tipleri ve infeksiyon sıklığı.....	29
Tablo 7: SVKİKDİ ile ilgili risk faktörleri.....	32
Tablo 8: İntravasküler kateter ilişkili infeksiyonların tanı önerileri	33
Tablo 9: Kateterle ilişkili infeksiyon tanımları.....	34
Tablo 10: Kandida türlerinin slime faktör oluşumu dağılımı	41
Tablo 11: <i>C.albicans</i> 'ın kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi	42
Tablo 12: <i>C. tropicalis</i> 'in kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi	43
Tablo 13: <i>C.glabrata</i> 'nın kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi.....	43
Tablo 14: <i>C.parapsilosis</i> 'in kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi	43
Tablo 15: <i>C.tropicalis</i> 'in kateter grupları ile karşılaştırılması	44
Tablo 16: <i>C.albicans</i> ile non-albicans türlerin karşılaştırılması.....	44

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm içinde mikroorganizma döngüsü	6
Şekil 2. Kandida hücre duvarının şematik görünümü.....	14
Şekil 3. <i>C.albicans</i> biyofilm gelişim aşamaları	23
Şekil 4. Mikroorganizmaların damar-içi katetere giriş şekli	30

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Su sisteminde biyofilm tabakası.....	6
Resim 2. Medikal araç yüzeyinde biyofilm.....	6
Resim 3. Silime olumsuz ve slime olumlu kandida şuşlarının petride görünümü.....	41
Resim 4. <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> ve <i>C. glabrata</i> şuşlarının MTT formozan ile renk değişimlerinin görülmesi.	42
Resim 5. SEM’nda x500 büyütmede <i>C. tropicalis</i> ’in silikon kateter üzerindeki görünümü.....	45
Resim 6. SEM’nda x500 büyütmede <i>C. glabrata</i> ’nın silikon kateter üzerindeki görünümü.....	45
Resim 7. SEM’nda x2000 büyütmede <i>C. albicans</i> ’ın poliüretan üzerindeki görünümü.	46
Resim 8. SEM’nda x3500 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in karbotan kateter üzerindeki görünümü.....	46
Resim 9. SEM’nda x500 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.....	47
Resim 10. SEM’nda x10000 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.....	47
Resim 11. SEM’nda x3000 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.....	48
Resim 12. SEM’nda x3500 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.....	48
Resim 13. SEM’nda x2500 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in silikon kateter üzerindeki birbiri ile bağlantılı kolonilerin görünümü.....	49
Resim 14. SEM’nda x3500 büyütmede <i>C. parapsilosis</i> ’in karbotan kateter üzerindeki birbiri ile bağlantılı kolonilerin görünümü.....	49

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan başta tez hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Yüce olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nedim ÇAKIR, Sayın Doç. Dr. Nur YAPAR, Sayın Doç. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ, Sayın Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM ve Uzm. Dr. Sema ALP ÇAVUŞ'a;

Koleksiyonlarından yararlanmamı sağlayarak tezime büyük katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Mine DOLUCA'ya ve laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. M. Cem ERGON'a;

Elektron mikroskobu çalışmasında emeğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Uğur MALAYOĞLU'na;

Uzmanlık eğitim sürecimi birlikte paylaştığım değerli asistan arkadaşlarıma;

Uzmanlık sürem içinde her konuda destek olan sorumlu hemşiremiz Gül AYGÜN başta olmak üzere birlikte çalıştığımız tüm hemşire arkadaşlarıma;

Zorlu asistanlık süresi içinde her zaman yanımda olarak destek olan sevgili eşim ve canım oğlum Ata Berk'e;

Bu günlere gelmemi sağlayan çok değerli aileme;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler.

ÖZET

Santral Venöz Kateterlerde Kullanılan Materyaller İle Kandidaların Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki

Amaç: Kateter ilişkili kan dolaşım infeksiyonları içinde kandidalar kan kültürlerinde saptanan etkenler arasında dördüncü sıradadır. Bu çalışmada, kandidemi etkeni olan kandida türlerinin in-vitro ortamda ve farklı materyallerden yapılmış santral venöz kateter yüzeyinde biyofilm oluşumu ile yüzey farklılıklarının rolünün araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilmiş *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* suşlarında petri de glukozlu sıvı sabouraud besiyeri yöntemiyle slime faktör varlığı çalışıldı. Her kandida türünden slime olumlu birer suş gelişigüzel seçildi. Silikon, karbotan ve poliüretan materyalden yapılmış kateterler 0.5cm uzunlukta kesilerek, 96 kuyucuklu plate kuyucuklarına konarak ml'sinde 10^7 hücre içeren hücre süspansiyonu ile 37°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama işlemlerinin ardından MTT indirgeme reaktivatörü kullanılarak biyofilm içindeki hücre miktarının saptanması için spektrofotometrede 540nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Kateter yüzeyine tutunan hücreler %2.5'lik gluteraldehit ve %1'lik Osmiyum tetra-oksitle fikse edilerek etüvde kurutuldu. Altınla kaplanarak Scanning elektronik mikroskop ile görüntüler incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda en fazla *C.parapsilosis*'in slime oluşturduğu(%83.4), *C.albicans* ile non-albicans türler arasında slime üretimi açısından anlamlı farklılık olduğu görüldü(p=0.0001). *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'nın çalışılan üç kateter türüne de eşit olarak tutunduğu, *C.tropicalis*'in en az karbotan katetere tutunduğu(p=0.011) ikinci en az silikon katetere tutunduğu(p=0.024) görüldü.

Sonuç: Çalıştığımız kateterlerin *C.tropicalis* dışında birbirlerine üstünlükleri saptanmadı. Karbotan kateterin *C.tropicalis* tarafından oluşturulan biyofilme daha dirençli olmasına rağmen diğer türlerle önemli oranda kolonize olduğu görüldü. Çalışmanın sonucuna göz önüne alındığında kateter alımı planlanırken kandideminin sık olduğu ünitelerde eğer maliyet etkinse karbotan kateterin tercih edilebileceğinin uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Biyofilm, Kandida, Kateter.

SUMMARY

THE INTERACTION BETWEEN BIOFILM FORMATION IN CANDIDA SPECIES AND MATERIALS USED IN CENTRAL VENOUS CATHETERS

Objective: Among catheter related bloodstream infections, candida species are in forth line within the pathogens isolated form blood cultures. The aim of this study is to determine the biofilm formation of candida species which cause candidemia in-vitro on the surface of central venous catheters made with different materials and to determine the role of surface diversity.

Method: In our study slime factor presence in *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* species isolated from blood cultures were examined with glycolised liquid saboraaud medium in petri dish. From each candida species, one slime factor positive sample were collected randomly. Catheters made of silicone, carbotane, polyurethane were cut 0,5 cm long and were put into wells, containing 96 wells in one plate. Fungus suspension which contained 10^7 colonies in 1 mL added to the wells and incubated in 37^0 C for 72 hours. After incubation, plates were washed and MTT reduction reactivator was used and the plate was read in 540nm absorbans in spectrophotometer to determine the quantity of colonies in biofilm. The fungus adhered to catheter surface were fixed with 2,5% gluteraldehyde and 1% Osmium tetra-oxide solution and were dried in the incubator. After this procedure, the plate was covered with gold and the images were analyzed with scanning electron microscope.

Results: In this study, it is determined that *C. parapsilosis* species produced more slime factor than other candida species (%83.4). It is found that there is a significant difference between *C. albicans* and non-albicans species in producing slime factor ($p=0.0001$). Although *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* adhered to all three types of catheter without any difference, *C. tropicalis* fixed to carbotane catheter at least ($p=0.011$) and also less to silicone catheter ($p=0.024$).

Conclusion: Except *C. tropicalis* species there was no superiority determined between the catheters we used. Although carbotane catheter was resistant to the biofilms produced by *C. tropicalis*, it was easily colonized with other candida species. As it is determined in this study, when planing to purchase catheters, units of candidemia is common the cost-effectiveness sholud be considered more than the carbotane materials used for catheter.

Keywords: Biofilm, Candida, Catheter.

1.GİRİŞ ve AMAC

Kateter ilişkili kan dolaşım infeksiyonları (KİKDI) erken tanı ve tedavi olanaklarındaki gelişmelere ve infeksiyon kontrol önlemlerinin yaygın kullanımına rağmen önemli bir sağlık sorunudur. Hastane infeksiyonlarına neden olan etkenlerin antibiyotik direncindeki artış ve bu dirençli patojenlerin üniteler ve hastaneler arasında yayılımı tedavi başarısızlıklarına, hasta morbiditesi ve mortalitesinde artışa ve büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle KİKDI'ları ve kontrolü giderek daha önem kazanmaktadır.

Başta yoğun bakım üniteleri (YBÜ) olmak üzere hematoloji-onkoloji üniteleri, yanık üniteleri ve cerrahi bölümlerdeki hastalarda santral kateter kullanım sıklığı fazladır. Bu ünitelerde bulunan hastalar, genelde ağır hastalıkları olan, tanı ve tedavi amacı ile daha sık invaziv girişimlerin yanısıra, daha yoğun ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavileri uygulanan hastalardır.

Hastane infeksiyonlarını önlemek için öncelikle, sorunun boyutunu anlamak gerekmektedir. Genel patojen tiplerini ve mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılık durumlarını bilmek, sorunun çözümüne başlamak için önemli parametrelerden biridir.

Son yıllarda Human Immunodeficiency Virus (HIV) epidemisi ve immünsüpresif ilaçların kullanımının artması ile invaziv fungal infeksiyonların sıklığı ve bunlara bağlı ölümler de artmaktadır[1]. Daha önceki yıllarda hastane infeksiyonlarına neden olan etkenler genellikle gram negatif ve gram pozitif bakteriler iken son on yılda bunları artan oranlarda genel mantar infeksiyonlarının izlediği gözlenmektedir[2]. Bu artış; geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve immünsüpresif ilaçların yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren nötropeniler, artan kateter kullanımı ve artan major kardiyak ve abdominal cerrahi gibi girişimsel işlemler ile ilişkilidir. Üretral kateter, eritrosit transfüzyonu, total parenteral beslenme ve önceki antibiyotik kullanımı kandidemi için bağımsız risk faktörleridir[3]. Kandida cinsi mayalar Amerika Birleşik Devletlerinde kan kültürlerinde koagülaz-negatif stafilokoklar, *Staphylococcus aureus* ve enterokok türlerinden sonra dördüncü sırada en sık izole edilen mikroorganizmalardır[4]. Kandidalara bağlı nozokomiyal kan dolaşım infeksiyonları (KDI)'larının %25-50'si YBÜ'de meydana gelmektedir[5]. Mantarların neden olduğu KİKDI sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olduklarından ciddi morbidite ve mortalite nedenidir.

Candida albicans en sık kandidemi etkeni olmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda kandidemilerde albicans-dışı kandida türlerinin oranının arttığı gösterilmiştir. Albicans dışı kandida türlerine bağlı kandidemilerdeki artışın en önemli nedeni profektik ve

ampirik olarak antifungallerin, özellikle azol türevi ilaçların kullanılmasıdır. Azol türevi antifungallerin yoğun kullanımı *C. albicans* türlerinde dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açarken, intrinsik olarak azollere daha az duyarlı *C. glabrata* gibi suşların artışına yol açmaktadır[6].

Kandidalar kompleks polisakkarit yapıda olan slime maddesi salgırlar. Slime, mikroorganizmanın konak hücreye ve kateter gibi yabancı yüzeylere yapışarak, çoğalmasını sağlar. Diğer taraftan mikroorganizmayı opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi immün mekanizmalardan ve antifungal ajanlardan korur.

Son yıllarda kateter, pacemaker, prostetik kalp kapağı ve eklem protezleri gibi tıbbi araçların kullanımı dramatik olarak artmıştır. Bu araçlar üzerinde mikroorganizmalar kolonize olmaya başlarlar ve polimerik materyal üzerinde ekstraselüler matris içine gömülerek tek ya da çok tabakalı biyofilm yapısı oluştururlar. Biyofilmden salınan mikroorganizmalar akut diseminasyon hastalığa ya da kronik tedaviye dirençli enfeksiyona neden olurlar. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar hem konak savunma mekanizmalarına hem de antifungal tedaviye dirençlidir. Bu nedenle Kateter ilişkili enfeksiyonların tedavisi zordur ve sıklıkla kateterin çıkarılması gerekir[7].

Sonuçta kandida türlerinin oluşturduğu KİKDİ patogeneğinde biyofilm formasyonu önemli yer tuttuğu için kandidemi tedavisi problem oluşturmaktadır. Artan mortalite ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Biyofilm oluşumunun yüzey ile ilişkili olması nedeni ile yüzeyi oluşturan materyal farkı ile biyofilm formasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesinin KİKDİ'lerinin önlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Bu fark esas alınarak malzeme alımı planlaması ya da KİKDİ önleme çalışmaları yapılmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada kandida türleri ile yabancı yüzeyi oluşturan materyaller arasında biyofilm formasyonu oluşumu açısından fark olup olmadığını göstermeyi hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Biyofilm Tarihçesi

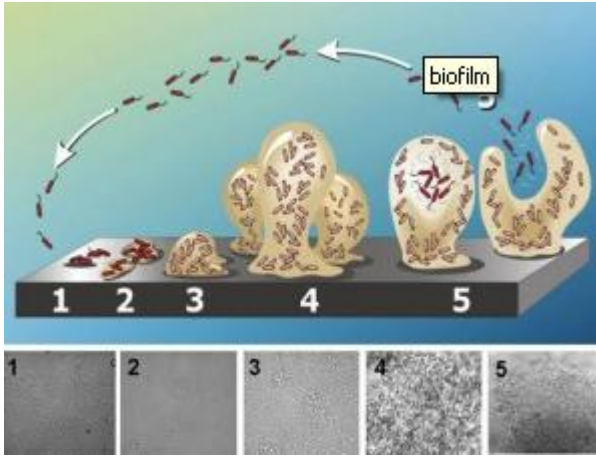
Biyofilm basit ve genel olarak bir yüzeye tutunmuş mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanabilir. Mikrobiyolojide genel olarak mikroorganizmalar ortamda serbest süspans (planktonik) halde dolaşan hücreler olarak tanınırlar ve zengin besiyerlerinde büyüme özelliklerine göre tanımlanırlar. Tarihte ilk kez Henrici 1933 yılında direk mikroskopik yöntemle tatlı su bakterilerinin serbest yüzmekten ziyade yüzey üzerinde çoğaldıklarını belirtmiştir[8].

Van Leeuwenhoek basit mikroskop ile dış yüzeyinde biyofilmi tanımlamıştır. Zobell ve Anderson ise 1936 'da deniz suyunda bakteri büyümesini göstermiş bunun da suyun temas ettiği yüzeyin genişliği ile orantılı olabileceğini düşünmüştür[9]. Ancak, biyofilm yapısını daha detaylı görmek için elektron mikroskopunu beklemek gerekmiştir. İlk kez Jones ve arkadaşları 1969 yılında elektron mikroskopu kullanarak atık su geri dönüşüm ünitelerindeki filtrelerde biyofilm tabakasını ve tabakanın içindeki hücre topluluklarını göstermişlerdir. Rutenyum kırmızısı denilen polisakkarit boyası ve fiksatif olarak osmiyum tetraoksit kullanarak mikroorganizmaların polisakkarit yapı ile çevrelendiğini göstermişlerdir[10]. 1977 yılında Geesey ve ark. tarafından akarsularda su altındaki yüzeylerde bakteriler tarafından oluşturulan slime tabakası faz kontrast elektron mikroskopu ile gösterilmiş ve belirli yüzeylerde daha çok sessiz duran bakterilerin biyofilme neden olduğunu söylemişlerdir[11].

Costerton ve ark.ları 1978'de canlı ve cansız yüzeylerde oluşan biyofilm teorisini açıklamışlardır[12]. O zamandan beri endüstriyel ve ekolojik alandaki biyofilm çalışmaları ile sağlık alanındaki çalışmalar paralel seyretmiştir.

Son iki dekaddır çalışmaların çoğu elektron mikroskobu gibi aletsel yöntemlere ya da standart mikrobiyolojik kültür yöntemlerine dayanmaktadır[13].

Bu çalışmalarla şekil 1'de görüldüğü gibi bakteri biyolojik döngüsünün yüzeye tutunma, topluluk oluşturma (biyofilm),bu beraberliği idame ettirme ve bakterilerin planktonik hale geçtiği çözülme aşamalarından oluştuğu gösterilmiştir.

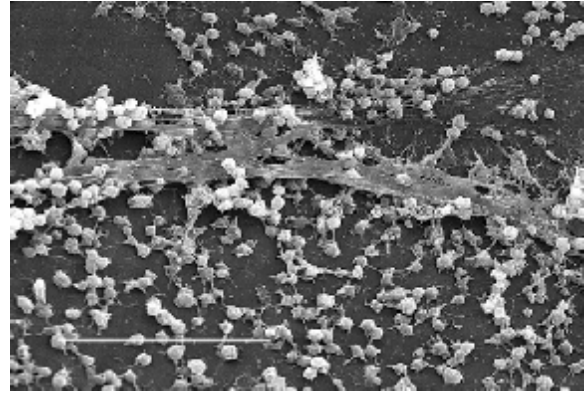
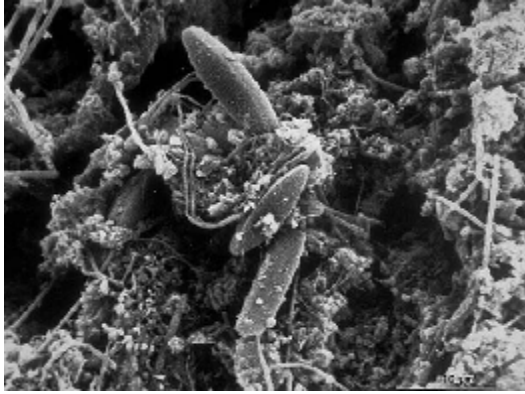


Şekil 1. Biyofilm içinde mikroorganizma döngüsü

2.2. Biyofilm Yapısı

Biyofilm temel olarak bir yüzey üzerinde bir arada tutunmakta olan mikroorganizmalardan ve bunların salgıladığı hücre dışı polimerik maddelerden oluşmaktadır. Biyofilm mineral kristaller, koroziv parçalar ve toprak-kil gibi non-selüler materyallerde ya da kan ve komponentlerinin olduğu çevresel ortamlarda gelişebilir. Canlı dokular, medikal aletler, endüstriyel portabl su boruları ya da doğal su sistemleri biyofilmin geliştiği diğer yüzeylerdir.

Endüstriyel su sistemi ve medikal alet yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasının Scanning Electron Microscopy (SEM) ile görüntüsü resim 1 ve 2’de gösterilmiştir.



Resim 1. Rodney Donlan and Donald Gibbon, authors. Licensed for use, American Society for Microbiology Microbe Library.

Resim 1. Used with permission of Lippincott Williams -Wilkins

Ekstraselüler Polimerik Madde

Biyofilm mikrobiyal hücrelerden ve ekstraselüler polimerik madde (EPM)’den oluşur. Ekstraselüler polimerik maddeler biyofilmin toplam organik bileşiminin %50 ile %90’ını oluşturmaktadır ve bu nedenle biyofilmin temel matris materyali olarak tanımlanabilir. Medikal araçlar üzerindeki biyofilm EPM ile ilişkilidir. EPM’lerin fiziksel ve kimyasal

özellikleri değişkenlik gösterir ancak esas olarak polisakkaritten oluşur. Polimerler arası çapraz bağlar, elektrostatik çekim, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşim biyofilm içindeki makromolekülleri bir arada tutarak biyofilmin stabilizasyonunu sağlarlar. Uronik asit (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asitler gibi) ya da ketal bağlı piruvatlar anyonik özelliği ile kalsiyum ve magnezyum gibi katyonlar aracılığı ile polimerler arasında çapraz bağ oluşumunu sağlarlar[14]. Bu polimerler içerdikleri 1,3 ya da 1,4 beta bağlı heksoz birimleri sayesinde az deforme olabilir ya da insoluble olabilirler[14].

Hücre dışı polimerik madde miktarı mikroorganizmalar arasında değişiklik göstermektedir ve biyofilm yaşı ile bu polimerik madde miktarı orantılı olarak artmaktadır[15]. Hücre dışı polimerik madde üretimi ortamın besin durumundan etkilenir. Ortamda karbon, nitrojen, potasyum ya da fosfat kısıtlılığı veya mikroorganizma sayısının fazla olması bu sentezi artırırken mikroorganizmaların yavaş büyümesi de azaltır[14].

Biyofilm oluşmasının başlayabilmesi için mikroorganizmanın yabancı cisim boyunca yüzeyine geri dönüşümsüz olarak yapışması gereklidir. Biyofilmi tek bir tür ya da birden çok türün katıldığı mikroorganizma topluluğu oluşturur. Yapışmanın gücü mikroorganizmanın sayısına ve cismin içinde bulunduğu sıvı ortamdaki hücrelerin tipine ve yüzeyin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Sıvının içeriği yüzeyin özelliklerini ve yapışma oranını etkiler. Yapışmadan hemen sonra ekstrasellüler polisakkaritler oluşturulur ve ekstrasellüler polimerler mikroorganizmaların adezyonunu artırır. Canlı ve cansız dokulardan oluşan bu yapıda bulunan mikroorganizmalar biyofilm içinde veya serbest olarak bulunurlar. Aynı mikroorganizma türlerinin farklı özellikler taşıyan bu iki topluluğunun serbest olan üyelerine genel olarak *planktonik mikroorganizmalar* denir. Mikroorganizmaların biyofilm ortamında çoğalması akım hızına, ortamdaki besin içeriklerine, antimikrobiyal ilaçların yoğunluğuna ve ortamın ısısına bağlıdır[13].

Yüzey Düzensizliği:

Yüzeyin düzensiz oluşu mikroorganizmanın tutunmasını ve kolonizasyonunu artırır. Bunun nedeni olarak düzensiz yüzeylerde suyun koparma kuvvetinin oldukça az olması ve bu noktalarda yüzey alanının artması öne sürülmektedir. Tutunulan yüzeyin kimyasal özellikleri de tutunma hız ve boyutuna katkı yapar. Mikroorganizmalar teflon ve bazı plastikler gibi hidrofobik nonpolar yüzeylere, cam ya da metal gibi hidrofilik yüzeylerden çok daha hızlı tutunabilmektedirler[16, 17].

Öncü Film Tabaka:

Bir materyal yüzeyi, içinde organik polimer bulunan sıvı ile temas ettirildiğinde materyal yüzeyi ince bir film halinde kaplanabilir. Bu şekildeki oluşum diğer

mikroorganizmaların o yüzeye tutunmasını ve kolonizasyonunu artırmaktadır. Bu nedenle bu yüzeye *öncü film tabakası* denir. İnsan vücudunda öncü film tabakası oluşumu daha karmaşık olarak gerçekleşir. Kan, gözyaşı, tükürük, idrar ve solunum yolları salgıları konak kaynaklı öncü filmlerin biyomateryallere yapışmasını artırır. Santral venöz kateterlerde gram negatif, gram pozitif bakteriler ve mayaların yapışması ve biyofilm oluşturması kan ürünleri ve öncü film tabakası varlığında daha hızlı olmaktadır.

Sıvının Akım Hızı:

Katı yüzeyler üzerinde akışkan sıvıların fiziksel özellikleri biyofilm oluşmasında önemli rol oynar. Akan sıvılarda akım hızı, yüzeye en yakın sıvı komşuluğunda en azdır. Bu önemsiz akım bölgesine hidrodinamik akım bölgesi denir. Bu bölgenin kalınlığı sıvının hızı ile ters orantılıdır. Bu sınır tabakanın dışındaki kısımda yoğun bir türbülans vardır. Hafif akımın olduğu ortamlarda (dolaşım ve üriner sistem gibi) statik ortamlara kıyasla biyofilm oluşumu daha fazladır[17].

Sıvı içindeki mikroorganizmalar partikül olarak davranır ve yüzeye tutunma miktarları büyük oranda sıvının hızına bağlıdır. Çok düşük akım hızlarında hidrodinamik tabakayı geçmek zorundadırlar. Bu nedenle hücre boyutu ve hücre hareketleri önem kazanır. Hareketli olan mikroorganizmalar, hareketsizlere göre akıma karşı daha hızlı davranırlar ve daha hızlı biyofilm oluştururlar. Hız arttıkça sınır tabaka incelik. Eğer mikroorganizmaların yüzeyden ayrılmasına yetecek kadar büyüklükte kuvvet yoksa artan akım hızları ile mikroorganizmalarla yüzey arasında daha hızlı temas sağlanır.

Sıvı Ortam İçeriği:

Sıvı ortamın pH değeri, besin içeriği, iyon gücü ve ısı yüzey üzerindeki mikrobiyal birleşmede önemli rol oynar[13]. Çeşitli mikroorganizmalar biyofilm oluşturmak için, içinde buldukları ortamın içeriğinden etkilenirler. Örneğin *P.aeruginosa* hemen her koşulda biyofilm oluştururken *Vibrio* türleri ortamda nitrojen ve karbon varlığında biyofilm oluşturur[18, 19]. Kandidaların dış yüzeyine ve yanak mukozasına yapışması için tükürükte bulunan statherin denen bir protein gerekir. Statherin bloke edildiğinde dışın sert tabakasına tutunma %93, yanak mukozasına tutunma %43 azalır. Yine ortamda galaktoz veya iki değerlikli iyonlar (Mg^{2+} , Ca^{2+}) bulunduğunda da biyofilm oluşturmaları artar[20].

Biyofilmden Ayrılma:

Biyofilm içinde yaşayan hücreler bir yaşam döngüsü oluştururlar. Bu döngü içinde yoğun kolonize oldukları alanda besin düzeylerinin azalması sonucu büyümeye elverişli yeni yerlere göç ederler. Biyofilm içinden mikroorganizmaların ayrılması şu mekanizmalarla olur;

- 1)Aktif büyüyen hücrelerden dökülme
- 2)Besin düzeylerinin azalması
- 3)Hücreler arasında quorum sensing ile haberleşme ve biyofilmden ayrılma
- 4)Fiziksel kuvvetlere bağlı (hidrobofisite gibi) ayrılma

Biyofilm içinde aktif büyüyen hücrelerden doğrudan dökülme ile ilişkili mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Ancak dökülen hücreler, yüzeye tutunanlara göre daha düşük hidrofobisiteye sahiptir. Fiziksel kuvvetlere bağlı ayrılma mekanizmaları daha iyi araştırılmış ve anlaşılmıştır. Buna göre;

- Erozyon ya da kopma biyofilmin üst tabakasının sürekli uzaklaştırılmasını sağlar.
- Erozyon hızı biyofilm kalınlığı ve sıvının koparma kuvveti ile orantılıdır.
- Abrasyon sıvı ortam içindeki partiküllerin çarpışması ile ilgilidir.

Yüzeye tutunmada rol oynayan etkenler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.Hücre tutunması ve biyofilm oluşmasında önemli etkenler

Yüzey özellikleri	Sıvı özellikleri	Hücre özellikleri
Yüzey düzensizliği	Akım hızı	Hidrofobisite
Hidrofobisite	pH	Fimbria
Öncü film oluşumu	Sıcaklık	Flafella
	Katyon içeriği	Ekstraselüler polimerik maddeler

Emerging Infectious Diseases • Vol. 8, No. 9, September 2002

2.3.Biyofilm ve İnfeksiyon:

Mikrobiyolojide klinik öneme sahip pek çok gram pozitif, gram negatif bakteri ve mantarlar biyofilm oluştururlar. Klinik açıdan; antimikrobiyal direnç, kronik infeksiyon, yabancı cisim infeksiyonları gibi tablolara neden olurlar. Bakterilerin neden olduğu biyofilm ve neden olduğu infeksiyonlarla ilgili çok sayıda çalışma varken, mantarlarla ilgili kısıtlı veri mevcuttur. Protez ve implante araçlarda meydana gelen kandida infeksiyonları oldukça sık karşılaşılan ve sıkıntılı durumlardır. İnsanlarda mantarlar tarafından oluşturulan biyofilmin neden olduğu infeksiyonlar tüm infeksiyonlar arasında önemli orana sahiptir[17]. Bu nedenle kandidal biyofilmin yapısının anlaşılması neden olduğu hastalıkların tedavisi için önem taşır. Biyofilm yapısının anlaşılabilmesi için öncelikle mantarların mikrobiyolojik özelliklerinin ve virulans faktörlerinin incelenmesi gerekir.

2.4. MANTARLARIN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Mantarların sınıflamasında 1969 yılında kabul edilen sınıflama kullanılmaktadır. Buna göre sınıflama hayvan-bitki-mantar-prokaryat ve protistalar şeklindedir. Tıbbi mikolojiyi ilgilendiren mantarlar Amastigomycotina bölümünde yer alırlar.

Mantar hücreleri kitin, glukan, mannan ve glikoproteinlerin bileşiminden oluşan sert hücre duvarı ile kaplıdır ve antijenik özelliğe sahiptir. Bu özellikleri ile mantarlar hücre duvarı olmayan hayvanlardan ve hücre duvarının ana bileşeni selüloz olan bitkilerden ayrılırlar[1]. Ökaryotik canlılar olması nedeni ile de bakterilerden ayrılırlar. Klorofilleri yoktur bu nedenle beslenmek için organik karbon içeren besinlere ihtiyaçları vardır. Gerekli organik maddeleri parçalamak için ekzoenzimler salgırlar. Enzimlerin etkisi ile ortaya çıkan besin maddelerini hücre duvarı yoluyla hücre içine alır.

Mantarlar tek hücreli olabildiği gibi çok hücreli de olabilirler. Çok hücreli mantarlarda, vejetatif evredeki mantarlar dallanmış hif topluluğundan oluşur. Buna miçelyum denir. Hifler sert bir hücre duvarından oluşur ve mitoz bölünme ile apikal büyür. Septumlu ya da septumsuz olabilirler. Mikroskopik olarak çok hücreli miçelyum yapısında olan mantarlara küf mantarı denir.

Tek hücreli mantarlar, hücre yüzeyinden benzer hücrelerin tomurcuklanması ile çoğalır. Oluşan tomurcuk ana hücreden ayrılır ya da bağlı kalarak kendi üzerinde yeni tomurcuklanma ile çoğalmaya devam eder. Bu şekilde hücrelerden bir zincir meydana gelir. Hif oluşturmeyen fakat tomurcuklardan gevşek bir dizilim oluşturan mantarlara maya mantarı denir. Bu gevşek hücre zincirlerine psödohif denir[1].

Mantarlar mayalar ve küfler olarak iki yapıya ayrılırken bazı mantarlar ise hem maya hem küf şeklinde olarak dimorfizm gösterir. Bunlar dokuya yayılım sürecinde üreme şekillerini değiştirirler. Konakta maya benzeri mantar formunda, in-vitro koşullarda oda sıcaklığında ise küf formunda ürerler. Histoplazmosis, blastomycosis, sporotrichosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis ve chromoblastomycosis türleri dimorfik özellik gösteren türlerdir[1].

Mikroskopik olarak spor oluşturarak ürerler. Üreme eşeysiz (yalnız mitozla, aseksüel) ya da eşeyli (mayozla, seksüel) olur. Birçok mantar eşeyli üreme yeteneğine sahiptir, bazı türler de kendi kendini dölleyebilir.

Duvar yapısında bulunan peptidomannanlara karşı bağışık yanıt oluşur. Hücre membranı fosfolipid, protein ve sterolden oluşan iki tabakalı yapı şeklindedir fakat memeli hücrelerinden farklı olarak kolesterol yerine ergosterol ve zimosterol bulunur. Günümüzde kullanılan antifungal ajanların çoğunun etki bölgesi membranda yer alan ergosteroldür[21].

Çoğu mantarın tanımlanması biyokimyasal testlere ve morfolojik görünümüne (kolonilerin makroskopik ve mikroskopik görünümü) göre yapılır. Ancak, tanımlanmalarında optimal metot kültürdür. Kültürün yapılamadığı durumlarda dokuda inflamatuvar yanıt ve fungal yapıların gösterilmesi ile tanımlanabilirler. Yavaş üreyen mantarlarda biyopsi örneklerinde görülen fungal yapılar ile hızlı tanı konulabilir[1].

2.4.1.Mantarların Üremelerini Etkileyen Faktörler:

Maya mantarları 24 saatte görünür koloni oluşturacak hızda ürerler. Kemoheterotrof oldukları için organik azot ve karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. Optimal pH'sı 6.8-7olan ve %95-100 oranında neme sahip ortamda ürer. Organik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanmalarına karşın tüm mantarlar glikozu fermente ederler. Bu nedenle kullanılan besiyerlerinde glikoz vardır.

Aerob olmaları nedeniyle örneklerin transportu ve kültürü aerob ortamlarda yapılmalıdır. Yüksek karbondioksitli ortamda da zayıf bir üreme gösterebilirler.

Mezofilik özellikte olup 0-40°C aralığında üreyebilirler. Optimal üreme ısıları ise 25-35°C'dir. Bazı mantarlar termotoleran olup farklı ısılarda ürerler. Örn: *Aspergillus fumigatus*. 10°C'nin altında üreyebilen mantarlar ise buzdolabında saklanan besinler için kontaminandırlar.

Labaratuvarıda Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerinde kolaylıkla ürerler. SDA'ya %2 ya da %4'lük glikoz eklenebilir. SDA asidik pH'ya (5.5) sahiptir. Böylece besiyerinde bakterilerin üremesi engellenir. Bunun dışında beyin-kalp-infüzyon agar, patates dekstroz agar ve mısır unu tween 80 gibi besiyerlerinde de ürerler. Beyin-kalp-infüzyon agar ve malt ekstreli besiyerleri gibi zenginleştirilmiş besiyerleri de kullanılabilir. Bunların dışında mantarlar middlebrook 7H10 ve Löwenstein - Jensen gibi diğer besiyerlerinde de ürerler. Optimal ısı olan 30°C'de inkübe edilmelidir. 30°C sağlanamazsa oda ısısında inkübe edilebilirler.

Maya şeklinde üreyen mantarların çoğunluğunu da kandidalar oluşturur.

2.5. KANDİDA TÜRLERİ

2.5.1.Mikrobiyolojik Özellikleri

Mayalar ökaryotik, tomurcuklanan tek hücreli organizmalardır. Mayaların çoğu tomurcuklanma ile az bir kısmı da ikiye bölünerek çoğalırlar. Tomurcuklanma hücrenin bir duvarında lizisle başlar bu noktadan balonlaşma olur. Bu arada nükleusta mitoz bölünme olur ve çoğalan kromozom tomurcuklanan kısma gider ve tomurcuk ana hücreden koparak ayrılır.

Oluşan yeni yavru hücreye *blastokonidium* denir[20]. Bazen tomurcuklanan kısım ana hücreden kopmaz, uzar ve yeni tomurcuklanmalar birbirini takip eder. Böylece pseudohif (yalancı hif) oluşur. Yalancı hif, hücreler arasında bölme olmaması, hücre duvarlarının birbirine paralel olmaması ve boğumlu olması gibi özellikleri ile gerçek hiften ayrılabilir. Yalancı hif oluşmasının ilk aşaması germ tüp oluşumudur.

Yalancı hif, epitelde kolonizasyonu takiben mayanın derin dokulara invaze olmasını sağlar. Germ tüp testi ile yaklaşık 90 dakikada hızlı - olası tanı konulabilir. Ancak türlerin kesin tanısı için şeker fermentasyon ve asimilasyon deneyleri de yapılmalıdır.

Genel olarak makroskopik ve mikroskopik özellikleri benzerdir. Labaratuvarında SDA'da kolaylıkla ürerler. SDA'ya %2 ya da %4'lük glikoz eklenebilir. SDA asidik pH'ya (5.5) sahiptir. Böylece besiyerinde bakterilerin üremesi engellenir. Hepsi, SDA'da 25°C ya da 37 °C'de, 2- 3 günde 2- 3 mm çapta, beyaz –krem renkli, düzgün yüzeyli ya da göbekli, mat ya da parlak koloniler oluştururlar. Bunun dışında beyin-kalp-infüzyon agar, patates dekstroz agar ve mısır unu tween 80 gibi besiyerlerinde de ürerler. Türler arasındaki morfolojik farklılıklar ancak mısır unlu tween 80 agar gibi spesifik besiyerlerinde belirlenebilir. Bunların dışında mantarlar middlebrook 7H10 ve Löwenstein - Jensen gibi diğer besiyerlerinde de ürerler. Kemoheterotrof oldukları için organik azot ve karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. Organik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanmalarına karşın tüm mantarlar glikozu fermente ederler. Bu nedenle kullanılan besiyerlerinde glikoz vardır.

Aerob olmaları nedeniyle örneklerin transportu ve kültürü aerob ortamlarda yapılmalıdır. Yüksek karbondioksitli ortamda da zayıf bir üreme gösterebilirler.

Tablo 2'de medikal önemi olan kandida türlerinin biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2. Bazı Önemli *Candida* Türlerinin Biyokimyasal (asimilasyon) Özellikleri

	glukoz	maltoz	sukroz	trehaloz	galaktoz	sellobiyoz	ksitoz	rafinez	laktöz	dulsitel	melibiyoz	üreaz	NO ₂ Mb
<i>C.albicans</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>C.parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.tropica</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.kuyfii</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C.krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C.glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5.2. Tıbbi öneme Sahip Bazı Kandida Türlerinin Morfolojik Özellikleri

Candida albicans: Bazı hidrolitik enzimleri olması nedeni ile virulansı en yüksek türdür. Mısır unlu agarda blastospor, klamidospore ve yalancı hif oluştururlar. Germ tüp yapması ve mısır unlu tween 80 besiyerinde klamidospore oluşturması ile kesin olarak tanımlanır.

Candida glabrata: Germ tüp testinde yalancı hif oluşturmaz. Mısır unlu tween 80 besiyerinde küçük oval ve uçlarından tomurcuklanan blastokonidyumlar ile tanınırlar.

Candida parapsilosis: Mısır unlu tween 80 besiyerinde düzenli olarak dallanan ve çam ormanına benzeyen yalancı hifler yapar. Yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak şekilde dizilmiş blastokonidyumları vardır. Çok önemli bir özelliği de arada iri hiflerin bulunmasıdır. Bunlara 'dev hücreler' denir[20].

Candida tropicalis: Mısır unlu tween 80 besiyerinde yalancı hif boyunca tek tek veya küçük kümeler oluşturmuş yuvarlağımsı blastokonidyumların görülmesi ile tanınırlar.

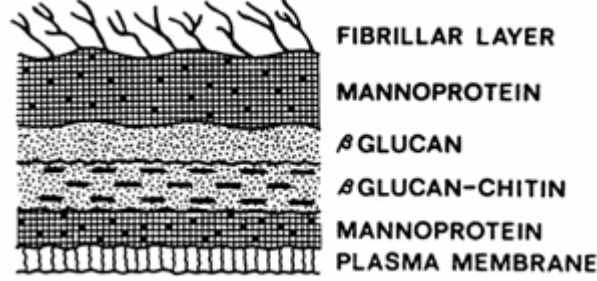
2.5.3. Kandidaların Hücre Yapıları

- *Hücre iskeleti*: Mikrotübüller, aktin ve miyozin gibi bileşenleri vardır. Hücre membranı ve hücre duvarı ile ilişkilidir. İçerdiği Ca^{2+} , Mg^{2+} ve H^{1+} iyonlarının hücre içine giriş çıkışları ile organellerin hareketliliği ve hif yapısının uzaması sağlanır.
- *Hücre membranı*: Fosfolipaz C, adenilat siklaz ve proteaz gibi enzimler ve duvar yapısında görevli olan kitin sentetaz membranda yer alır. Ayrıca fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin, fosfotidil serin ve fosfotidil inozitol gibi lipidler bulunur. Membranda bulunan sterol tüm lipidlerin %20'sini oluşturur. Sterolün de %95'i ergosteroldür[21].
- *Hücre duvarı*: Hücre duvarı mantar hücresinin biçimini, morfogenezi, virulansını, antijenleri yani mantar-konak etkileşimini ve mantarın antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik ve plastik, çok tabakalı bir yapıdır[22]. Sert yapıda olup hücreye şeklini verir ve şekil 2'de gösterildiği gibi üç bileşenden oluşur.

Duvarı oluşturan bileşenlerin hepsi güçlü antijeniktirler. Tomurcuklanma sırasında M fazına geçerken ve geçtikten sonra doku içinde serbest kalırlar. Hücrenin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) önemli görevleri vardır.

C. albicans'ın Y fazından M fazına geçebilmesi için konak doku ile temas etmesi gereklidir. Temas durumunda M fazına geçişi indükleyen iki stimulan faktör vardır. Birincisi mitogen-aktiveted protein kinaz aktivasyonu (Cph1p) ikincisi de cAMP – bağımlı aktivasyon yoludur (Efg1p). Bu indüksiyon mekanizmaları SAP5 geni tarafından kontrol edilir. SAP5 geni olmayan mutant suşlar avirulandır ve her zaman Y fazında kalırlar[23].

Kandida hücre duvarının predominant polisakkaridi β -glukandır. Nakagawa Y ve ark.ları β -glukanın monosit ve T-lenfositlerde sitokin yapımı üzerine baskılayıcı etki göstererek, *Kandida* infeksiyonlarına karşı olan konak savunmasını bozduğunu ileri sürmüşlerdir[24].



Şekil:2 Kandida hücre duvarının şematik görünümü

2.5.3.1.Mannoproteinler

Mannoproteinler kandida hücre duvarında biri iç diğeri dış yüzeye yakın iki tabaka oluşturacak şekilde yerleşirler. Elektron mikroskobu çalışmaları mannoproteinlerin hücre duvarının çeşitli katmanlarında dağılım gösterdiğini glukan ve kitinin daha çok duvarın iç kısmında yoğunlaştığını, dış yüzeyde mannanın baskın olduğunu ve bunların reseptör benzeri etkinliğe ve adezin özelliğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Kandida infeksiyonlarında mannanın önemli rolü olduğu ancak oluşan hastalık patogenezinin tek başına sorumlu olmadığı ya da şüpheli olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle diğer antijen ve virulans faktörlerinin de tanımlandığı belirtilmektedir[25]. *C. albicans*'ın mannan dışında başka antijenleri de saptanmıştır; bunlar arasında önemli olanları, salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleridir. Hücre duvarının devamlı bir antijenik özelliği yoktur. Dinamik bir yapıdır ve antijenik özellikleri *in-vivo/in-vitro* büyüme koşullarına göre değişir. Bu antijenik varyasyon suşa, besiyerine ve kültür yaşına bağlı olarak meydana gelir[26, 27,28]. *C.albicans* serotiplerinin antijenik varyabilitesi mannan ile ilişkilidir.

Mannanın virulanstaki rolü ise adezyon oluşturma,fagositozu önleyici etkisi, hemolitik aktivitesi ve antijenik özelliklerinden kaynaklanır.

- *Adezyon*

Hücre duvarının en dış tabakası konak hücrelerine adezyonda rol oynar. *C.albicans*'ın yüzeyinde bulunan mannoprotein molekülleri, epitel ve endotel hücrelerine bağlanmasında rol oynayan ligand olarak işlev görür. Konak hücre zarı üzerindeki glikozid reseptörleri ile ilişkiye giren mannoprotein fibrilleri adezyonu sağlarlar[29]. Karbon kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda şeker, özellikle galaktoz içeren besiyerlerinde üretilen *C.albicans* kökenlerinin epitel hücrelerine daha iyi bağlandığı ve bu kökenlerin farelerde daha virulan olduğu gösterilmiştir. Örneğin 50 mM galaktoz içeren besiyerinde üretilen kökenler göreceli

olarak düşük yoğunlukta (50 mM) glikoz içeren besiyerinde üretilen kontrollerden on kat daha fazla aderans göstermişlerdir. Dolayısıyla mannoprotein molekülleri aderansı sağlamakta ve virulansda önemli rol oynamaktadır[30].

Hücre yüzeyinde mannoprotein fibriller arttıkça hidrofobisite ve dolayısıyla aderans da artmaktadır[31]. Mikroorganizma hücreleri de memeli hücreleri gibi negatif yüzey potansiyeline sahiptir. Mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan hidrofobik moleküller, negatif yüklü iki yüzeyin itici gücüne karşı koyarlar ve mikroorganizmaların mukoza hücrelerine yaklaşmalarını sağlarlar. Böylece mikroorganizma hücresinin yüzeyinde bulunan ligandlar, mukoza hücresinde bulunan reseptörlere özgül ve geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar. *C.albicans*'ın yüzey mannoprotein moleküllerinin mantarın epitel ve endotel hücrelerine bağlanmasında ligand olarak rol oynadığı gösterilmiştir[32].

- *Fagositozu engelleyici özelliği*

Mannoprotein fibrilleri, sferoblast oluşmasını sağlar. Sferoblast fagositler tarafından fagosite edilmeye karşı direnç oluşmasına neden olur. Bu durum olasılıkla mantarın kolonizasyon ve infeksiyon potansiyelini de artırmaktadırlar[25]. *C.albicans*'ın miyeloperoksidaz ilişkili yolla öldürülmesi için enzimin mayalara bağlanması gereklidir ancak; hücre duvarındaki mannan ile miyeloperoksidaz arasında antagonizma bulunmaktadır. Fibrilli mannoprotein tabakası sentezlenmesi, miyeloperoksidazın hücre duvarına bağlanmasını önler böylece kandidalara karşı öldürücü etkisi engellenmiş olur. Bu mekanizma kandida infeksiyonlarının patogeneğinde önem taşır.

- *Hemolitik rolü*

C.albicans'ın hemoglobini yıkarak demir kaynağı olarak kullanmasını sağlayan bir hemolitik faktör salgıladığı, bu faktörün kompleman aracılı hemolize yol açtığı ortaya konmuştur [33]. Türler arasında hemolitik indeks farklılığı olup indeksi en yüksek hemolitik aktivite gösteren türün *C.albicans* olduğu gösterilmiştir[34].

- *Antijenik niteliği*

Kandidaların serolojik yanıtını oluşturan en önemli antijeni mannanıdır[35]. *C.albicans* mannoproteinlerine göre A ve B olarak iki serotipe ayrılmıştır[35].

Klinik kökenler arasında serotip A serotip B'den daha fazladır. Ancak son yıllarda AIDS'liler ve diğer bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler arasında serotip B'nin insidansı artmıştır [22].

Mannoproteinlerin hem karbonhidrat hem de protein kısımlarına karşı bağışık yanıt oluşur. Kandida'ya karşı oluşan hücresel bağışıklığın temel hedefi mannoproteinlerdir ve bu protein başlıca T hücre uyarandır. Hücre duvarında bulunan mannan infeksiyon sırasında

duvardan ayrılır, immunglobülin ile birleşir ve dolaşımdan uzaklaştırılır; fakat bağışık yanıt yetersizse mannan antijenemisi oluşur.

2.5.4.Kandidaların Virulans Faktörleri

Bu güne kadar saptanmış virulans faktörleri şöyledir; germ tüp, proteaz, fosfolipaz, yüzeye yapışma kapasitesi (biyofilm oluşturma) hidrofobisite, morfolojik dönüşüm, ilaç direnci, dimorfizm[25].

- *Aderans*

Kandidaların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun ilk aşamasıdır. Yapışma sırasında ortamın yüzey özellikleri de etkilidir.

Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği: Hidrofobik moleküllerin varlığında negatif yüklü yüzeyler birbirini çekerler.

Yüzey adezinleri: Konak dokunun epitelyum ve endotel hücrelerine tutunmayı sağlayan moleküllerdir.

İC3b reseptörü: Konak hücre yüzeyinde arginin – asparagin - glisin yapısındaki reseptöre tutunur.

C3d reseptörü: Komplemanın C3d komponenti için reseptör görevi görür. Özellikle plastik yüzeylere tutunmada önemlidir.

Fibronektin reseptörü: *C.albicans* ve *C.tropicalis* türleri bu reseptörle subendotelial Ekstraselüler matriks proteinlerine tutunur.

Östrojen reseptörü: Vaginal kolonizasyonu artırır. Östrojenin vagen epitelinde glikojeni artırıcı etkisi de kolonizasyona katkıda bulunur.

Laminin reseptörü: Bu reseptörle aort ve mikrovasküler endotele tutunurlar. Bu reseptör sadece *C.albicans*'ın germ tüp ve hif formlarında saptanmıştır.

Fibrinojen bağlayan proteinler: *C.albicans*'ın germ tüp ve hif formlarında bulunan bu reseptörler böbrek ve üretral epitele tutunmayı sağlarlar.

ALS proteinleri(aglutinin-like sequence): Yanak epiteline ve fibronektine tutunmayı sağlarlar.ALS1 proteini özellikle infeksiyonun erken döneminde maya hücresinin ağız mukozasına tutunmada rol oynar.

- *Çimlenme Borusu*

Çimlenme borusunun ağız epiteline daha iyi bağlanmayı sağladığı, buna karşın boru oluşumunun baskılanmasının bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir.

Çimlenmiş hücrelerin dokuya blastosporlardan 50 kez daha fazla yapıştıkları, en iyi hifli şeklin bağlanabildiği, çimlenme borusunun ise ek olarak fibrilli yüzey tabakaları meydana

getirdiği ve bundan dolayı çimlenmiş hücrelerin daha fazla bağlanma gösterdikleri bildirilmiştir[36].

- *Salgısal Aspartil Proteinazlar*

Asit pH'da ve nitrojen kaynağı olarak bir protein varlığında salınırlar. *C.albicans* kökenlerinin çoğu ve daha az olarak ta *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenlerince salgılanır. Proteinaz serum albümini, hemoglobini, kolojen, laminin, fibronektin, IgA, IgG'nin Fc kısmı ve komplemanın C3 komponentini hidrolize ederek invazyonu sağlar.

- *Fosfolipazlar*

Ekstraselüler fosfolipazlar membran lipitlerinden fosfolipazları hidrolize ederek, konak hücre membranında hasara yol açabilirler. Bu durum mayanın bir taraftan çoğalmasını sağlarken, diğer yandan konak dokusuna invaze olmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda kandan izole edilenlerde ve *C.albicans*'ta non-albikanslara göre fosfolipaz aktivitesinin daha fazla olduğu belirtilmektedir[37]. İbrahim ve ark.ları kandida virülansında fosfolipazların rolünü saptamak için kandan izole edilen *C.albicans* ile sağlıklı kişilerin ağız izolatlarını karşılaştırmışlar ve kan izolatlarında fosfolipaz üretimini anlamlı derecede yüksek bulmuşlar ve çalışılan virülans faktörlerinden sadece ekstraselüler fosfolipaz aktivitesini mortaliteyle ilişkili bulmuşlardır[38].

- *Slime üretimi*

Kandidalar damar içi kateterler ve diğer medikal araçların yüzeyi ile temas ettiklerinde kompleks bir polisakarit yapı olan slime adlı enzim salgırlar. Slime yardımı ile yabancı yüzeye yapışarak, diğer konak kaynaklı hücreler ve protein yapılarla birlikte bir film tabakası oluştururlar. Biyofilm içinde ideal bir ortam oluşmuşsa mikroorganizmalar arasında ektrakromozomal DNA (plazmid) transferi olabilir. Planktonik hücreler ve daha büyük hücreler arasında konjugasyonla plazmid transferi olabilir. Ghigo'nun çalışmasında *E.coli*'nin F pilusunun transferi üç boyutlu biyofilm içinde gösterilmiştir[39]. Plazmid transfer edilen suşlar biyofilm oluştururken, plazmid olmayan suşların sadece mikrokoloni oluşturduğu görülmüştür. Plazmidler antimikrobiyallere karşı direnç gelişmesini, biyofilm içinde direncin yayılmasını ve dirençli suşların seçilmesini sağlarlar. Bu nedenle biyofilm tabaka içindeki mikroorganizmalar tedavi güçlüğüne[40] ve antifungal direnç gelişimine neden olurlar. Slime üretimi türler arasında da farklılıklar gösterir[30, 37, 41].

2.6. KANDİDA ENFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ

Kandida türleri normal floranın bir parçasıdır. Popülasyonun %40-50'nin gastrointestinal kanalında geçici ya da kalıcı olarak bulunur. Balgamda, kadın genital yolunda ve foley kateteri takılan hastaların idrarında bulunur. Doğumdan hemen sonra yenidoğanın

ağız, barsak ve genitoüriner bölgesine kolonize olur. Oluşan infeksiyonlar genellikle endojen kaynaklıdır[20]. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle endojen florada meydana gelen değişiklikler sonrası *Kandida* türleri cilt ve mukozalarda da çoğalırlar[42]. Yoğun bakımda kalış süresi uzayan hastalarda oluşan kolonizasyon, kandidiyazis gelişimini kolaylaştırır[43]. Risk faktörlerine maruz kalınması da sekonder hematogen yayılıma neden olur[44].

İnvaziv kandidiyazis ve kandidemi riskinin yoğun bakımda yatan hastalarda ortalama 12.7 yoğun bakım dışı hastane yatağında yatanlarda ise ortalama 15.5 günden sonra arttığı belirtilmektedir[45]. A.B.D ve Türkiye'deki nozokomiyal kan dolaşım infeksiyonları içinde *Kandida* türleri dördüncü sırada gelmektedir[46].

ABD'de yedi yıllık sürveyans çalışması sonuçlarına göre her 100.000 kan dolaşım infeksiyonunun (KDİ) 4.6'sını tüm KDİ'lerin ise %9 'u *candida sp* ile oluşturmaktadır. İnsidans ülkeler ve şehirlerarasında değişmektedir. Örn; Danimarka'da yılda 100.000 vakada 11 iken Finlandiya'da 100.000 vakada 1,9'dur[47]. Kandidalar KDİ ve derin doku infeksiyonlarında genellikle en sık dördüncü etken olarak görülmektedirler[48].

Sistemik kandidiyazisin en sık etken hala *C.albicans* olmasına rağmen, non-albicans türler arasında *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* ilk üç sırada yer almaktadır[48].

Yapar N ve ark.nın çok merkezli olgu-kontrol çalışmasında 1 yıllık periyod içinde 83 hasta da 83 kandidemi saptanmış olup tür dağılımı da %45.8 *C.albicans* %54.2' si *non-albicans* şeklindedir[3].

Yine Yapar N ve ark.nın 2000-2004 yılları arasında kandida türleri ile ilişkili kan dolaşım infeksiyonlarını izledikleri çalışmalarında dört yıllık ortalama kandidemi insidansı 1000 hastaneye başvuruda *C.albicans* için 0.32 albicans dışı kandida türleri için 0.24 olarak saptanmıştır[49].

Aslan ve ark.nın çalışmalarında 3 yıllık kandidemi oranı %1.07 olarak bulmuşlar ve tür dağılımını da %51.5 *C. albicans*, %48.5 *non- albicans* kandida türleri olarak saptanmıştır.

İnan D ve ark. nın ünitelerindeki iki farklı dahiliye ve cerrahi yoğun bakımda yaptıkları iki yıllık sürveyans çalışmasında nozokomiyal KDİ sıklığını, ventilatör ilişkili pnmoni ve üriner kateter ilişkili infeksiyondan sonra üçüncü sıklıkta saptanmıştır. SVKİKDİ hızı 1000 kateter gününde 8.16 ve 10.48, kateter kullanım hızı da 0.78 ve 0.81 olarak bulunmuştur. Hızların yüksek olmasını hastanenin bölgelerinde referans hastanesi olması, eğitim hastanesi olması ve ciddi hastalıkları olan hastalar olmasına bağlamışlardır[50].

Gürcüoğlu E ve ark.nın 1996-2007 arasındaki çalışmalarında kandidemi insidansı 1.9/1000 ve 10.000 hasta gününde 2.9 epizot olarak bulunmuş ve tür dağılımı da *C. albicans*

(%45), *C. parapsilosis* (%26), *C. tropicalis* (%7), *C. krusei* (%7) ve *C. glabrata* (%3.5) şeklinde sıralanmıştır[51].

C.parapsilosis önceden kolonizasyon olmadan invaziv hastalık oluşturma yeteneğine sahiptir ve sıklıkla horizontal geçiş gösterir. Geçiş kontamine yüzeyler, medikal araçlar, sağlıkçıların elleri ve kontamine sıvılarla olur. Hiperalimentasyon sıvılarında çoğalabilme yeteneği ve intravasküler kateterlerle protezlere olan afinitesi patogenezinde önemlidir. Ayrıca fungal endokarditlerin en sık etkenidir[52].

C.glabrata sıklıkla nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarına neden olur. Azol kullanımı ve kinolon kullanımının riski artırdığı gösterilmiştir[53].

C.tropicalis immunkopromize hastalarda oral mukoza ve gastrik mukozadan penetre olarak dissemine hastalık oluşturur. Kanıtlanmış *C.topicalis* ve *C.albicans* kültür pozitifliği olan hastaların otopsielerinde alınan GIS örneklerinin hepsinde aynı etken tanımlanmıştır. Bu da endojen infeksiyonu göstermesi açısından önemlidir. Özellikle hematolojik maliniteli nötropenik hastalarda GIS kolonizasyonu ve mukozal penetrasyon kandidemi patogenezinde önemli yer tutar[54].

2.7. KANDİDA ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZEZİ

Mantarların hastalık yapıcı özellikleri ile konağın duyarlılığı arasındaki ilişki, kommensal olarak yaşayan mantarların konak immünitesi bozulduğunda meydana getirdiği hastalıkları anlamak açısından önemlidir.

İnvaziv kandida infeksiyonu gelişen tüm hastaların önceden kolonize hastalar olduğu gösterilmiştir[43]. Bu da hastalık patogenezinde kolonizasyonun önemini açıkça göstermektedir. Perine, eller, vücudun katlantı bölgeleri ile vulvovaginal bölgeler gibi nemli bölgeler, cilt ve mukoza kolonizasyonun sık olduğu bölgelerdir.

Bağışıklık sistemi sağlıklı laboratuvar hayvanlarında deneysel kandidiyazis oluşturmak zordur. Bunun için deney hayvanlarının dokularında travma oluşturulması, radyasyon verilmesi ya da bağışıklığının bozulması gereklidir. Deneysel orofaringeal kandidiyazisde prognozu etkileyen dört hücre tespit edilmiştir. Polimorfonükleer lenfositler, mononükleer lenfositler, CD4+ ve CD8+T lenfositleri.

Ancak sadece yüzeyinde CD11b ve CD18 belirteci taşıyan lenfositler anti - kandidiyal özellik taşırlar. Bu lenfositlerin yüzeyinde *Mac-1*(macrophage-1 antigen) reseptörleri bulunur. Bu reseptörlerle kandidalara bağlanırlar. Konak dokuya adezyonu sağlayan *N-acetylglucosamine* ve β -glukan enzimlerini salgılayan kandidalar lenfosit - reseptör ilişkisini bloke ederler. Bu enzimleri salgılamayan suşlar mutanttır ve avirulandırlar. Enzim bloke edildiğinde epitele tutunma da azalır[23].

Kandida türlerinin invazyonunda, sağlam deri en etkili bariyerdir. Cildin bütünlüğünü bozan herhangi bir durum sonrasında lamina propriyaya ulaştıktan sonra lenfatiklerde ve kan damarlarında serbest olarak ya da makrofaj içinde saptanabilmektedir. Benzer şekilde, gastrointestinal mukoza, kandida türlerinin dolaşım sistemine invazyonunu önlemede mekanik bariyer görevi görür. Gastrointestinal sistemde kolonize olan maya hücreleri mukozayı penetre ederek dolaşıma geçerlerse endojen kateter infeksiyonuna neden olurlar[55]. Bir diğer lokal koruyucu mekanizma, *Kandida* türleri ile yarışmaya giren normal barsak bakteri florasıdır. Antimikrobiyal ajanlar, gastrointestinal kanaldaki bakteriyel mikroflorayı elimine ederek mantarların seçilip çoğalmasına ve sonuçta, hastanede yatan hastada invaziv hastalık oluşumuna yol açarlar.

Epitel hücresi ile bağırsaktaki flora arasında iletişimi sağlayan iki önemli reseptör ailesi vardır. *Toll-like reseptör (TLR)* ailesi ve *Nucleotide oligomerisation domain (NOD)* reseptör ailesi. Bu iki grup inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev alır. Aktifleşmeleri ile immün yanıt başlar[55].

Konağın hücresel immünitesi, invazyona karşı oldukça etkili ikinci bir yoldur. Maya hücreleri bariyerleri aşip kan dolaşımına geçtiğinde, savunmada psödohiplere hasar verme, blastosporları fagosit etme ve öldürme kapasitesine sahip polimorfonükleer lökositler rol oynarlar[56]. Hematolojik hastalığa ya da ilaçlara sekonder gelişen nötropenik hastalarda invaziv kandidiyazise gelişmesi, savunmada PMNL'lerin önemli rol oynadığını desteklemektedir. Nötrofil ve monositlerde, miyeloperoksidaz ya da hidrojen peroksit gibi süperoksitlerin eksikliği *C. albicans*'ın öldürülmesini engeller.

C.albicans'ın komplemanı alternatif yoldan aktive ettiği gösterilmiştir. Kompleman faktör 3 ve faktör B opsonizasyonda görevlidir ve in-vitro ortamda blastosporların opsonizasyonu için gereklidir[57].

Tümör nekrozis faktör α (TNF α), İL-6 gibi sitokinler ve intraselüler adezyon molekülü-1(ICAM-1) gibi adezyon molekülleri hematojen kandidiyazise karşı konak savunmasında rol oynarlar[58].

Kandidaların konak dokulara yapışma ve yabancı cisimlere implante olma yeteneği kolonizasyon ve hastalık oluşma sürecinde önemli faktördür.

2.7.1.Biyofilm Oluşturmaları

Biyofilm, ekzopolisakkarit matriks içine gömülü, birbirine ve bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş mikroorganizma topluluğu olup gen ekspresyon paternlerinde değişim, strese ve çevre koşullarına karşı direnç artışı ve bazı durumlarda hücrel farklılaşmada etkili olan bir yapıdır. Medikal aracın yerleştirilmesinden hemen sonra konak

proteinleri ve hücreleri medikal aracın çevresindeki idrar, kan, tükürük gibi vücut sıvısı ile birleşerek film yapısı oluşturur[59].

C.albicans biyofilm oluşumu üç safhada gerçekleşmektedir: Erken faz (0-11 saat), ara faz (12-30 saat) ve olgun faz (38-72 saat). Biyofilmdeki karbonhidrat miktarının erken fazdan olgun faza doğru arttığı ve olgun fazda karbonhidrattan zengin bir ekstraselüler matriks (ESM) olduğu saptanmıştır[17, 59].

Kateter materyalinden hazırlanan intravasküler disklerin yüzeyinde deneysel biyofilm oluşturulması ve scanning elektron mikroskopunda maya hücrelerinin adezyonunun üç-altı saat sonrasında germ tüp oluşumu ve 48 saatlik inkübasyon sonrası ise yoğun maya, hif ve yalancı hif ağından oluşan tam olgun biyofilm oluşumu gözlenmiştir[60].

Kandidaların yüzey üzerinde oluşturdukları biyofilm tabakası tablo 3'te görülen yöntemlerle incelenirler.

Tablo 3. Kandidaların oluşturduğu biyofilmin incelenmesinde kullanılan yöntemler

Model sistem yöntemi	Kantitatif ölçüm yöntemi	Biyofilm yapısının incelenmesi
Kateter disk	Kuru ağırlık ölçümü	Scanning elektron mikroskopi
Akrilik strip	İsotop ölçümü yöntemi	Confocal laser scanning mikroskopi
Mikrotitre plak	Tetrazolium tuzu reaktivatörü ile analiz yöntemi	Raman mikroskopi
Silindirik selüloz filtre	ATP bioluminescence yöntemi	

TRENDS in Microbiology Vol.11 No.1 January 2003

Organizmanın aynı besiyerinin sıvı veya agar formunda (glikozlu yeast nitrojen base) üretildiğinde hif formları oluşturmaması, morfogenezin plastik polivinilklorid (PVC) yüzeylere temas ile indüklendiğini ve bazal hücre katmanının biyofilm yapışmasında önemli rol oynadığını göstermiştir[59].

Yüzeyin hidrofobitesi de biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilemektedir. Silikon elastomer veya PVC disklerinin hidrofobik yüzeylerinde bifazik yapıda; bazal tabakada maya hücreleri ve bu tabaka üzerinde ESM içerisinde hif elementlerin sıralandığı, buna rağmen düzensiz veya pürüzlü 'polymethylmethacrylate' yüzeylerde olgun biyofilmin sadece maya hücreleri ve ESM'den oluştuğu gözlenmiştir[59].

Ortamdaki artmış glikoz miktarı da biyofilm oluşumunu hızlandırır[7, 17]. Özellikle total parenteral nütrisyona (TPN) alan hastalarda *C. parapsilosis*'e bağlı kateter infeksiyonlarında artış görülmesi buna örnek olarak verilebilir. Aynı çalışmada

kandidemilerden izole edilen albicans dışı kandida türlerinin *C.albicans'tan* daha fazla biyofilm oluşturduğu, *non-albicans* kandida türlerinin de kandan izole edilenlerin kan dışı örneklerdekinden daha fazla biyofilm oluşturduğu saptanmıştır özellikle (*C. parapsilosis*)[61].

Yabancı cismin yerleştirilmesinden sonra tükürük, mukus ve kan gibi vücut sıvılarındaki çeşitli makromoleküller (fibrinojen, fibronektin, kollojen ve laminin vb) cisim yüzeyinde birikerek öncü film tabakası oluştururlar. Mikroorganizmalar çıplak yüzey yerine bu film tabakasına tutunurlar. İlk adezyon gevşek ve geri dönüşümlü bir tutunmadır.Bu durum ekzopolimer üretimim ile sıkı bir tutunmaya dönüşür.Ekzopolimerler öncü film tabakasını sararak glikokaliks (slime) denen tabakayı oluşturur. Mikroorganizmalar bu slime tabakası içinde çoğalarak kalın bir film tabakasına neden olurlar.

Kandida türleri de ilk önce konak doku hücresi ya da medikal araç gibi yabancı yüzeylerde yüzey boyunca prolifer olmaya ve hif geliştirmeye başlar.Son aşaması da oluşan biyofilm tabakasının matürasyonudur.Bu aşamada maya hücrelerinin büyümesi baskılanır,hif gelişimi artar ve biyofilm tabakası ekstraselüler matriks tarafından kuşatılır.Son zamanlarda Quorum sensing (QS) çalışmaları ile *C.albicans* tarafından oluşturulan biyofilm tabakasının oluşum aşamalarında QS moleküllerinin rolü olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca adezyon dışında mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadırlar[62]. QS defektli mutant suşlarda oluşan biyofilmler gevşek olmakta, hidrojen peroksit ve nötrofillere daha duyarlı hale gelmektedirler[63].

2001 yılında iki araştırmacı grup, *C. albicans* süpernatantlarında hif gelişimini baskılayan “farnesol”adında bir molekül tanımlamışlardır[64, 65]. Farnesol, isoprenoid/sterol yolu (ergosterol sentezi) prekürsörüdür ve ara basamak olan farnesil pirofosfattan oluşur. Son zamanlarda *C.albicans'ın* quorum sensing ürünü olarak tanımlanmıştır[66, 67].

Farnesol 1-50 µM konsantrasyonda *C. albicans* suşlarına etki gösteren, besiyerinde bulunan sığır serum albümini ya da prolin N-asetil glukozamin gibi hif oluşumunu tetikleyen maddelerin varlığına rağmen miçel oluşumunu baskılayabilen bir sinyal molekülüdür. Ancak hif oluşumunu baskılayabilmek için yüksek konsantrasyonlara (10-250 µM) ihtiyaç duyulmaktadır[68]. Ayrıca hif oluşumunu baskılamının yanında hücreyi hidrojen peroksit karşı da korumaktadır[69].

Farnesolün *C. albicans'ın* biyofilm oluşturmasını bloke edebileceği düşünülmüş ve biyofilm içinde farnesolün birikimi kritik yoğunluğa ulaştığında biyofilmin dağılımında görev aldığı gösterilmiştir[70]. Farnesolün etkinliği konsantrasyon bağımlıdır ve 300 µM/1

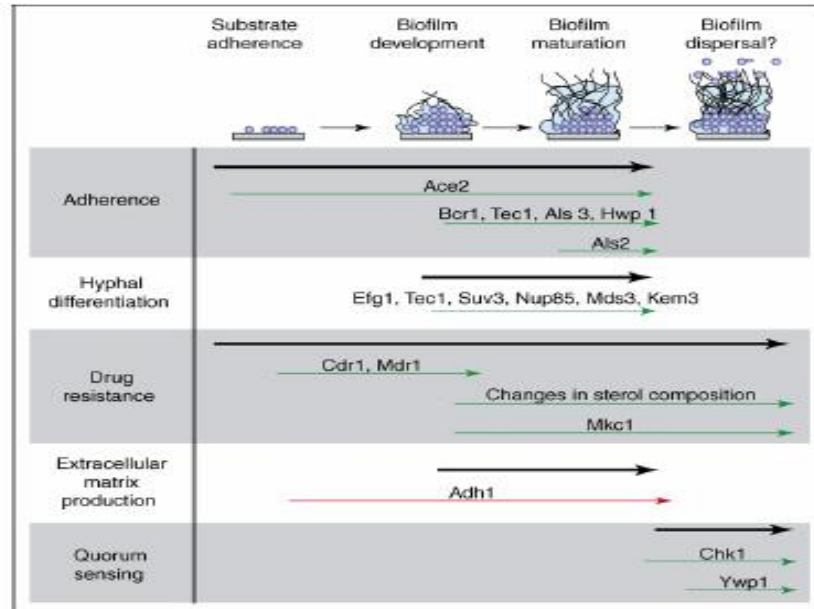
konsantrasyonda biyofilm oluşumunu tamamen inhibe edebilmektedir[66]. Mantar sonuçta farnesolün miktarını azaltıp artırarak biyofilm belli bir kalınlığa ulaştığında buradan parçaların koparak bir başka alana yerleşmesini gerçekleştirebilir.

Yapılan “*microarray*” çalışmalarında farnesolün 274 genin ekspresyonunu farklı şekilde değiştirdiği, 104 geni aktive ederken 170 geni aksi yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu genlerin germinasyon, ilaç direnci, hücre duvar sentezi, demir transportu, hücre yüzey hidrofobisite ve stres yanıtında görevli olması farnesol varlığında, *C. albicans*'ın biyofilmlerinde çok sayıda hücresel aktivitenin etkileneceğini düşündürmektedir[71].

Candida albicans'ın ürettiği ikinci QS molekülü bir tirozin derivativesi olan “thyrosol” dür[72]. “Thyrosol” farnesolün aksine hif oluşumunu arttırabilir. Böylece *C. albicans* farnesol ve “thyrosol” yardımı ile morfogenezini kontrol altında tutabilmektedir.

Kandidaların oluşturduğu biyofilmin antifungal dirence katkıda bulunduğu bilinmektedir. Direnç ekstraselüler matriks miktarı, yavaş üreme hızı ve besin kısıtlaması, membrana lokalize efluks pompalarının MDR1, CDR1 ve CDR2 genleri ile ekspresyonu ve biyofilm içindeki sterol miktarı ile ilişkilidir[60].

Şekil 3'te biyofilm gelişim aşamaları ve bu aşamalarda etkili olan genetik özellikleri görülmektedir.



Overview of *C. albicans* biofilm development. A timeline of formation and dispersal is depicted at the top of the figure. The categories listed at the side represent important processes in biofilm development; the adjacent thick black lines represent the phase(s) during which they are important to the biofilm life cycle. The thin arrows within each category represent the phase(s) the listed proteins or events contribute to the respective process. Green arrows represent a positive role of the genes or events indicated; the red arrow indicates a negative role.

Şekil 3: *C. albicans* biyofilm gelişim aşamaları

2.8. KANDİDEMI

Kandidalar, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan infeksiyonlara yol açabilirler.

Kandidemi, klinik olarak kan dolaşım infeksiyonunun belirti ve bulguları olan bir hastada en az bir kan kültüründe bir kandida türünün izole edilmesidir.

Kandidemi tanısı için;

1-Bir kan kültüründe bir kandida türünün üremesi ya da kandidiyal endoftalmit gibi histolojik olarak invaziv hastalığın dökümanite edilmesi

2-Farklı zamanlarda alınmış iki kan kültüründe *candida sp* üremesi ya da periferik kan ve kateterden aynı *candida sp*'nin üretilmesi.

3-Kateterden alınan kan ile periferden alınan kan kültürlerinde aynı kandida türünün üremesi gereklidir[73].

Tüm nozokomiyal KDI'lerin %9,5'ini kandidemiler oluşturmaktadır[48]. Kandidemi için atfedilen mortalite hızı yaklaşık olarak %40'lardadır.

Genel durumu düşkün, üremik veya kortikosteroid tedavisi alan hastalarda klinik belirti ve bulgu olmadan da kandan bir kandida türünün izole edilmesi anlamlı kabul edilmelidir ayrıca bu hastalarda pozitif kan kültürü elde edilemeyeceği de unutulmamalıdır. Çoğu hastada balgam, idrar, gaita ve deri gibi diğer bölgelerden izole edilemeyebilirler, çünkü sıklıkla vücudun diğer yerlerinde infeksiyon oluşturmadan KDI'ye neden olurlar.

Kandideminin sıklıkla görüldüğü hastalar maliniteli hastalar, komplike postoperatif hastalar, organ transplantasyonlu, yanık ya da düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlardır. Neoplastik grubun içinde de en sık akut lösemili hastalarda görülür. Genellikle kandidemi ile birlikte böbrek, beyin, karaciğer, dalak, göz gibi organlarda tutulabilir. Bu nedenle kandidemi olgularında sistemik tutulum açısından dikkatli olunmalıdır.

Kandidemi için konak faktörleri dışında da risk faktörleri tanımlanmıştır. Yapar N ve ark.nın çok merkezli olgu-kontrol çalışmasında tek değişkenli analizle kandidemi risk faktörleri olarak hastanede yatış süresinin uzaması, üretral ve santral kateter olması, antibiyotik kullanımı, yüksek Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) skoru, geçirilmiş SSS ve batin cerrahisi, eritrosit transfüzyonu ve TPN alması olarak saptanırken çok değişkenli analizle üretral kateter olması, önceki antibiyotik kullanımı, eritrosit transfüzyonu ve TPN alması kandidemi için bağımsız risk faktörü olarak saptanmıştır[3].

Cerrahi hastalarında kandida kolonizasyonunu gösteren çalışmada önceden uzun süreli antibiyotik kullanımı, yüksek APACHE II skoru ve kandida ile kolonizasyon kandidemi için

risk faktörü olarak saptanmış ve kolonizasyon indeksinin pozitif prediktif değerinin yüksek olduğu belirtilmiştir[73].

Kandidemi için gelişimi için risk faktörlerinden biri de azol profilaksisi olarak belirtilmektedir. Flukonazol profilaksisi alan grupla plasebo alan iki grubun karşılaştırıldığı çalışmada flukonazol alan grupta invaziv kandida infeksiyonu görülme oranı anlamlı olarak fazla bulunmuştur[5].

Kandidemi yönetiminde Infectious Diseases Society of America (İDSA) tarafından; var olan SVK'in çıkarılması, hemodinamik olarak stabil olan hastalarda flukanazol veya konvansiyonel amphoteresin B başlanması, hemodinamik olarak stabil olmayan ve azol grubu kullanımı sırasında kandidemi gelişen hastalarda konvansiyonel amphoteresin B başlanması ve ayrıca tüm kandidemi hastalarının tedavi edilmesi önerilmektedir. Antifungal tedaviye son pozitif kan kültüründen sonra 14 gün ve tüm klinik bulguların gerilemesine kadar devam edilmelidir[74].

2.9.KATETER ENFEKSİYONLARI

Birçok durumda kaçınılmaz olarak uygulanması gereken santral venöz kateterler başta yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere değişik ünitelerde, belirli amaçlarla (ilaç- sıvı uygulamaları, kan ürünleri, total parenteral beslenme, hemodinamik izlem, tetkik amacıyla kan alınması, hemodiyaliz uygulanması vb.) damar içine uygulanmakta ve uzun süre kullanılabilir. Hastalara sağladığı yararlar yanında mekanik veya infeksiyöz komplikasyonlar sebebiyle önemli mortalite ve morbiditeye neden olurlar. Kateterden başlayan bulaşma ile selülit, apse gibi lokal ya da bakteriyemi, endokardit, septik trombofilebit, metastatik infeksiyonlar (osteomyelit, artrit, endoftalmit, akciğer - beyin apsisi) gibi sistemik infeksiyonlar gelişebilir.

Kateterlerin özellikleri ve uygulama şekilleri de infeksiyona yatkınlığa neden olabilir. Kateterler boylarına göre uzun, orta, kısa; uygulama süresine göre uzun süreli (> 30 gün), kısa süreli; uygulama yerine göre periferik veya santral diye alt gruplara ayrılır. Kateter yapımında en sık kullanılan materyaller ise, silikon, poliüretan, polivinilklorid, polipropilen ve teflondur[75].

Kateterlerin yapıldıkları materyeller ve en sık kullanılan kateter tipleri tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir.

Tablo 4:Santral venöz kateterlerin yapıldıkları materyaller ve özellikleri

Materyal	Katılık	Trombojenite	Uzun süreli kullanım uygunluğu
Poliüretan	++	++	Evet
Hidromerle kaplı poliüretan	+	+	Evet
Polietilen	+++	+++	Hayır
Polivinilklorid	+++	++++	Hayır
Propilen	++++	++++	Hayır
Naylon	+++	+++	Hayır
Teflon	++	++	Evet?
Silikon	0	+	Evet

Poliüretan; karbamat bağlantıları ile birleştirilen organik üniteler zincirinden oluşan bir polimerdir. Tıbbi ürünlerden başka esnek ve esnemeyen köpükler, dayanıklı elastomerler ve yüksek performanslı yapıştırıcılar, sentetik fiberler, contalar, prezervatifler, halıların alt kısmı ve sert plastik yapımı gibi pek çok farklı alanda kullanılırlar. Poliüretan ürünlere çoğu zaman üretanlar da denir. Poliüretanlar ilk kez Alman bilim adamı Otto Bayer tarafından 1937 yılında sentezlenmiş ve diizosiyanatın, diol ile reaksiyonuyla elde edilmiştir. Eğer ortamda su da varsa diizosiyanatın bir kısmı diol ile polimerleşirken küçük bir kısmı da su ile gaz (karbondioksit) çıkışı reaksiyonu vererek gözenekli poliüretan yapıyı (köpük veya sünger yapısı) meydana getirir. Olgunlaşma süresi (24-72 saat) sonunda oldukça sağlam bir polimer yapı elde edilir. Daha sonraları diollerin yerini daha büyük molekül ağırlıklı, polieter veya poliester yapısındaki polioller almıştır. Bu şekilde oluşan poliüretan daha sağlam ve daha esnek bir elastomer oluşturur.

Polivinilklorür ve lateks yüzeyler, poliüretan ve silikon yüzeylerden daha fazla biyofilm formasyonuna neden olduğu için ayrıca daha sert ve trombojenik oldukları için medikal araç piyasasındaki kullanım alanları sınırlanmış, SVK üretiminde terk edilmişlerdir[17].

Silikon (Medical grade silicone rubber: Silastik = Polisiloksan = Silisyum + Oksijen bulunan polimerler) materyaller biyouyumlu materyallerdir. Silikon kateterler karbon, hidrojen ve oksijen içeren silikonla polimerleştirilmiştir. Non - reaktif, dış ortam şartlarına ve -55°C'le +300°C sıcaklığa dayanıklıdır. Bu özelliği ile medikal araç ve implantlarda,

elektronik araçlarda, pişirme, fırınlama ve gıda depolanmasında kullanılır. Yumuşaktır, trombonejenik özelliği ve kontaminasyon riski düşüktür.

Poliüretan hammaddeden farklı bileşimle üretilerek yeni kullanıma girmiş olan karbotan kateterler polikarbotan - üretan polimerlerinden yapılmıştır. Silikondan daha sert fakat poliüretandan daha fesnektir. Kolonizasyon ve trombojenite özelliği düşüktür.

Tablo 5: Kateter tipleri ve özellikleri

Kateter tipi	Özellik
Periferik arteriyel kateter	Kısa süreli kullanım içindir; hemodinamik durum ve kan gazı takibi için kullanılır. KDİ riski SVK'lere benzerdir
Tünelsiz kateter	En sık kullanılan SVK'dir. KİKDİ'nin %90'ının nedenidir; Uygulamada subklavyen, juguler veya femoral ven kullanılır.
Pulmoner arteriyel (Swan-Ganz) kateter tipi	Hemodinamik incelemeler için kullanılır. Kullanım süresi ortalama üç gündür. Kullanılan kateterler genellikle heparinlidir.
Basınç monitör sistemi	Sürekli kan basıncı izlemi için arteriyel kateter ile birlikte kullanılır. Epidemik ve endemik nozokomiyal KDİ'ye neden olur.
Santral periferik kateter	Periferik venlerden uygulanan ve vena kava süperiora ulaştırılan alternatif santral kateterdir. Tünelsiz SVK'lere göre daha az mekanik komplikasyona yol açar.
Tünelli SVK (Hickman-Broviac)	Uzun süreli kemoterapi, evde infüzyon tedavisi veya hemodiyaliz hastalarında kullanılır. Cerrahi olarak yerleştirilir, çıkış yerine kadar ciltaltında tünellenir ve deri çıkış yerinde Dacron "cuff", fibröz doku oluşumuna olanak sağlar ve kateter yüzeyine mikroorganizmaların migrasyonunu inhibe eder.
İmplant kateterler	Tümüyle implante edilmiş kateterdir. Deri altına yerleştirilen kateter ceplerine (port) septumdan sokulan iğne ile gerekli infüzyon yapılır; enfeksiyon riski düşüktür.

2.9.1. Kateter İnfeksiyonları Patogenezi

Kateter enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların çoğu cilt florasından kaynaklanır. İnfeksiyonların 2/3'den gram (+) koklar sorumludur. Bunlar arasında da *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilkoklar (KNS) en sık etkenlerdir. Katetere bağlı tüm bakteriyemilerin %50-75'ine neden olurlar (*S.epidermidis* %35-50, *S.aureus* %15-25).

Enterococcus sp. Corynebacterium türleri (özellikle *C.jejkeium*), *Propionibacterium acnes* diğer sık rastlanan gram pozitif bakterilerdir[48, 76]. Son yıllarda enterokoklar ve kandida türlerinin de sıklığı ve önemi giderek artmaktadır. Katetere bağlı bakteriyemilerin %15-30'nu gram negatif bakteriler oluşturur. Enterobacteriaceae üyeleri (*E. coli*, *E. cloacae*, *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp.*) ve nonfermentatif gram negatif çomaklar (*P.aeruginosa*, *Acinetobacter sp*, *S. maltophilia*) etkenler arasındadır *K. pneumoniae* ve *E.coli* gibi geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae üyeleri YBÜ'lerinde, yoğun bakım dışı ünitelere göre daha yüksek oranda KDİ'lerden sorumludur. Kateter tipleri ve takılma yerine göre etken sıklığı değişebilir[77]. KNS'ler bütün kateter tiplerinde en sık etkindir (%30-60), ama femoral santral venöz kateterde en sık etken gram-negatif çomaklar (Enterobacteriaceae ve *Pseudomonas sp.*) ve enterokoklardır.

İnfüze edilen sıvıların neden olduğu sepsislerde etken olarak sıklıkla Enterobacter, Citrobacter ve Serratia ile karşılaşılmaktadır. Bu etkenler oda ısısında %5 dekstroz içinde ve asidik pH'da ürerler. Kandidalar protein içeren sıvılarda ve lipid emülsiyonlarında oldukça hızlı ürerler[78].

KDİ gelişimi patogenezinde 5 mekanizma önemli rol oynar. Bunlar;

Aseptik tekniklere uyulmamasının ardından kateterin kontamine olması, deri florasında bulunan mikroorganizmaların dış yüzey boyunca migrasyonu, hub kontaminasyonu, infüzatın kontaminasyonu ve sonunda da hematogen yayılımla uzak odalarda infeksiyon gelişmesi sayılabilir[79]. KDİ gelişimi için gerekli olan diğer faktörler de kateterin yapıldığı materyalin cinsi, kateter tipi, kateter bakım kalitesi, hastanın özellikleri ve mikroorganizmanın intirinsik virülans faktörleridir[79, 80].

Lateks ve silikon kateterler PVC kateterlerden daha üstündür[7]. İn vitro çalışmalar, PVC veya polietilenden yapılmış kateterlerin, teflon, silikon elastomer veya poliüretandan yapılmış kateterlere göre, mikroorganizmaların aderansine daha az dirençli olabileceğini göstermiştir. Teflon ve poliüretan kateterler, PVC ve polietilen kateterlere oranla daha az infeksiyöz komplikasyonla ilişkili bulunmuştur[79]. Kandida türleri PVC kateterlere teflon kateterlerden daha fazla aderans gösterir. Stafilokokların da teflon kateterlere PVC kateterlerden daha fazla kolonize olduğu rutin kültür yöntemleri ile gösterilmiştir[81]. İrregüler yüzeye sahip kateterlere bakteri aderansı daha fazla olur. (Koagülaz negatif stafilokok ve *P. aeruginosa gibi*) Bazı kateter materyallerin daha trombojenik olması kateterin mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonuna neden olur dolayısı ile KDİ riski artar. KİKDI'da postmortem incelemede mural hemoroji, trombüs, kalsifikasyon, ülser ve inflamasyon gibi vasküler patolojiler görülür[82].

Kateter tipleri ve infeksiyon sıklıkları tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Kateter tipleri ve infeksiyon sıklığı

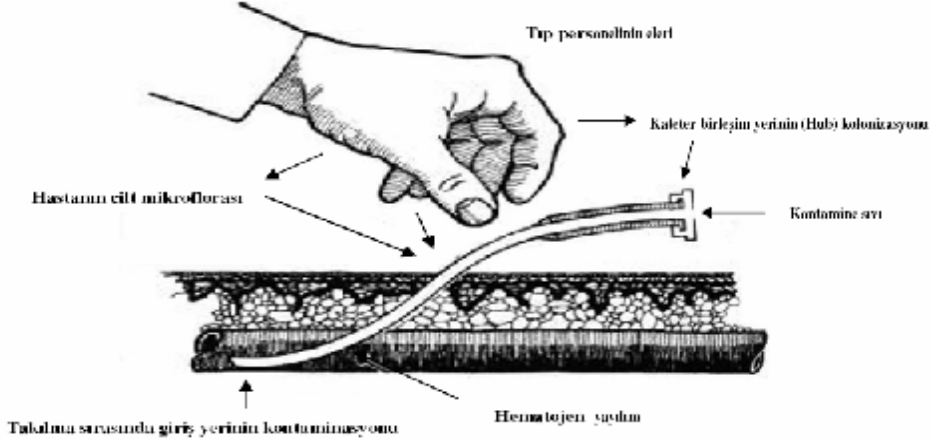
Kateter tipi	İnfeksiyon insidansı (%)
Periferik IV kateter	0.2-0,5
Geçici SVK	3.8-12,0
TPN kateteri	7.0-10,0
Hickman, Broviac kateteri	1.0-2,0
Multilümenli kateterler	12.8
Subklavian hemodiyaliz kateteri	10.0-20,4

Mikroorganizmalar katetere kateter giriş yerinden, kateter birleşim yerinden (hub), kontamine infüzyon sıvılarından veya başka yerdeki infeksiyon odağından hematogen yolla gelirler. Bunlardan kateter giriş ve birleşme yeri en sık giriş yerini oluşturur. Kısa süreli tünelsiz kateterlerde infeksiyon kaynağı çoğunlukla kateter giriş yeridir ve kateter giriş yerindeki mikroorganizmalar kateter dış yüzeyi boyunca ilerleyerek kateter ucuna ulaşıp KDI'ye neden olur. Tünelsiz kısa süreli kateterlerle ilişkili KDI'nın ekstraluminal yüzeyden ve deri florasından kaynaklandığı gösterilmiştir. Safdar N ve Magi DG'nin çalışmasında KDI gelişen hastalarda kateter yüzeyinden üretilen mikroorganizmalarla giriş yeri, cilt, hub, infüzyon sıvısı ve kandan izole edilen mikroorganizmalar arasında DNA subtipleri uyumlu bulunmuştur[83]. *C.parapsilosis*'in neden olduğu salgında kan kültürlerinden izole edilen *C.parapsilosis* DNA'sı ile kateter giriş yerinden alınan sürveyans kültürlerinden üretilen *C.parapsilosis* DNA'sı benzer bulunmuştur. Kısa süreli tünelsiz kateter ile ilişkili bakteriyemileri engelleyebilmek için kateter kalış süresinin 8 günden az olması gerekmektedir[83].

Hubun kontaminasyonundan dolayı kateter lümeni kolonize olmasıyla kateter infeksiyonu gelişir[84]. KNS bakteriyemisinin endemik olduğu ünitelerde (Hub kolonizasyonu sık) hubun etkili şekilde korunduğu randomize çalışmalarda, kültür pozitif hub, intraluminal kolonizasyon ve kateter ilişkili sepsis hızında düşme olmuştur. Sonucunda bakterilerin ana giriş kapısının hub olduğu söylenmiştir[85]. Salzman MB ve ark.nın deneysel çalışmasında dezenfektanla muamele edilmiş kateter hublarında kolonize olmuş mikrobiyal yükün (*S.epidermidis*, *P.auriginosa* ve *C. parapsilosis*) azaldığı, %70 etanolün %2'lik klorheksidinden daha koruyucu ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır[86]. Kalıcı SVK'lerde manüplasyon ve kullanma sıklığının daha fazla olması sonucu kateter birleşme yerine

genellikle sağlık çalışanlarının ellerinden bulaşan mikroorganizmalar, kateter iç yüzeyi boyunca ilerleyerek KDI'ye neden olur[87].

Katetere mikroorganizmaların ulaşma yolları şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4: Mikroorganizmaların damar-İçi katetere giriş şekli

Kateterin girdiği yerde deri bütünlüğü bozulmuştur; burası, deri florası bakterileri ve bakım yapan sağlık personelinin eliyle taşınan mikroorganizmalarla veya uygulanan bazı antiseptiklerle kontamine olur. Kontaminasyon, kateteri takma anında veya daha sonra oluşabilir. Kateter ucu etrafında trombus oluşması, kolonizasyon ve infeksiyon gelişiminde önemlidir[77]. Kateteri çevreleyen trombusün infekte olması (süpüratif filebit) bu tip infeksiyonların en ağır şeklidir. Konak deri bariyerini bozan ve yabancı cisim etkisi gösteren kateter, bir inflamatuvar cevap oluşturur ve kateter giriş yerindeki bu inflamasyon bölgesine gelen makrofajlardan değişik enzimler salgınır (hidrolaz, tümör nekroz faktör, kompleman parçaları, interlökinler, prostaglandinler, plazminojen aktivatörü, koagülasyon faktörleri gibi). Kateter yüzeyleri konak kaynaklı immünglobulinlerle birlikte fibronektin, fibrin ve kollajen gibi plazma ve matriks proteinleri ile oluşturulan bir biyomateryalle kaplanır. Özellikle deri florasından bulaşan bakteriler veya hematojen yolla ulaşan bakteriler bu biyofilme yapışınca infeksiyon başlamış olur. Kateter yüzeylerini kaplayan ve biyofilm olarak adlandırılan madde (fibronektin, kollajen, fibrinojen gibi konak proteinleri, mikroorganizmalar ve bunların oluşturduğu ürünler), kateter infeksiyonunu başlatmada önemlidir[78].

2.9.2. Kateter İnfeksiyonları Epidemiyolojisi

Hastane kökenli primer kan dolaşım infeksiyonlarının %85'ini kateterlere bağlı infeksiyonlar oluşturmaktadır[2, 88].

Santral venöz kateter ilişkili kan dolaşım infeksiyonu (SVKİKDİ) hızları 1970'den beri National Healthcare Safety Network (NHSN) tarafından raporlanmaktadır. NHSN 2009 raporuna göre laboratuvar tarafından medikal YB'lerde kanıtlanmış SVKİKDİ hızı toplam

ortalaması 2.6 olup bunların %4.3'ü %90 persentilde yer almaktadır. Aynı YB'lerde kateter kullanım hız ortalaması 1000 hasta gününde 0.61 olarak belirtilmiş ve bu değerin 0.79'unun %90 persentilde bulunduğu belirtilmiştir[89].

Hastaneler arası karşılaştırma yapabilmek için 100 hastada gözlenen infeksiyon sayısı yerine, araç kullanım gününe göre belirlenmiş kateter ilişkili hızların kullanılması daha sağlıklı olur. Kan dolaşım infeksiyon hızları hastane büyüklüğüne, servise ve kateterin tipine göre değişkenlik göstermekle birlikte 1990'lı yıllarda %2.5-%6.5 olarak belirtilmiştir. KİKİDİ hızları hastalığın ağırlığı ve tipi (örn; üçüncü derece yanık-post kardiyak cerrahi gibi) ile ilgili parametrelerden; kateterin takılma koşulları (örneğin elektif-acil) kateter tipi (örneğin; tünelli-tünelli olmayan veya subklavyen-juguler) gibi kateterle ilgili parametrelerden ve sağlık çalışanlarının el yıkama alışkanlığı gibi hastane ile ilgili parametrelerden etkilenebilir[2]. Grothe C ve ark.nın yaptığı çalışmada hemodiyaliz hastalarında bir yıllık kateter infeksiyonu insidansı %60.2 olarak bulunmuştur[90]. Doğru A ve ark.nın çalışmasında cerrahi yoğun bakım ünitesinde kateter ilişkili infeksiyonlar içinde kateter infeksiyon hızı 1000 kateter gününde 11.8 bulunmuştur. Aynı çalışmada SVK kullanım hızı National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)1992-2004 ve National International Nosocomial Infection Control Consortium (INNISCC) 2002-2005 verilerine göre daha yüksek ve SVKİKİDİ oranı da NNIS verilerine göre yaklaşık 3 kat fazla bulunmuştur[46]. Katetere bağlı kan dolaşım infeksiyonları uzun süre hastanede kalmaya ve önemli bir maliyet artışına neden olur [91]. Kritik hastalarda atfedilen mortalite oranı %2 ile %25 arasında değişir[76]. Mermel ve ark.nın çalışmasında katetere bağlı bakteriyemi oranı 1.000 kateter gününde 5.3 ve her infeksiyon için ek maliyet 3700\$- 29 000\$ olarak bildirilmiştir. SVK kullanımına bağlı olarak yılda yaklaşık 2400-20.000 hastada komplikasyon geliştiği bildirilmektedir[88].

Belirtilen risk faktörleri hastaneler arası metodolojik farklılıklar nedeni ile retrospektif ve epidemiyolojik çalışmalarda farklı şekilde tanımlanabilmektedir. Bunlardan hasta deri florasının değişmesi, antimikrobiyal tedavi alması, hastane personelinin elinin epidemik suşla kolonize olması en yaygın olanlarıdır. Kateter boyu ile infeksiyon riski de korelidir. Benzer şekilde lümen sayısı arttıkça infeksiyon riski artar[92]. Kateterin hem takılması hem de bakım işlemleri infeksiyon riski taşır. Özellikle ehil olmayan kişiler tarafından takılan kateterlerde [103] ve asepsinin suboptimal olduğu acil koşullarda takılması durumunda infeksiyon riski artar[77].

SVKİKİDİ ile ilgili risk faktörleri tablo 7'de görülmektedir.

Tablo 7. SVKİKDİ ile ilgili risk faktörleri

Granülositopeni
İmmünesüresif kemoterapi
Deri bütünlüğünün bozulması (yanık, psöriasis gibi)
Altta yatan ciddi hastalık olması
Diğer vücut bölgelerinde aktif infeksiyon olması
Hasta deri florasının değişmesi
Koruyucu sağlık bakımının yetersiz olması(el yıkama gibi)
Kullanılan merhem ya da kremlerin kontamine olması
Kateter yapısı ya da bileşimi ile ilgili faktörler: <ul style="list-style-type: none">• Yumuşak/sert• Trombojenik• Mikrobiyal aderans ya da biyofilm oluşturma özelliği
Kateterin boyutu
Lümen sayısı
Kullanım nedeni
Kateter kullanım stratejileri
Kateter tipi (plastik>çelik)
Kateterin lokalizasyonu: <ul style="list-style-type: none">• Santral>perifer• juguler>femoral>subklaviyan• Alt ekstremit>üst ekstremit
Kateterin takılma şekli: (cutdown>perkutan)
Kateterin kalma süresi (12 saatten uzun>12 saatten kısa)
Acil takılması>elektif takılması
Cerrahın becerisi (uzman olmayan kişiler>kateter ekibi)
Sağlık personeli bakımındaki değişiklikler: Yetersiz hemşire - hasta oranı > düzenli, kayıtlı hemşire - hasta oranı

2.9.3. Kateter infeksiyonları tanısı

Kateter ilişkili bakteriyemi tanısı genellikle klinik bulgular ve kan kültürü sonucu ile konmaktadır. Kateter ilişkili sepsis tanısı çoğu kez sepsis kaynağını açıklayacak kateter

dışında odak olmaması, kültürde cilt florasında olan bir mikroorganizmanın (KNS, propionibacterium, micrococcus, bacillus sp) üremesi veya üşüme-titreme, ateş ve hipotansiyon gibi sepsis bulguları olan hastada *S.aureus* ve *candida sp* üremesi ile konulur. Kateter dışında odak bulunamadı ise şu kriterlere dikkat edilmelidir. Kateter giriş yerinde son iki cm'lik kısımda sıcaklık artışı, endürasyon ve lokal pürülan görünüm, antibiyotik tedavisi olmaksızın kateterin çıkarılması ile bulguların gerilemesi, kantitatif kültürle kateter ve kandan aynı etkenin üretilmesi[94].

Tanı için hastadaki lokal ve sistemik bulgular ile mikrobiyolojik bulgular birlikteliği gereklidir.

Mikrobiyolojik incelemeler

KDİ şüphesinde, hem tanıyı doğrulamak hem de etkeni ve onun direnç durumunu belirleyip akılcı bir antimikrobik tedavi uygulamak için mikrobiyolojik çalışmalar zorunludur. Kateter giriş yerinde akıntı / püy varsa cilt antiseptisi ardından enjektörle aspire edilerek kültür örneği alınmalıdır. Kateter ilişkili bakteriyemi şüphesi varlığında eş zamanlı olarak kateter ve periferik kan kültürü alınmalıdır. Alınan kan kateter ile periferden de benzer hacimde (erişkinde 8-10 ml, çocuklarda 1-5ml) olmalıdır. Eğer kateter çekilerek ucu kültüre gönderilecekse giriş yeri çevresi povidon iyotla silinmeli, kuruması beklendikten sonra kateterin başka bir yere değmemesine dikkat edilerek çekilmeli ve distal üç-beş cm'lik kısmı steril petri kabında laboratuvara ulaştırılmalıdır. Çıkarılan kateter ucunun boyanarak, mikroskopik bakışının yapılmasının, hızlı tanıda yarar sağlayabileceği söylenmektedir.

Kan kültürü ya da kateter hubundan kan alırken cilt ya da hub alkol, iyot ya da klorheksidinle silinmeli kontaminasyon engellenmelidir. Eğer periferik venlerden kan alnamıyorsa 2 kan kültürü de kateterin farklı lümenlerinden alınabilir. Kesin tanı için en az bir kan kültüründe ve kateter kültüründe aynı etken üremelidir ya da iki kan kültüründe üreme ile birlikte KİKDI kriterlerinin olması gereklidir[95].

Tanıda uyulması gereken kriterler İDSA'nın kateter infeksiyonlarının tanı ve yönetimi ile ilgili 2009 kılavuzunda yenilenmiştir.

Kılavuzdaki öneriler kanıt düzeyleri ile birlikte tablo 8'de görülmektedir[95].

Tablo 8.İntravasküler kateter ilişkili infeksiyonların tanı önerileri

IDSA tarafından önerilen tanı yöntemleri	Kanıt düzeyi
Semikantitatif (roll-plate) yöntemle >15 cfu mikroorganizma ya da sıvı besiyerinde kantitatif yöntemle >10 ² mikroorganizma saptanması kolonizasyonu düşündürmeli	A-I

Sıvı besiyerinde kalitatif kateter kültür yöntemi önerilmemekte	A-II
İnfeksiyon şüphesi ile çıkarılan her kateterden rutin kültür önerilmemekte	A-II
Kısa süreli kateterlerde rutin roll-plate teknikle kültür yapılmalı	A-II
Giriş yeri eksudasından swabla alınan örneğin gram boyası ve kültürünün yapılması	B-III
Tünelli kateterlerde hub kültüründe ve semikantitatif giriş yeri kültüründe <15 cfu mikroorganizma üretilmesi durumunda KDİ kaynağı için kateterden uzaklaşmalı	A-II

Yapılan bir meta-analizde semikantitatif kültürün sensitivitesi %85 kantitatif kateter kültürünün sensitivitesi %94 olarak bulunmuştur[96].

Kateterle ilişkili infeksiyon tanımları tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 9. Kateterle ilişkili infeksiyon tanımları

Tanım	Özellik
Kolonize kateter	Eşlik eden klinik semptomlar yokken, semikantitatif veya kantitatif yöntemle kateter ucu veya kateter hubundan; semikantitatif kültürde ≥ 15 fazla koloni oluşturan birim (cfu), kantitatif kültürde ise $\geq 10^3$ cfu bakteri üremesi durumudur.
Filebit	Kateter takılı venin inflamasyonu olup, kateter çıkış yeri etrafında endürasyon, eritem, sıcaklık ve hassasiyet gelişir.
Çıkış yeri infeksiyonu	Kateter çıkış yerindeki deri kısmının • 2 cm kısımda kızarıklık, hassasiyet, şişkinlik, pürülan akıntı, ateş gibi bulguların olması veya kateter çıkış yerinden alınan aspirasyonda mikroorganizma üremesini ifade eder.
Cep(port) infeksiyonu	Tamamen implant edilebilen kateterin rezervuarı üzerindeki deride hassasiyet, eritem, endürasyon veya rezervuarı içeren deri altı cepte pürülan eksüdanın varlığıdır.
Tünel infeksiyonu	Tünelli bir kateterin (Hickman-Broviac) giriş yerinden >2 cm bölgede; deri altı tünel boyunca kızarıklık, ağrı, şişkinlik belirtileri yani selülit olması durumudur (KKDİ).
Kan akım infeksiyonu	KİKDİ bulguları (ateş, üşüme, titreme, hipotansiyon, taşikardi, lökositoz) olan ve başka infeksiyon odağı saptanamayan hastada, SVK ve periferik ven kanından benzer biyotip ve dirence sahip bakteri veya mantar üremesi. Tanıda aşağıdaki durumlardan biri olmalıdır:

	<ul style="list-style-type: none"> • Kateter ucunda yarı kantitatif kültürle ≥ 15 cfu, kantitatif kültürle $\geq 10^3$ cfu üreme olması • Kantitatif kültürlerde, kateterden alınan kanda olan üremenin, periferik venöz kana göre koloni sayısının 5-10 kat fazla olması, • SVK kanındaki üremenin perifer venden en az 2 saat önce olması
Septik trombofilebit	Ven içi kateter yerinde infekte pıhtı varlığı durumudur.

2.9.4. Kateter infeksiyonlarının yönetiminde genel ilkeler

Ampirik tedavi gram pozitif kok ve gram negatif basilleri kapsamalı, lokal antimikrobiyal duyarlılık ve hastalığın şiddeti göz önüne alınmalıdır. Buna göre 4. kuşak sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları ya da karbapenemler başlanmalıdır. Femoral kateter varlığında ampirik tedavi gram negatifleri ve kritik hastalarda kandida türlerini de kapsamalıdır. TPN alan, uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, hematolojik malinitesi olan, kemik iliği ya da solid organ alıcıları, femoral kateterizasyonu olan, birden çok alanda kandida kolonizasyonu olan hastalarda ya da septik hastalarda tedaviye antifungal eklenmelidir. Kateter ilişkili kandidemi şüphesi varsa ekinokandin ya da seçilmiş hastalarda flukonazol ile tedavi başlanmalıdır. Flukonazol, son 3 ayda azol türevi antifungal kullanmayan hastalarda ve *Candida krusei* ya da *Candida glabrata* riskinin çok düşük olduğu hastalarda kullanılmalıdır.

Kateterin çıkarılmasından (>72 saat) sonra persistan bakteriyemi ya da fungemisi olan hastalarda tedaviye dört-altı hafta devam edilmelidir. İnfektif endokardit, süpüratif trombofilebit ve pediatrik hastalarda gelişen osteomyelit olgularında tedaviye altı-sekiz hafta devam edilmelidir.

Uzun süreli (kaflı) kateterlerle gelişen infeksiyonlarda; şiddetli sepsis, süpüratif trombofilebit, uygun antibakteriyal tedavi ile 72 saatten fazla KDİ bulgularının devam etmesi durumunda ve *S. aureus*, *P. aeruginosa*, funguslar ya da mikobakteriler gibi etkenlerin varlığında kateter çıkarılmalıdır. Kısa süreli (geçici) kateter infeksiyonlarında ise *S.aureus*, enterokoklar, gram negatif basiller, funguslar ve mikobakterilerin etken olduğu durumlarda kateter çıkarılmalıdır[95].

2.9.6. KORUNMA

Kateter takılmadan önce ya da kateter örtüsünün değiştirilmesi sırasında cilt antiseptisi uygulanmalıdır. Bunun için %2'lik klorheksidin, iyot veya %70'lik alkole tercih

edilmelidir[87]. Mikrobiyal kolonizasyonu azaltması açısından klorheksidinin üstün olduğunu söyleyen çalışmalar vardır[88]. Steril örtü, steril önlük, maske, eldiven gibi maksimum bariyer önlemleri kullanılarak takılan kateterlerde, el yıkama, steril ediven, maske, bone gibi standart ekipman kullanılarak takılan kateterlere göre infeksiyon riskinin anlamlı derecede azaltılabileceği belirtilmektedir[97].Maksimal bariyer önlemlerine uyulmadan kateter takılan grupta infeksiyon %15.4 olarak saptanırken; maksimal bariyer önlemlerine uyulan grupta infeksiyon oranı %2.4 olarak bulunmuştur ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir[98].

Maksimal bariyer önlemlerinin yanı sıra antibiyotik kaplı kateterlerin kullanılması da infeksiyon riskini azaltabilir. Bunun için minosiklin, rifampisin, klorheksidin ve gümüş sülfodiyazin gibi antimikrobiyal ekili maddeler kullanılır. Rabih O ve ark. nın antimikrobiyal kaplanmış kateterlerle yaptıkları çalışmalarında rifampisin ve minosiklinle, klorheksidin ve gümüş sülfodiazin karşılaştırılmış. Hem kateter kolonizasyonu hem de KİKDİ'nunu önlemede rifampisin ve minosiklin anlamlı derecede etkili bulunmuştur[99].

Kateter bakımında kullanılan antibiyotikli merhemlerin (polimiksin, basitrasin, neomisin) etkinliği belirsizdir. Asıl kullanım amaçları profilaktik etki olmasına rağmen giriş yerinin kandida türleri ile kolonizasyonunu artırır. Bu nedenle antibiyotikli merhemler önerilmemektedir[100].

Kateter giriş yeri örtüsü için steril gazlı bez, transparan ya da yarı transparan örtü kullanılabilir[87]. Ancak giriş yerinin transparan örtü ya da klasik gazlı bezle kapatılmasının infeksiyonu önleme açısından birbirlerine üstünlükleri olmadığı belirtilmektedir[101]. Tüneli kateterlerde ise giriş yerinin kapatılmasına gerek yoktur[87].

Kateterin yerleştirildiği yer de infeksiyonu önleme ve/veya azaltmada önemlidir. Gözlemsel çalışmalara göre juguler ven kateterlerinde (JVK) subklaviyan ven kateterlerine (SkVK) göre riskin daha fazla olduğu söylenmektedir. Ancak SkVK'de noninfeksiyöz komplikasyonlar, femoral ven kateterlerinde (FVK)ise kolonizasyon riski fazladır. FVK'da derin ven trombozu riski JVK ve SkVK'den fazladır. Yani femoral kateter diğer vasküler yollara alternatif olarak kullanılmalıdır.

Kateter ilişkili infeksiyon ve kan dolaşım infeksiyon hızlarını azaltabilmek için özellikle YBÜ'de kateter takılma ve bakım işlemleri sırasındamaksimal koruyucu önlemlerin alınması ana hedef olmalıdır[93].

3.GEREC VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Düzeni

Kandidemi etkeni olan kandida türlerinin in-vitro ortamda ve farklı materyallerden yapılmış santral venöz kateter yüzeyinde biyofilm oluşturması ve biyofilm oluşumu ile yüzey farklılıklarının rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji B.D koleksiyonunda bulunan 2004-2009 yılları arasında kan kültüründen soyutlanarak stoklanmış olan suşlar kullanıldı. Koleksiyonda bulunan suşlar koloni morfolojisi, çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar, *CHROMagar Candida besiyerlerindeki* (Becton Dickinson GmbH®) görünümleri ve API 20C AUX (BIOME RIUX®) identifikasyon sistemi ile tanımlanmış ve tanımlama işlemlerinden sonra suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonda -80°C’de stoklanmıştır.

Çalışma için KİKDI’da en sık etkenin *C.albicans* olması ve bunu değişen oranlarda *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *C.glabrata*’nın izlemesi nedeni ile koleksiyondan bu dört tür seçildi. Seçilen 27 *C.albicans*, 18 *C.parapsilosis*, altı *C.glabrata* ve dört *C.tropicalis* suşları üç farklı kateter materyalinde biyofilm üretiminin gösterilmesi için çalışmaya alındı.

Slime üretimi için gerekli olan glikozlu saburoud dekstroz buyyon ve safranin, spektrofotometrede absorbans ölçümü için gereken MTT(Sigma®) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] ve scanning electronic microscopy incelemesi için gluteraldehit ve osmiyum tetra-oksit solusyonları hazırlandı.

3.2.Besiyeri ve Solusyonların Hazırlanması

Saburoud dekstroz buyyon hazırlanması: Hazır toz halinde satın alınan besiyeri (Oxoid®) 1litre distile suda 30gr çözüldürülmesi esasına dayanarak istenilen miktarlarda hazırlanarak otoklavda steril edildi.

Glikozlu saburoud dekstroz buyyon hazırlanması: Glikozlu distile su ile dilüe olacağı için distile suda çözüldürülmesi önerilen miktarın iki katı toz besiyeri çözdürülerek otoklavlandı. Otoklavda steril edilmiş distile suda (150 ml distile su 24gr glikoz) çözüldürülerek 42µ’luk steril filtre ile süzüldü. Sıvı buyyona ilave edilerek son konsantrasyonunda %8 glikoz içeren besiyeri elde edildi.

Elli milimol glikoz içeren saburoud dekstroz buyyon hazırlanması: Önerilen miktarın iki katı toz besiyeri içeren buyyon hazırlanarak otoklavlandı.1mM glikozun 0.180mg’a karşılık gelmesi hesabından yola çıkarak, dilüe olacağı göz önünde bulundurularak iki katı glikoz steril distile suda çözüldü. Steril filtre ile süzülerek buyyona ilave edildi.

%1'lik Safranin hazırlanması: 2.5gr toz safranin 100ml %96'lık etanolde çözüldürüldü. Hazırlanan ana stoktan 10 ml alınarak 90 ml distile su ile 100ml'e tamamlandı.

Fosfat tampon(PBS) hazırlanması: 8,0 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,15 gr Na₂HPO₄, ve 0,2 gr KH₂PO₄ distile suda manyetik karıştırıcı ile çözüldürüldü. Hazırlanan solüsyonun pH'sı, pHmetre ile ölçülerek 7.2 olarak ayarlandı.

MTT stok çözelti hazırlanması: Stok çözelti için 1ml PBS'te 5 mg toz halindeki MTT çözüldürülmesi esasına dayanılarak, kullanılması planlanan miktarlarda hazırlandı. Kullanmadan önce stok çözelti 1/5 oranında PBS ile dilüe edildi.

%2,5'luk Gluteraldehit tespit solüsyonu hazırlama (100 ml): 8 ml %25'lik gluteraldehit ile hazırlanan PBS'dan 92 ml eklenerek %2.5'lik gluteraldehit solüsyonu hazırlandı.

%1'lik Osmiyum tetroksit tespit solüsyonu hazırlama: Çeker ocak altında koruyucu önlemler alınarak içinde 5 ml soğuk distile su bulunan ışık geçirmeyen kahverenkli şişenin içine 0.1 gr'lık osmiyum ampülü hızlıca atılarak kırılması sağlanarak havan eli ile ezildi. Eşit miktarda PBS ile stok osmiyum tetraoksit solüsyonu karıştırılarak %1'lik solüsyon hazırlandı.

3.3. Örnek büyüklüğünün hesaplanması

Örnek büyüklüğü hesaplamada, de Silveria ve arkadaşlarının [109] çalışması referans alındı. Number Cruncher Stastical System (NCSS) Power Analysis Sample Size (PASS) programıyla %80 güç ve %5 yanılma düzeyi ile 3 grupta tek yönlü Kruskal Wallis Varyans analizi için örnek büyüklüğü hesaplandı. Çalışmaya alınacak her bir grup için iki olmak üzere altı örneğin yeterli olacağı bulundu. Ancak bakılacak materyal sayısının her bir tür için altı olmasının kısıtlılık oluşturacağı düşünülerek serbestlik derecesi [(degree of fredom =k-1) ((k=n)(n=grup sayısı))] iki ve %80 güçte 0.40 etki büyüklüğünde (conventionel effect size) en küçük örnek büyüklüğü için her tür kandida için her bir kateter türünden 21 kateter örneğinin toplamda üç kateter türünden toplam 63 kateter örneğinin çalışılmasının yeterli olacağı bulunmuştur.

Elde edilen dört kandida türünün her biri üç farklı kateter ile tek tek eşleştirildi. Her kandida türü için toplam 63,tüm türler için toplam 252 kateter örneği çalışılması gerektiği hesaplandı.

3.4. Biyofilm Saptanması

3.4.1.Plak yöntemi ile biyofilm çalışılması

-80°C'den çıkarılan suşlar saburoud dekstroz agar (SDA) (Oxoid®)'a pasajlandı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Son konsantrasyonunda %8 glikoz içeren saburoud dekstroz buyyon (SDB) (Oxoid®) hazırlandı. Her bir petri kutusuna 10 ml SDB konuldu ve her petriye

SDA'dan bir öze dolusu maya kolonisi alınarak sıvı buyyon içine ekildi. Plaklar 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilereki sıvı buyyon yavaşça döküldü ve iki kez 5 ml distile su ile nazikçe yıkandı. Yıkamanın ardından %2'lik safranin ile boyandı. Boya petrilere dökülmesinden 1 dakika sonra yavaşça döküldü ve fazla boyanın uzaklaştırılması için bir kez daha 5 ml distile su ile yıkanarak havada kurutuldu. Plakların kurummasının ardından makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi.

Makroskopik olarak kırmızı renkte olan plaklar biyofilm pozitif, kırmızı boyanmayanlar ise negatif olarak değerlendirildi.

Mikroskopik olarak ise tüm plaklar 40'luk büyütmede incelendi. Tüm alanları kaplayan maya hücrelerinin ve hiflerinin görülmesi biyofilm pozitif, bazı alanlarda nadir maya hücresi görülmesi ya da hiç maya hücresi görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

Tüm suşlar için farklı zamanlarda 2 kez biyofilm çalışıldı. Her iki çalışmada da makroskopik ve mikroskopik olarak biyofilm pozitif bulunan türlerden birer suş gelişigüzel seçildi. Seçilen dört suş kateter yüzeyinde çalışılmak üzere tekrar -20°C'de stoklandı.

3.4.2. Mikropalak yöntemi ile kateter yüzeylerinde biyofilm üretiminin saptanması

Silikon(Mahrurkar®), karbothan(MedCome®) ve poliüretan (MedCome®) materyalden oluşan 12 gauge çapında santral venöz kateterler kullanıldı. Kateterler her biri 0.5cm olacak şekilde kesilerek etilen oksitle sterilize edildi.

Seçilen kandida türleri -20°C'den SDA'ya pasajlanarak canlandırıldı. Üreyen koloniler kontrol amaçlı *chromogenic agar*'a ekilerek tür tayini doğruluğu teyit edildi. 24 saat inkübasyon sonrası üreyen kolonilerden tek koloni ekimi için tekrar SDA'ya pasaj yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi, steril ependorf içinde ml'de 10^7 maya hücresi içeren hücre süspansiyonu hazırlandı.

Her bir kandida türü için 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Kuyucuklara 0.5 cm'lik steril kateter parçaları konuldu. Kuyucuğa 60µl hücre süspansiyonu (ml'de 10^7 maya hücresi içeren) eklendi ve adezyon periyodu için 37°C'de bir saat inkübe edildi. Daha sonra adere olmayan hücrelerin uzaklaştırılması için pH 7.2 olan fosfat tampon ile üç kez yıkandı. Her bir kuyucuğa son konsantrasyonunda 50 mmol glikoz içeren SDB'dan birer ml konuldu ve 72 saat 37°C'de inkübe edildi. Biyofilm periyodundan sonra tüm kateterler pH 7.2 fosfat tampon ile üç kez yıkanarak biyofilmi oluşturan hücrelerin yüzeyde büyümesini sağlamak için MTT indirgeme reaktivatörü kullanıldı. Bunun için her birine 60µl MTT (ml'de 0.5 mg MTT içeren PBS'ten oluşan stok çözelti hazırlandı, işlem öncesi PBS ile 1/5 oranında dilüe edildi) eklendi. MTT ile birlikte 37°C'de beş saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile üç kez

nazikçe yıkandı ve kuyucuklara Dimethyl sulfoksida (DMSO) eklenerek spektrofotometrede 540nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

3.4.3. Scanning elektron mikroskopi ile biyofilm gösterilmesi

DMSO'nun uzaklaştırılması için üç kez PBS ile yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkama işlemi ile non-aderan hücreler uzaklaştırılarak biyofilmi oluşturan aderan hücrelerin kimyasal fiksasyonu için 60µl ml %2,5'luk gluteraldehit(Sigma®) eklenerek oda ısısında bir saat bekletildi. Tekrar edilen yıkama sonrasında son aşama fiksasyon işlemi için %1 konsantrasyonda hazırlanan osmiyum tetra-oxide (Sigma®) solüsyonu eklenerek bir saat oda ısısında bekletildi. Sonra PBS ile tekrar yıkanarak 40°C etüvde 30 dakika kurutuldu. Son olarak iletkenliği sağlamak için altınla kaplanarak JEOL 6060 scanning electronic microscopy (SEM)'le 500-1000-1500 ve 2000 büyütmede incelendi.

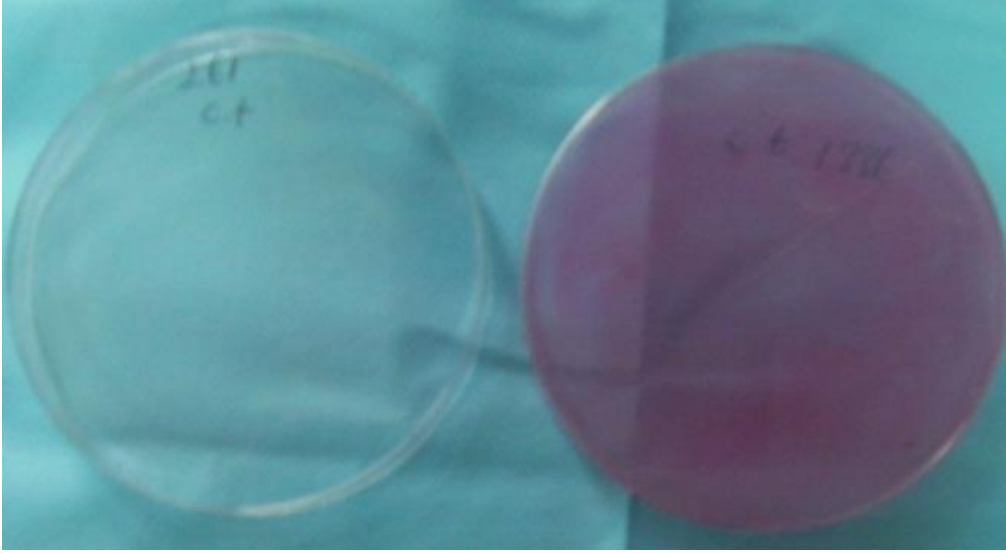
3.5. İstatistiksel analiz

Spektrofotometrede 540nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri Stastical Package for Social Sciences (SPSS 15.0 for Windows; SPSS, Inc, Chicago. IL) veri tabanına işlendi.

Üç farklı kateter yüzeylerine maya hücrelerinin yapışmasının ortalamaları arasında farklılık olup olmadığının belirlenmesi için $n < 30$ olması, parametrik olmayan koşulları sağlaması nedeniyle $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi alınarak Kruskal Wallis varyans analizi yapıldı. Daha sonra anlamlılığın hangi kateterden kaynaklandığının saptanması için ikili gruplarda Mann-Withney U testi yapıldı. *C.albicans* ve albicans dışı kandidalar arasında slime üretimi açısından farkın araştırılması için Chi-Square testi, yine iki grubun kateter yüzeyleri üzerinde oluşturdukları biyofilmin farkının araştırılması için *t* testi kullanıldı. 't testi' değerlendirilmesinde anlamlılık düzeyi için *t değeri* esas alındı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 27(%49.1) *C.albicans*, 18(%32.7) *C.parapsilosis*, 6(%10.9) *C.glabrata* ve 4(%7.3) *C.tropicalis* suşunda petri yöntemi ile slime faktör üretimini çalışıldı. Çalışma sonunda resim 3’de görülen slime faktör olumlu ve slime faktör olumsuz suşlar elde edildi.



Resim 3. Slime olumsuz ve slime olumlu kandida suşlarının petride görünümü.

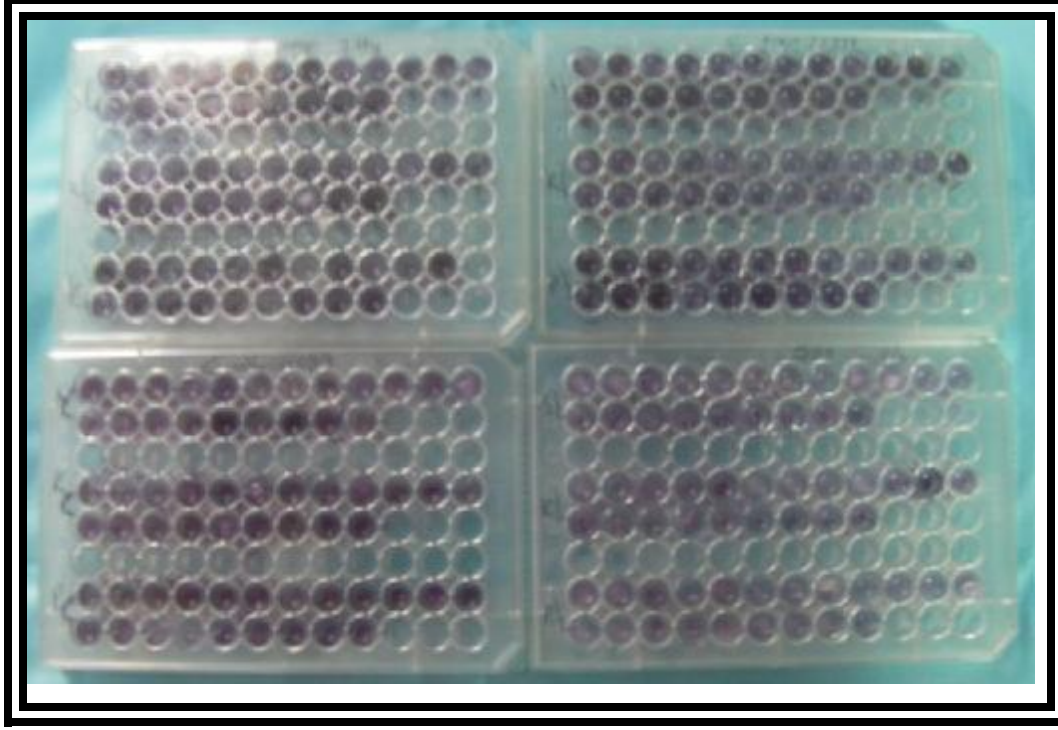
Kandida türlerinin slime faktör oluşturmalarının dağılımı Tablo 10’da görülmektedir.

Tablo 10. Kandida türlerinin slime faktör oluşumu dağılımı

<i>Candida sp</i>	Slime üretimi				Toplam	%
	var	%	yok	%		
<i>C.albicans</i>	3	11.1	24	88.9	27	100.0
<i>C.parapsilosis</i>	15	83.4	3	16.6	18	100.0
<i>C.glabrata</i>	3	50.0	3	50.0	6	100.0
<i>C.tropicalis</i>	2	50.0	2	50.0	4	100.0

Çalışmamızda toplam 27 *C. albicans*, 28 albicans dışı kandida kandida suşu slime faktör üretimi açısından incelendi. *C. albicans* ile albicans dışı kandida türler arasında slime oluşumu incelendiğinde 27 *C.albicans* suşunun üçünde (%11.1), 28 non-albicans suşunun ise 20’sinde (%71.4) slime faktör olumlu bulundu. Aralarındaki istatistiksel fark Chi-Square testi ile gösterildi. (p=0.0001)

Kateter örneklerinin mikropalak yöntemi ile çalışılması sonrası kuyucuklarda MTT ile elde edilen renk değişimi ile spektrofotometrede 540nm dalga boyutunda absorbans ölçümü yapıldı. Platelardaki renk değişikliği resim 4’de görülmektedir.



Resim 4. *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* ve *C. glabrata* şuşlarının MTT formozan ile renk değişimlerinin görölmesi.

Absorbans ölçümü ile her bir katetere tutunan hücre sayıları elde edildi. Kateter örnekleri bağımsız değişken; kandida türleri de bağımlı değişken olarak değerlendirilerek istatistiksel analiz yapıldı.

Silikon, karbotan ve poliüretan kateterler ikişerli gruplar oluşturularak kandida türleri ile karşılaştırıldı. Buna göre her grup analizi için bağımsız gruplarda *Mann-Whitney U testi* kullanıldı.

Her kandida türünün kateter yüzeylerine tutunan ortalama hücre sayıları standart sapmaları ile birlikte Tablo 11-12-13 ve 14’de gösterilmiştir.

Tablo 11. *C.albicans*’ın kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi

Kateter tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama hücre sayısı ± Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Silikon	21	1.075±0.540	0.471	2.835
Karbotan	21	1.145±0.463	0.428	2.278
Poliüretan	21	0.996±0.368	0.456	1.803
Toplam	63	1.072±0.459	0.428	2.835

$$\chi^2=1.002 \quad p=0.606$$

Tablo 12. *C. tropicalis*'in kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi

Kateter tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama hücre sayısı ± Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Silikon	21	1.223±.380	0.707	2.085
Karbotan	21	0.941±.369	0.393	1.633
Poliüretan	21	1.304±.486	0.710	2.614
Toplam	63	1.156±.437	0.393	2.614

$$\chi^2=7.940 P=0.019$$

Tablo 13. *C.glabrata*'nın kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi

Kateter tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama hücre sayısı ± Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Silikon	21	0.402±.127	0.265	0.737
Karbotan	21	0.452±.409	0.209	2.174
Poliüretan	21	0.358±.122	0.079	0.586
Toplam	63	0.405±.257	0.209	2.174

$$\chi^2=1.353 p=0.508$$

Tablo 14. *C.parapsilosis*'in kateter örneklerine tutunma ortalamalarının analizi

Kateter tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama hücre sayısı ± Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Silikon	21	1.518±.823	0.566	3.410
Karbotan	21	1.285±.684	0.447	2.782
Poliüretan	21	1.515±.725	0.242	3.464
Toplam	63	1.439±.741	0.242	3.464

$$\chi^2=2.784 p=0.249$$

Kruskal Wallis varyans analizi ile *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'nın her üç kateter cinsine tutunması arasında fark saptanmadı.

C.tropicalis'te hücrelerin kateter yüzeyine tutunması arasında anlamlı fark bulundu($p=0.019$). Farkın hangi kateterden kaynaklandığını saptanması için ikili gruplarda Mann Withney U testi uygulandı. Buna göre;

C.tropicalis hücrelerinin silikon ve karbotan kateterin olduğu grupta karbotan katetere tutunması anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.024$).

Silikon ile poliüretanın karşılaştırıldığı grupta iki kateter arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.624$).

Karbotan ile poliüretanın karşılaştırıldığı grupta karbotan katetere tutunması anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p=0.011$).

Tablo 15. *C.tropicalis*'in kateter grupları ile karşılaştırılması

Kateter tipi	U değeri	P değeri
Silikon ve karbotan	131.000	0.024
Silikon ve poliüretan	201.000	0.624
Karbotan ve poliüretan	119.000	0.011

Anlamlılık değerleri ile spektrofotometrede sayılan hücre sayıları karşılaştırıldı. (silikon:1.108,karbotan:0.819,poliüretan:1.275) ve kateterlere tutunan hücre sayılarının ortanca değerlerine göre farkın karbotan kateterden kaynaklandığı görüldü. Buna göre *C.tropicalis*'in en az tutunduğu kateter tipinin karbotan, ikinci en az tutunduğu kateterin ise silikon olduğu bulundu.

Bağımsız değişkenlerde *t testi* kullanılarak *C.albicans* ile non-albicans türler kendi aralarında kateter yüzeyine tutunma oranları açısından karşılaştırıldı. Her iki grup arasında biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.002$, $t=0.904$).

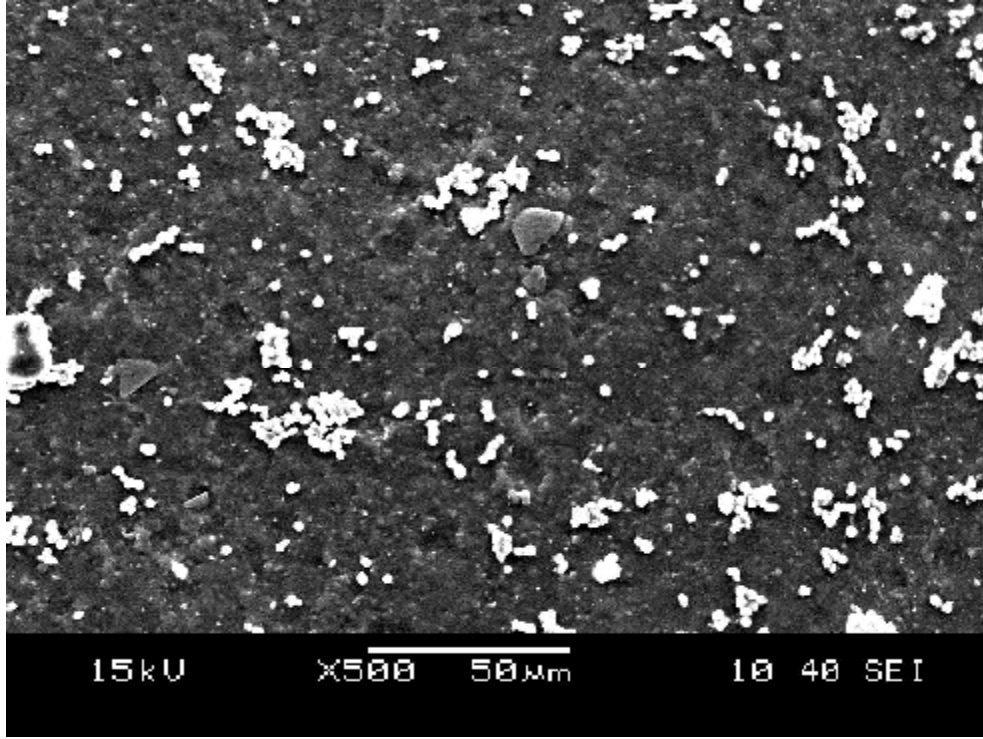
Tablo 16. *C.albicans* ile non-albicans türlerin karşılaştırılması

Kandida grup	(n)	Ortalama hücre sayısı \pm SS
<i>C.albicans</i>	63	1.072 \pm .459
Non-albicans	189	1.003 \pm .676

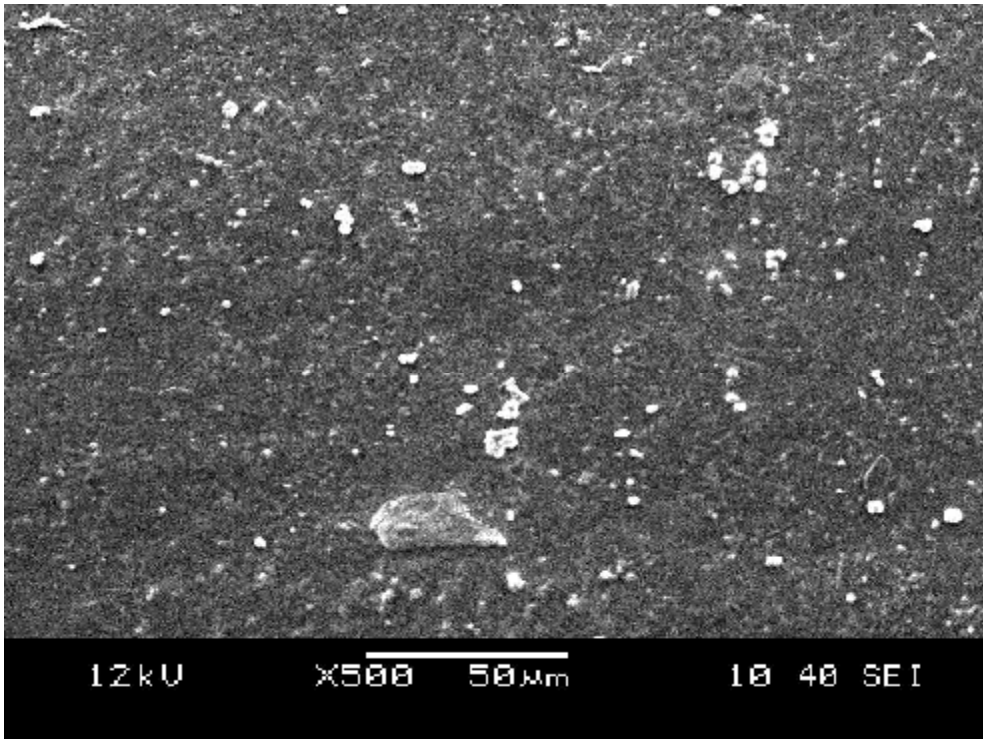
$p=0.002$ $t=0.904$

Çalışmamızda spektrofotometrede hücre sayılarının elde edilmesinin ardından her bir kateter türünün dört farklı kandida türü ile eşleştirilmesiyle kateter yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası SEM ile incelenerek biyofilm tabakasının görüntüleri elde edildi. Görüntülerde x500 büyütmede yüzey üzerinde biyofilmi oluşturan maya hücreleri x1000- x2000- x2500 büyütmede ise biyofilm tabakası oluşturan maya hücrelerinin germ tüp, pseudohif, hif yapıları ile yoğun ağ yapısı görüldü. *C.parapsilosis*'in tüm kateter yüzeylerinde yoğun olarak çoğaldığı, bol miktarda pseudohif yapıları, yüzey üzerinde birbirlerine bağlanmış -ağ atmış- hücre toplulukları oluşturduğu ve tüm yüzeye yayılmış yoğun ağ tabakası görüldü. Diğer kandida türlerinin hepsinde kateter yüzeyinde germ tüp, pseudohif, hif yapıları ve yüzey üzerinde yer yer koloni oluşturmuş, birbirleri ile bağlantılı maya hücreleri görüldü. Tüm türlerde maya hücrelerinin yüzeyin derinliğine doğru uzanan hif yapıları oluşturdukları izlendi.

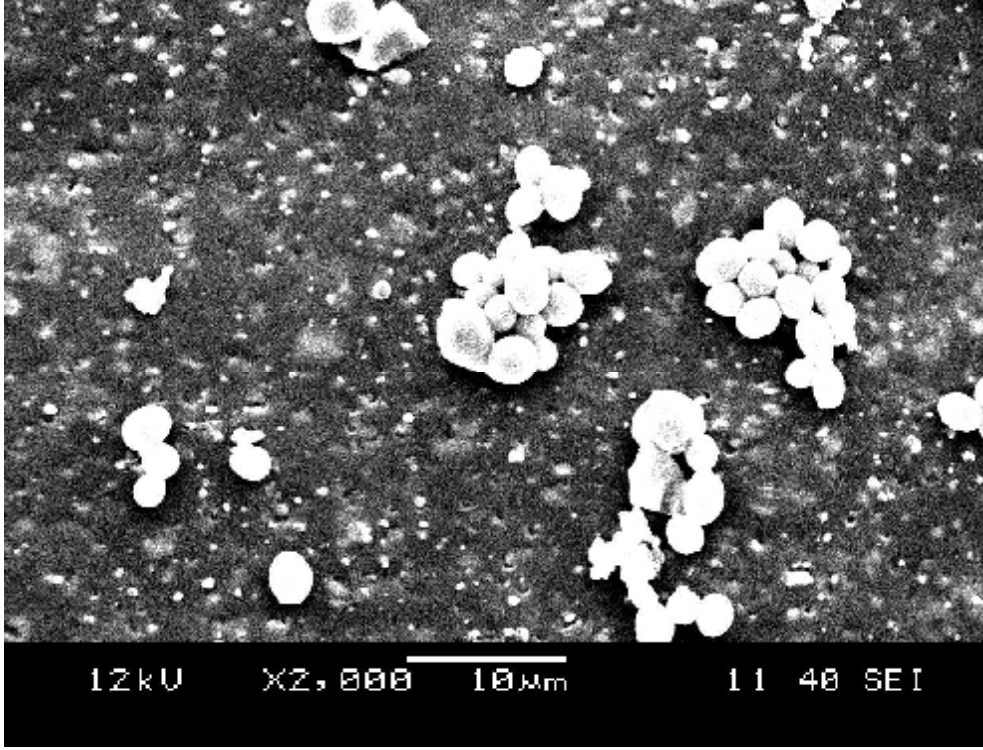
Çalışmamızda SEM ile elde edilen görüntüler Resim 5-14 arasında görülmektedir.



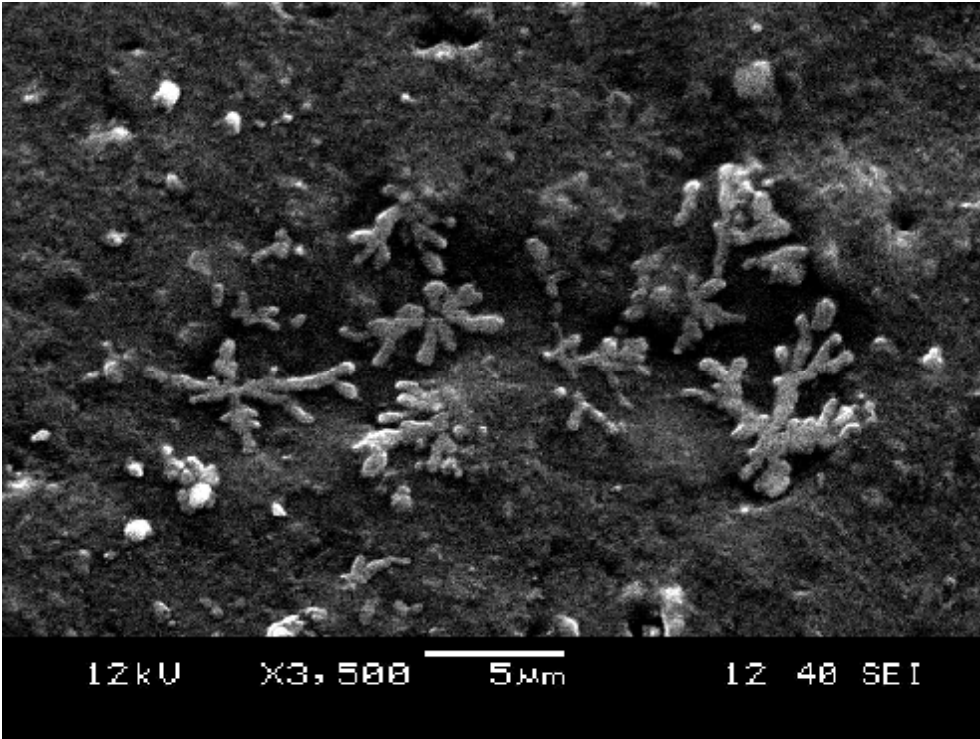
Resim 5. SEM’nda x500 büyütmede *C. tropicalis*’in silikon kateter üzerindeki görünümü.



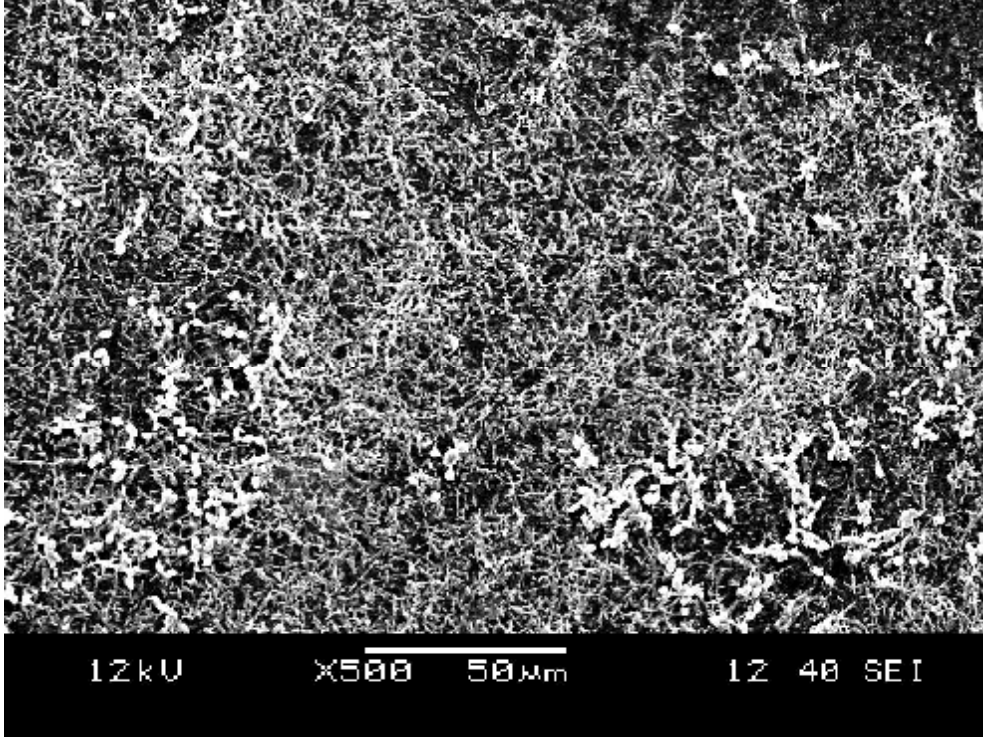
Resim 6. SEM’nda x500 büyütmede *C. Glabrata*’nın silikon kateter üzerindeki görünümü.



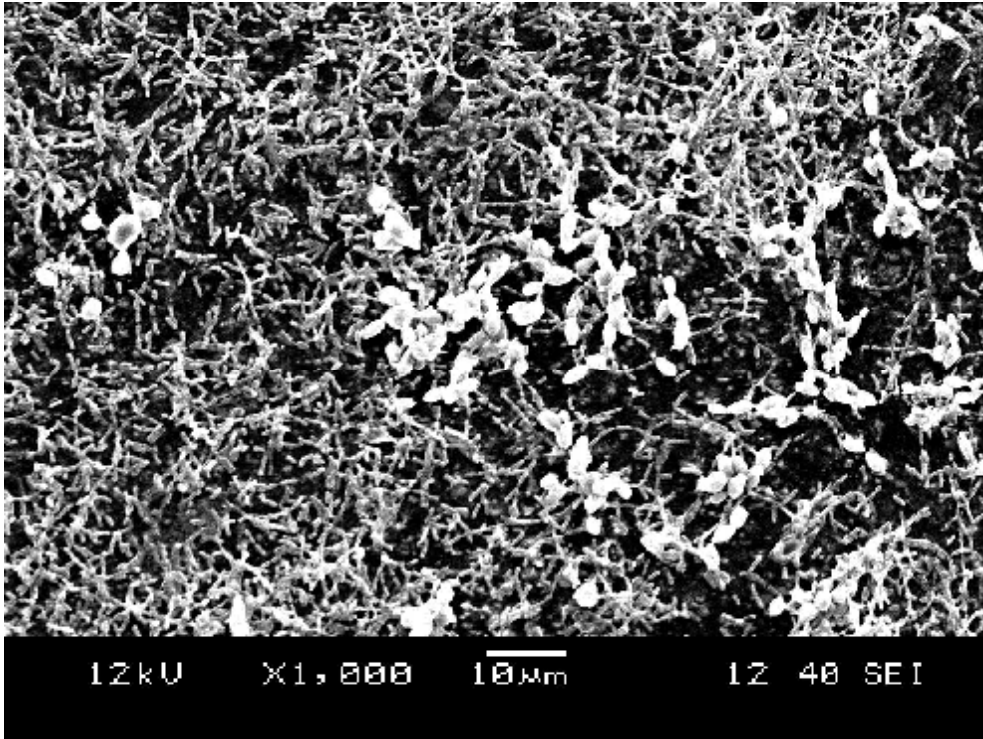
Resim 7. SEM’nda x2000 büyütmede *C. albicans*’ın poliüretan üzerindeki görünümü.



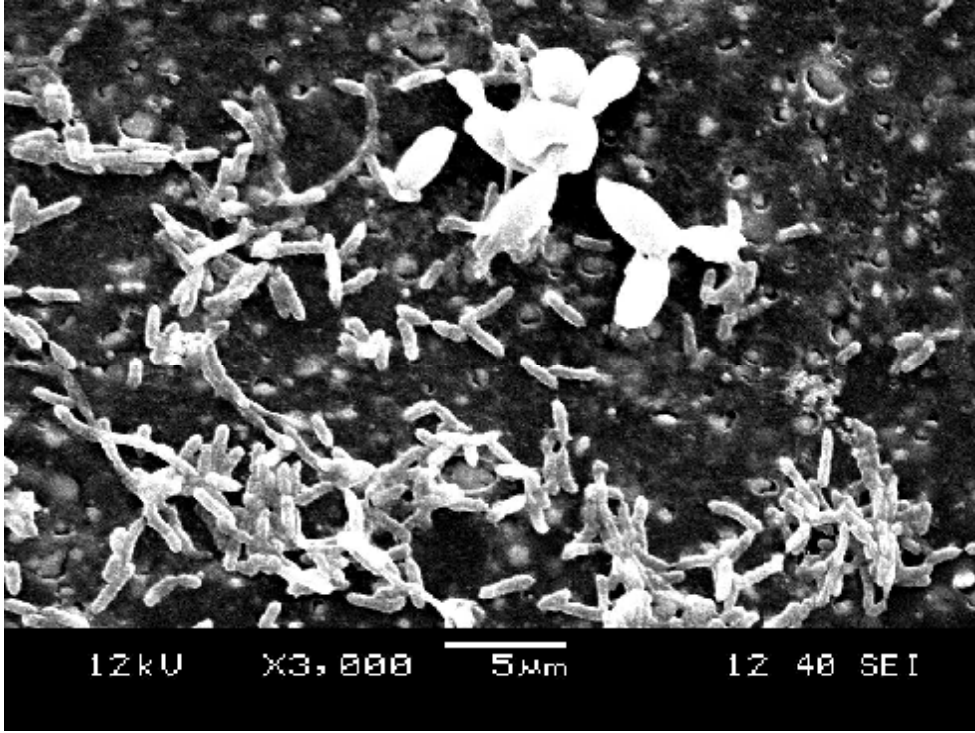
Resim 8. SEM’nda x3500 büyütmede *C. parapsilosis*’in karbotan kateter üzerindeki görünümü.



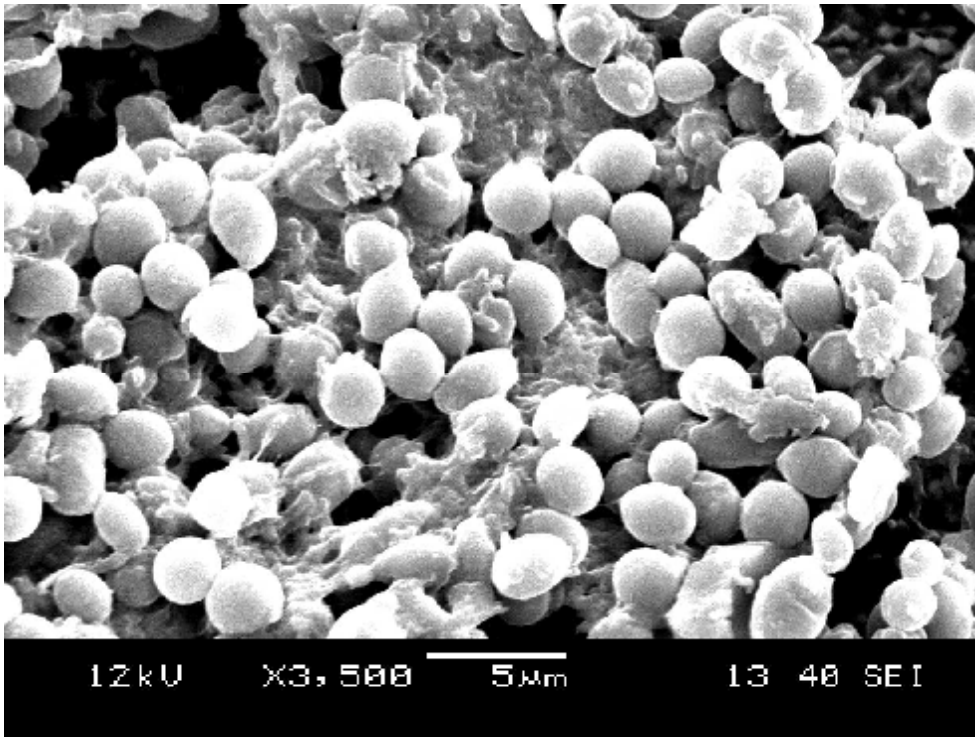
Resim 9. SEM’nda x500 büyütmede *C. parapsilosis*’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.



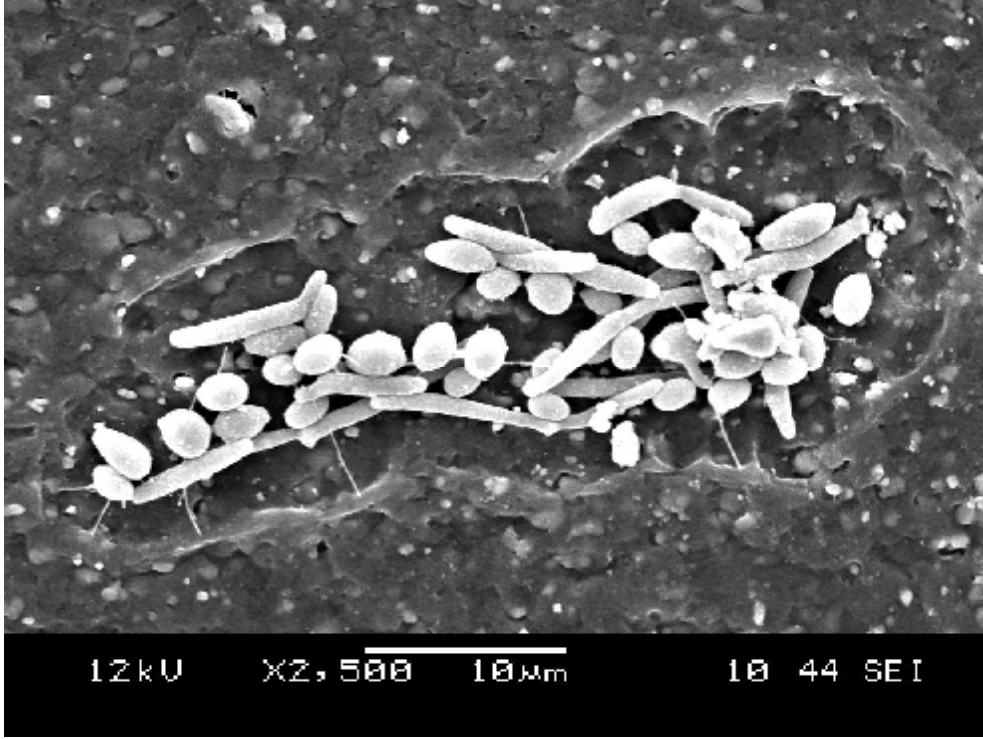
Resim 10. SEM’nda x10000 büyütmede *C. parapsilosis*’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.



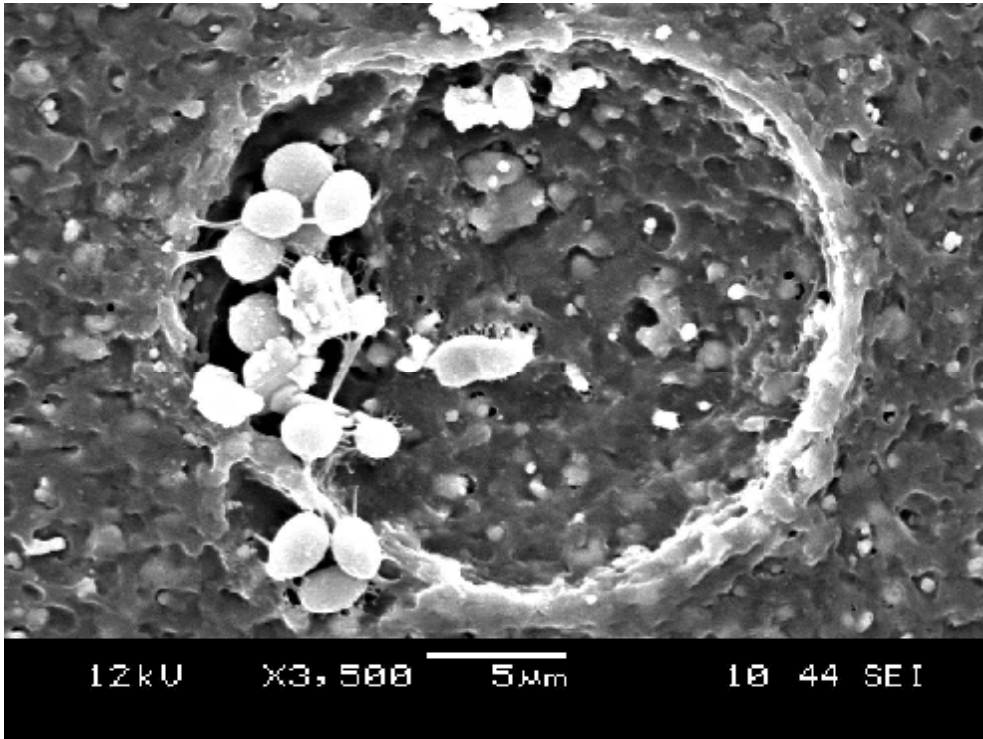
Resim 11. SEM’nda x3000 büyütmede *C. parapsilosis*’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.



Resim 12. SEM’nda x3500 büyütmede *C. parapsilosis*’in poliüretan kateter üzerindeki görünümü.



Resim 13. SEM’nda x2500 büyütmede *C. parapsilosis*’in silikon kateter üzerindeki birbiri ile bağlantılı kolonilerin görünümü.



Resim 14. SEM’nda x3500 büyütmede *C. parapsilosis*’in karbon kateter üzerindeki birbiri ile bağlantılı kolonilerin görünümü.

5. TARTISMA

Biyofilm tabakası, kandidaların yabancı yüzey üzerinde yüzeye adezyonu ile başlar. Kandidalar QS aracılığı ile birbirleri ile haberleşerek ve hızla sayılarını artırarak yüzey üzerine kolonize olurlar. Polimerik materyal üzerinde ekstraselüler matriks içine gömülerek tek ya da çok tabakalı biyofilm yapısı oluştururlar. Yabancı cisme bağlı araç ilişkili infeksiyonlara ve katetere bağlı kandidemi ve sepsise neden olurlar. Biyofilm tabakası içinde, hem konak savunmasından hem de antifungal etkili ajanların etkisinden korunurlar. Sesil maya hücreleri planktonik yaşayanlara göre amphoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve ketakonazole karşı daha dirençli hale gelirler[102].

Kullanılan antifungal ajanların in-vitro Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri çok düşük olsa bile biyofilm tabakası içinde yaşayan sesil maya hücrelerinin MIK değerleri çok yükselerek tedavi başarısızlığına neden olur. Bu nedenle kateter gibi yabancı cisimlerin neden olduğu infeksiyonlarda, önemli morbidite ve mortalite artışı olur ve yabancı cismin çıkarılmasını zorunlu kılar.

Hastane kaynaklı araç ilişkili infeksiyonların en sık görülenleri arasında ilk üç sırayı ventilatör ilişkili pnomoni, kan dolaşım infeksiyonları ve üriner sistem infeksiyonları alır. Nozokomiyal kan dolaşım infeksiyonlarının içinde de dördüncü sırayı kandidemiler alır[4].

Mayalar, kateterin giriş yerinde, hubda, lümende ve dış yüzeyde kolonizasyon sonrası giriş yeri infeksiyonu, cep ya da tünel infeksiyonu gibi lokal infeksiyon bulgularına ya da KİKDI gibi sistemik hastalık tablosuna neden olurlar.

Biyofilm oluşum sürecinin tam olarak anlaşılması biyofilm kontrol stratejilerini geliştirerek ilişkili hastalık kontrolünü kolaylaştıracaktır.

KİKDI'larını azaltabilmek için hastane infeksiyonlarını önleme programlarına mutlaka uyulmasının yanında hastada kullanılacak araçların seçilmesi de hastane infeksiyonlarını önleme klavuzlarına uygun olarak planlanmalıdır.

Çalışmamızda da rutinde piyasa da pazarlanan silikon, karbotan ve poliüretandan imal edilmiş olan santral venöz kateterlerde kandidalarla biyofilm oluşumu çalışıldı. Kateter yüzeyinde biyofilm oluşturacak suşların seçilmesi amacıyla, slime üretimini saptamak için pratik ve ekonomik olmasından dolayı glikozlu sıvı sabouraud besiyeri ile petri yöntemini tercih ettik.

Cevahir N ve ark.ları yaptıkları çalışmada 126 kandida suşunda slime üretimini üç farklı yöntem kullanarak araştırdıkları çalışmalarında; slime faktör yapımı glikozlu sıvı sabouraud besiyeri ile %33.3, kongo kırmızılı agar ile %44.4 ve glikozlu triptik soy buyyon

ile %39.6 oranında saptamışlardır. Yöntemler slime üretimi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır [103].

Kateter yüzeyinde biyofilm oluşumunu SDB'la petri yöntemiyle gösterdiğimiz 55 kandida suşunda %41.81 oranında slime faktör üretimi saptandı. Yirmisekiz non-albicans suşta %71.4 oranında slime faktör olumlu bulunurken *C.albicans*'ta %11.1 oranında slime faktör olumluluğu saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Çalışmamızda *C.parapsilosis* suşlarının %83.4 oranında slime faktör ürettiği, *C.tropicalis* ve *C.glabrata* suşlarının %50 oranında slime faktör ürettiği bulundu.

Yakupogulları ve ark.nın çalışmasında slime faktör üretimini *C.tropicalis* kökenlerinde %22.2, Ekşi ve ark.ları çeşitli klinik kökenlerde slime üretimini %44.3, Branchi ve ark.ları kateter kanı ya da kandan üreyen *C.parapsilosis* kökenlerinde %80, Yüce ve ark.ları %11 oranında bulmuşlardır[104, 105, 106, 107].

C.tropicalis ve *C.glabrata* türlerinde slime faktör üretiminin gösterildiği çalışma sayısı az olup, bulunan oranların bizim bulduğumuz oranlardan düşük bulunduğu belirtilmiştir[104, 105, 108]. Bizim bulduğumuz oranların daha yüksek olmasının nedeni olarak kullanılan kökenlerin kan kültürü izolatu olmasından kaynaklanmış olacağı düşünülebilir. Benzer şekilde Shin JH ve ark.larının kandan izole edilen non-albicans kandida türlerinde slime üretimini gösterdikleri çalışmalarında; slime faktör üretimi non-albicans kandida türlerinde, *C.albicans*'a göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($P<0.0001$). Kandan izole edilen *C.parapsilosis*'lerde kan dışı bölgeden izole edilenlere göre anlamlı olarak daha fazla slime üretimi görülmüştür($p=0.032$). TPN alan hastalarda SVKİKDİ etkeni olan albicans dışı kandida türlerinde özellikle -*C.parapsilosis*'te- slime üretimi anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($P < 0.0001$)[61].

Yıldırım M ve ark.larının klinik örneklerden ve sağlıklı kişilerin ağız florasından oluşan kontrol grubundan elde ettikleri *C.albicans* ve albicans dışı kandida türlerinde virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmışlarında; *C.albicans*'ta %17 albicans dışı kandida türlerinde %33 oranında slime faktör olumlu bulmuşlardır. Çalışmalarında klinik izolatlarla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Slime faktör olumlu bulunan suşların %17.6'sının kan, %25'inin de kateterden elde edilen suşlar olduğunu, klinik örneklerle kontrol grubunun arasında istatistiksel fark olmamasının nedenini kullanılan yöntemden kaynaklanabileceği belirtmişlerdir[37].

So'nia Silva ve ark.nın in-vitro olarak non-albicans türlerin biyofilm içindeki aktivitelerini ölçtükleri çalışmalarında *C.parapsilosis*'in metabolik aktivitesinin en yüksek

olduğunu ve bunu sırasıyla *C.tropicalis* ve *C.glabrata*'nın izlediğini, metabolik aktivitesi yüksek olan maya hücrelerinin çevrede bir kez kolonize olarak biyofilm oluşturmaya başlamasından sonra patojenik bir potansiyel kazandığını söylemişlerdir[108].

Literatürde birçok çalışmada, mikropalak yöntemi ile çalışılan biyofilm modellerinde kateter yüzeyine tutunan hücrelerin spektrofotometrede absorbanlarının kantitatif değerlerinin ölçümü için sarı tetrazolium tuzu olan MTT kullanılmıştır[7, 109, 110, 112]. Biyofilm içindeki sesil hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile koyu mavi renkli MTT formazan halini alması ve bazı memeli hücreleri ile funguslarda hücre proliferasyonunu göstermesi, çalışma prensibi için kaynak oluşturmuştur. Bizim çalışmamızda da MTT ile iyi sonuçlar alınmıştır. Çalışmamızda, SEM görüntülemelerinde *C.parapsilosis*'in bol miktarda pseudohif yapıları, yüzey üzerinde birbirlerine bağlanmış -ağ atmış- hücre toplulukları oluşturduğu ve tüm yüzeye yayılmış yoğun ağ tabakası yaptığı, diğer kandida türlerinin hepsinde kateter yüzeyinde germ tüp, pseudohif, hif yapılarının izlendiği görüldü. Luiz Cezar da Silveira ve ark.ları da benzer şekilde silikon lateks yüzeylerde *C.albicans*'ın hif, pseudohif ve germ tüp yapıları gördüklerini *C.parapsilosis*'in silikon yüzeyde daha fazla biyofilm oluşturduğunu ve blastosporlarının kümeler oluşturduğunu gördüklerini belirtmişlerdir[109].

Spektrofotometrede alınan hücre sayılarının sonucunda *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın kateter özelliklerinden bağımsız olarak tüm kateterlere tutundukları yani kolonize oldukları görüldü. Çalışılan türler arasında *C.tropicalis*'in farklı kateterlere farklı oranda tutunduğu ve karbotan kateterde daha az kolonize olduğu ikinci daha az kolonize olduğu kateterin silikon kateter ve en fazla tutunduğu kateter yüzeyinin poliüretan kateter yüzeyi olduğu saptandı($p<0.05$).

Stephen P. Hawser ve L. Julla Douglas 1994'te kateter yüzeyinde kandidalarla yaptıkları çalışmalarını literatürde funguslarla yapılan ilk deneysel model olarak belirtmişlerdir. Çalışmalarında *C.albicans*'ın non-albicans türlere göre daha fazla biyofilm yaptığını bulmuşlardır. *C.albicans*'ın PVC katetere göre lateks ya da silikon elastomer katetere çok az farkla daha fazla tutunduğunu ($p<0.05$) buna karşın poliüretan ve %100 silikon katetere oldukça az tutunduğunu ($p<0.01$), sonuçta poliüretan ve silikon kateterin kolonizasyona dirençli olduğunu belirtmişlerdir[7]. Benzer bir çalışma yapan Luiz Cezar da Silveira ve ark.larının bebeklerde kullanılan lateks ve silikon emzik uçları ile in-vitro biyofilm modeli oluşturdukları çalışmalarında *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* ATCC standart suşlarını kullanmışlardır. Sonuçları, MTT formazan ile absorban ölçümü ve SEM görüntüleri ile 24 ve 48.saatte değerlendirmişlerdir. Lateks ve silikon yüzeyler üzerinde 24. ve 48. saat arasında fark bulunmazken, tüm kandida türlerinin lateks ve silikon yüzeyde biyofilm

oluşturduğunu, *C.albicans*'ın çok az farkla diğer türlerden daha çok biyofilm oluşturmasına rağmen aralarında istatistiksel fark bulunmadığını belirtmişlerdir[109].

Kuhn, D. M. ve ark.ları çalışmalarında silikon elastomer kateter yüzeyinde kandida türlerinin oluşturduğu biyofilm tabakasını MTT ve kuru ağırlık yöntemi ile karşılaştırarak *Fluorescence* ve *confocal scanning laser microscopy* ile görüntülemişlerdir. *C.albicans*'ın albicans dışı kandida türlerden daha fazla biyofilm oluşturduğunu, *C.parapsilosis*'in biyofilm tabakasının daha küçük hacimde olduğunu, ancak blastosporların kümelenmediğini göstermişlerdir[110].

Uppuluri P. ve ark.larının *C.albicans*'ın silikon elastomer disk üzerinde oluşturduğu biyofilmi, sentetik idrar ortamı ve RPMI (morpholinepropanesulfonic asitle tamponlanmış L-glutamine içeren ortam) ortamında karşılaştırdıkları çalışmalarında sonuçları mikroskopi ve kolorimetrik MTT ile değerlendirdiklerini, ilk dört saatte RPMI'deki hücre sayısının sentetik idrar ortamındaki hücre sayısının iki katı olduğunu ve daha fazla fungal yapı içerdiğini 24 saat sonra fungal yapıların her iki ortamda da aynı olduğunu ancak hücre sayısındaki farkın devam ettiğini belirtmişlerdir. SEM ile yaptıkları değerlendirmede de sentetik idrar ortamında biyofilm tabakasının diğer ortama göre beş kat daha ince olduğunu, aradaki farkın silikon elastomerden kaynaklandığını söylemişlerdir[111]. Aynı çalışmanın devamında her iki ortamda da biyofilmi oluşturan hücrelerde antifungal duyarlılık sonuçlarına göre sesil hücrelerin flukonazole yüksek düzey dirençli olduklarını, amphoteresin B'ye direncin arttığını, kaspofunginin de biyofilm aktivitesi olan tek antifungal olduğunu belirtmişlerdir.

Harrison Joe J. ve ark.ları, kandidaların metal yüzey üzerinde de biyofilm oluşturabildiğini göstermek için, *C.topicalis* tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını suda eriyen 15 metal iyonu ile test ettikleri çalışmalarında; biyofilm tabakasını in-vitro koşullarda 24 saat metal iyonlara maruz bırakarak sesil hücrelerin hücre ölümüne, planktonik hücrelerden 65 kat fazla tolerans gösterdiğini saptamışlardır. Test edilen ağır metallerden sadece çok toksik olan Hg^{2+} , CrO_4^{2-} ve Cu^{2+} in yüksek konsantrasyonlarının yüzeye adere olan kandidaları öldürebildiğini belirtmişlerdir[112].

Ferreira J. A. G. ve ark.ları kandan izole edilen *Candida albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'le silikon diskler üzerinde biyofilm oluşturarak, oluşturdukları biyofilm tabakasında broth mikrodilüsyon yöntemi ile kaspofungin duyarlılığı çalışmışlardır. Silikon diskler kaspofungine maruz bırakıldıktan 48 saat sonra, disk yüzeylerinin SEM ile incelenmesi ile sesil hücrelerde, planktonik hücrelere göre MİK değerinin her üç türde de sekiz kat arttığını, SEM görüntülemelerin de $128\mu g/ml$ MİK değerinde antifungal ajanın eklenmediği kontrol kuyucuğu ile benzer yoğunlukta hif, pseudohif ve ağ yapısı görüldüğünü,

C. albicans ve *C. tropicalis*'te yüksek kaspofungin konsantrasyonunda paradoksal büyüme saptadıklarını, bu durumu SEM ve MTT ile hücre sayısı analizi ile de doğruladıklarını belirtmişlerdir[102]. Bu durumun klinik öneminin çok net olmadığı belirtilmekle birlikte biyofilmin neden olduğu kateter infeksiyonlarının tedavisindeki başarısızlığı açıklayabileceğini söylemişlerdir.

Çalışmamızda az sayıda olan benzer çalışmalara göre; *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* türlerinin üç kateter tipine de eşit miktarda tutunduğu görüldü. Bu durumun tüm izolatların kan kültürü izolatı olmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. İn-vitro çalışmalarda bulunan sonuçların in-vivo olarak benzer bulunduğu göz önüne alınırsa bu durum daha da anlam kazanabilir.*C.tropicalis*'in farklı kateter yüzeylerinde oluşturduğu biyofilm tabakasının farklı olmasının nedeni mikroorganizmanın patogenezi ile ilgili olabilir. *C.tropicalis*'in özellikle nötropenik ve kemik iliği tansplantasyonu yapılmış hematolojik maliniteli hastalarda oral mukozadan ve gastrointestinal sistem mukozasından penetre olarak invaziv hastalığa neden olduğu, hastalık oluşumunda esas faktörün virulans özelliğinden çok invaziv özelliğinin patogeneizde önemli olduğu bilinmektedir. Non-albicans kandida türlerinde biyofilm yapısının incelendiği bir başka çalışmada da *C.tropicalis*'in biyofilm tabakasının tek tabakadan oluştuğu, EPM içeriğinde protein ve karbonhidrat miktarının diğer *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* türlerine göre daha az bulunduğu belirtilmektedir[113].

C.tropicalis'in diğer kandida türlerine göre kateterlere daha az tutunmasının nedeni olarak biyofilmden sorumlu adezyon, hif oluşumu ve ESM oluşumunu sağlayan genlerden defektif bir suş olabileceği düşünülebilir. Ancak, SEM ile yapılan incelemede kateter yüzeylerinde yaygın ağ yapısının görülmediği, ancak hif yapılarının izlendiği bu nedenle defektif bir suş olma olasılığının düşük olduğunu söyleyebiliriz. Bu durum kandida türü ile yüzeyi oluşturan kimyasallar arasındaki etkileşimle de ilgili olabilir. Bu ilişkinin gösterilmesi için daha çok moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

6. SONUC ve ÖNERİLER

Çalışmamızda kandidaların neden olduğu kateter ve kateter ilişkili kan dolaşım infeksiyonlarını azaltabilmek için, farklı kateterler yüzeylerinde biyofilm oluşmasındaki farklılığı gösterebilmeyi ve daha az kolonize olan kateter materyalini bulmayı amaçladık. Bu doğrultuda bugün için piyasada bulunan üç kateter materyalini ve klinik örneklerden en sık izole edilen kandida türlerini seçtik ve iki farklı yöntemle biyofilm çalıştık.

Çalışma sonunda üç kandida türünün de tüm kateterlere eşit oranda tutunduğu, sadece *C. tropicalis*'te karbotandan yapılmış kateterin biyofilm oluşumu açısından düşük riskli olduğu bulundu. Bu farkın da kandida türünün genetik özelliklerine ya da karbotan kateter ile *Candida tropicalis* arasındaki etkileşimle ilgili olabileceği sonucuna varıldı.

Daha eski çalışmalarda kullanımda olan PVC, polietilen ve lateks kateterler kolonizasyon açısından riskli bulunduğu için rutin kullanımları terk edilmiştir. Çalıştığımız kateterlerin son teknoloji ile üretilen kateterler olmasına rağmen birbirlerine belirgin üstünlüklerinin olmadığı ve kandidalar önemli oranda kolonize oldukları görüldü.

Bu çalışmanın ileriki hedeflerinde yüzey ile kandida türü arasındaki ilişkinin moleküler yöntemle gösterilmesi ve biyofilm içinde antifungallere karşı MIK değişiminin saptanması hedeflenmektedir. Bu konuda sınırlı sayıda çalışma olması, konuya duyulan ilginin artmasına neden olmaktadır.

Son olarak kandida ile ilişkili kateter infeksiyonları azaltmak ya da önlemek için öncelikle hastane infeksiyonları önleme politikalarına sadık kalınması gerektiği, kateter alımı planlaması yapılırken kandideminin sık olduğu üniteler de eğer maliyet etkinse karbotan kateterin tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Bennett JE. Introduction to Mycoses. In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas R (eds). (Mandell, Douglas, and Bennett's) Principles and Practice of Infectious Diseases 7th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone (Elsevier); 2010, 3221-3324.
2. Ulusoy S, Akan H, Arart M, Baskan S ve ark. Damar içi kateter infeksiyonlarının önlenmesi klavuzu. Hastane infeksiyonları Dergisi, 2005; 9 ek:1: 1-35.
3. Yapar N, Pullukçu H, Avkan-Oğuz V, Sayın-Kutlu S at al. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. Med Mycol, 2011; 49(1): 26-31.
4. Martin D, Persat F, Piens MA, Picot S, et al. Candida species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005; 24(5): 329-33.
5. Cheng M.F, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, et al. Risk factors for fatal candidemia caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. BMC Infect Dis, 2005; 5(1): 17- 22.
6. Snyderman D.R. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial Candida infections. Chest, 2003; 123(5 Suppl): 500-503.
7. Hawser S.P and Douglas L.J. Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun, 1994; 62(3): 915-921.
8. Henrici A.T. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. J Bacteriol. 1933; 25(3): 277-87.
9. Zobell C, Anderson DQ, Smith WW. The bacteriostatic and bactericidal action of great salt lake water. J Bacteriol, 1937; 33(3): 253-262.

10. Jones H.C, Roth I.L, Sanders W.M. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*, 1969; 99(1): 316-325.
11. Geesey G.G, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT et al. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol*, 1977; 23(12):1733-1736.
12. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*, 1978;238(1):86-95.
13. Donlan R.M, Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8(9): 881-890.
14. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001; 147:3-9.
15. Leriche V, Sibille P, Carpentier B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2000;66(5): 1851-1856.
16. Sutherland I.W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, 2001; 9(5):222-227.
17. Kojic E.M, Darouiche R.O. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*, 2004;17(2):255-267.
18. O'Toole G.A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998;30(2): 295-304.
19. Watnick P.I, Fullner K.J, Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J Bacteriol*, 1999; 181(11):3606-3609.
20. Tümbay, E., *Candida Türleri*, in *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ş. Ustaçelebi, Editor. 1999, Güneş Kitabevi: Ankara. p. 1081.

21. Çerikçiođlu N, Sancak B. Mantarların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri. Ed. Wilke Topçu, Söyletir, Dođanay. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2 Bölüm 28 Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul-Hadımköy;2008, 2391-2397.
22. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. et al. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(1):1211-41.
23. Aydın M. *Candida* cinsi mantarlar (*Candida albicans*).Ed.cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Konu 133.sayfa 1109-1118. Güneş yayınevi, Ankara, 2004.
24. Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis*, 2003; 187(4):710-713.
25. Nelson R.D, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. et al. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev*, 1991; 4(1): 1-19.
26. Brawner D.L, Cutler J.E. Ultrastructural and biochemical studies of two dynamically expressed cell surface determinants on *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1986; 51(1): 327-336.
27. Brawner D.L, Cutler J.E. Variability in expression of a cell surface determinant on *Candida albicans* as evidenced by an agglutinating monoclonal antibody. *Infect Immun*, 1984; 43(3): 966-972.
28. Hopwood V, Poulain D, Fortier B, Evans G et al. A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1986; 54(1): 222-227.
29. Hostetter M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, 1994; 7(1):29-42.

30. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz)in-vitro araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi(Turkish Journal of İnfection)*, 2003; 17(4): 471-481.
31. Masuoka J, Hazen K.C. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology*, 1997; 143 (9): 3015-3021.
32. McCourtie J, Douglas L.J. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *J Gen Microbiol*, 1985; 131(3):495-503.
33. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H.et al. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology*, 1999; 145 (3): 689-694.
34. Yiğit N, Aktaş A. E. *Candida* türlerinde hemolitik aktivite araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of İnfection)*, 2008; 22(2): 91-96.
35. Hasenclever H.F, Mitchell W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 1961;39:570-573.
36. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*, 1990; 33(6):265-282.
37. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K ve ark. *İnfeksiyon* etkeni olarak izole edilen *candida albicans* ve non-*albicans candida* suşlarındaki bazı virülans faktörlerinin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2009; 39 (3-4):62-68.
38. İbrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1995; 63(5): 1993-1998.
39. Ghigo J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 2001; 412(6845):442-445.

40. Baillie G.S, Douglas L.J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, 1999; 48(7): 671-679.
41. Kuzucu Ç, Çizmeçi Z, Durmaz B. *Candida* türlerinde biyofilm ve fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2003; 60(3): 73-76.
42. Samonis G, Gikas A, Anaissie EJ, Vrenzos G, et al. Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonization of humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37(1): 51-53.
43. Petri MG, König J, Moecke HP, Gramm HJ, et al. Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients: a prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients. *Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy, Divisions of Mycology and Pneumonia Research. Intensive Care Med*, 1997; 23(3): 317-325.
44. Gowardman J.R, Lipman J, Rickard C.M. Assessment of peripheral arterial catheters as a source of sepsis in the critically ill: a narrative review. *J Hosp Infect*, 75(1): 12-18.
45. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, Alvarez-Lerma F, et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004; 23(4):323-330.
46. Dogru A, Sargin F, Celik M, Sagiroglu AE, et al. The rate of device-associated nosocomial infections in a medical surgical intensive care unit of a training and research hospital in Turkey: one-year outcomes. *Jpn J Infect Dis*, 63(2):95-98.
47. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(9):4434-440.
48. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 2004; 39(3):309-317.

49. Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, et al. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. *Mycoses*, 2006; 49(2):134-138.
50. Inan D, Saba R, Yalcin AN, Yilmaz M, et al. Device-associated nosocomial infection rates in Turkish medical-surgical intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006; 27(4):343-348.
51. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalin H, Sinirtaş M, et al. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiol Infect*, 2010; 138(9): 1328-1335.
52. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008; 21(4):606-625.
53. Harris AD, Castro J, Sheppard DC, Carmeli Y, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Clin Infect Dis*, 1999; 29(4): 926-928.
54. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH, et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol*, 2010; 59(8):873-880.
55. Van Vliet MJ, Harmsen HJ, de Bont ES, Tissing WJ, et al. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*, 2010; 6(5):e1000879.
56. Calderone R, Diamond R, Senet JM, Warmington J, Calderone R, et al. Host cell-fungal cell interactions. *J Med Vet Mycol*, 1994; 32 Suppl 1: 151-168.
57. Kozel T.R. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev*, 1996; 9(1):34-46.

- 58.** Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, et al. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. *Infect Immun*, 1994; 62(7): 2761-2772.
- 59.** Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, Chandra, J, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 2001; 183(18): 5385-5394.
- 60.** Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(1):14-199.
- 61.** Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, 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): 1244-1248.
- 62.** Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49(2):309-314.
- 63.** Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. et al. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol*, 1998; 64(9): 3486-3490.
- 64.** Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(7): 2982-2992.
- 65.** Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98(8):4664-4668.
- 66.** Shirtliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009;53(6):2392-2401.

- 67.** Hornby JM, Kebaara BW, Nickerson KW. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(7): 2366-2369.
- 68.** Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, et al. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71(8):4938-4940.
- 69.** Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, 2006; 5(4):613-619.
- 70.** Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*, 2002; 68(11):5459-5463.
- 71.** Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Cao, YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005;49(2): 584-899.
- 72.** Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, et al. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; 101(14): 5048-5052.
- 73.** Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, et al. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, 1994; 220(6):751-758.
- 74.** Patel M, Kunz DF, Trivedi VM, Jones MG, et al. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005; 52(1):29-34.
- 75.** Beekmann ES, Henderson DK. Infections caused by percutaneous intravascular devices. , In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas R (eds). (Mandell, Douglas, and Bennett's) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th edition, Philadelphia: Churchill Livingstone (Elsevier); 2010, 3347-3362.

- 76.** Wenzel R, Edmond M.B. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7(2):174-177.
- 77.** Polderman K.H, Girbes A.R. Central venous catheter use. Part 2: infectious complications. *Intensive Care Med*, 2002; 28(1):18-28.
- 78.** Goldmann D.A, Pier G.B. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6(2): 176-192.
- 79.** Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(5): p. 265-274.
- 80.** O'Grady N.P, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002; 23(12):759-769.
- 81.** Sheth NK, Franson TR, Rose HD, Buckmire FL. et al. Colonization of bacteria on polyvinyl chloride and teflon intravascular catheters in hospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 1983; 18(5):1061-1063.
- 82.** Raad II, Luna M, Khalil SA, Costerton JW, et al. The relationship between the thrombotic and infectious complications of central venous catheters. *JAMA*, 1994; 271(13):1014-1046.
- 83.** Safdar N, Maki DG. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters. *Intensive Care Med*, 2004; 30(1):62-67.
- 84.** Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, et al. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis*, 1993; 168(2):400-407.
- 85.** Segura M, Alvarez-Lerma F, Tellado JM, Jiménez-Ferrerres J, et al. A clinical trial on the prevention of catheter-related sepsis using a new hub model. *Ann Surg*, 1996; 223(4):363-369.

- 86.** Salzman MB, Isenberg HD, Rubin LG. Use of disinfectants to reduce microbial contamination of hubs of vascular catheters. *J Clin Microbiol*, 1993; 31(3):475-479.
- 87.** O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, 2002; 51(RR-10):1-29.
- 88.** Mermel LA. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med*, 2000; 132(5):391-402.
- 89.** Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, Banerjee S, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *Am J Infect Control*, 2009; 37(10):783-805.
- 90.** Grothe C, da Silva Belasco AG, de Cássia Bittencourt AR, Vianna LA, et al. Incidence of bloodstream infection among patients on hemodialysis by central venous catheter. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2010; 18(1):73-80.
- 91.** Slobbe L, Doorduyn JK, Lugtenburg PJ, El Barzouhi A, et al. Prevention of catheter-related bacteremia with a daily ethanol lock in patients with tunnelled catheters: a randomized, placebo-controlled trial. *PLoS One*, 2010; 5(5):e10840.
- 92.** Templeton A, Schlegel M, Fleisch F, Rettenmund G, et al. Multilumen central venous catheters increase risk for catheter-related bloodstream infection: prospective surveillance study. *Infection*, 2008; 36(4):322-327.
- 93.** Eggimann P, Harbarth S, Constantin MN, Touveneau S, et al. Impact of a prevention strategy targeted at vascular-access care on incidence of infections acquired in intensive care. *Lancet*, 2000; 355(9218):1864-1688.
- 94.** Blot F, Nitenberg G, Brun-Buisson C. New tools in diagnosing catheter-related infections. *Support Care Cancer*, 2000; 8(4):287-292.

95. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2009; 49(1):1-45.
96. Siegman-Igra Y, Anglum AM, Shapiro DE, Adal KA, et al. Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 1997; 35(4):928-936
97. Raad, II, et al., Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1994. 15(4 Pt 1): p.231-238(abstract).
98. Lee DH, Jung KY, Choi YH. Use of maximal sterile barrier precautions and/or antimicrobial-coated catheters to reduce the risk of central venous catheter-related bloodstream infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008; 29(10):947-950.
99. Darouiche RO, Raad II, Heard SO, Thornby JI, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. Catheter Study Group. *N Engl J Med*, 1999; 340(1):1-8.
100. Flowers RH 3rd, Schwenger KJ, Kopel RF, Fisch MJ 3rd, et al. Efficacy of an attachable subcutaneous cuff for the prevention of intravascular catheter-related infection. A randomized, controlled trial. *JAMA*, 1989; 261(6):878-883.
101. Gillies D, O'Riordan E, Carr D, O'Brien I, et al. Central venous catheter dressings: a systematic review. *J Adv Nurs*, 2003;44(6):623-632.
102. Ferreira JA, Carr JH, Starling CE, de Resende MA ,et al. Biofilm formation and effect of caspofungin on biofilm structure of *Candida* species bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(10):4377-4384.
103. Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ, ve ark. *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 2003; 17(1): 67-70.

104. Yakupoğulları Y, Toraman Aşçı Z. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktör üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2004; 34:178-181.
105. Ekşi F, Sözen E, Bayram A, Karslıgil T, ve ark. Çeşitli klinik örneklerde izole edilen *Candida* suşlarında slime üretimi ve hemolitik aktivitenin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2008; 38(1): 27-32
106. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 1994; 32(2):452-456.
107. Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. Detection of slime production among isolates of *Candida albicans*. *Infek Derg*, 1996; 38 (1): 27-32.
108. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, et al. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010; 61(6):534-540.
109. da Silveira LC, Charone S, Maia LC, Soares RM, et al. Biofilm formation by *Candida* species on silicone surfaces and latex pacifier nipples: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*, 2009; 33(3):235-240.
110. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA, et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, 2002; 70(2):878-888.
111. Uppuluri P, Dinakaran H, Thomas DP, Chaturvedi AK, et al. Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. *J Clin Microbiol*, 2009; 47(12): 4078-4083.
112. Harrison J J, Rabiei M, Turner RJ, Badry EA, et al. Metal resistance in *Candida* biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006; 55: 479-491.

- 113.** Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*, 2009; 47(7): 681-689.