






PERİPROTEZ ENFEKSİYONUNUN PATOGENEZİ

**Prof. Dr. Ayşe WILLKE TOPCU
17 NİSAN 2015 KLİMİK AYLIK
TOPLANTISI, MUĞLA**

Protez eklem replasmanı

- Yaşam kalitesini artırır
- Semptomları giderir
- Eklem fonksiyonlarını yeniden kazandırır
- Yatağa bağımlılığını engeller
- En önemli komplikasyonu enfeksiyondur

Protez sonrası enfeksiyon sıklığı

- Kalça replasmanı sonrası  %0.5-1
- Diz replasmanı sonrası  %0.5-2
- Omuz replasmanı sonrası  < %1

Enfeksiyon bölgesine mikroorganizmaların geliş yolları

- Ameliyat esnasında doğrudan
- Sonrasında hematogen
- Nadiren komşuluk yoluyla
(çevredeki DYDE veya osteomyelit)

Periprotez enfeksiyonu oluşumu

- Yerleştirilen protez
- Etken mikroorganizma
- Vücudun immün defans sistemleri arasındaki etkileşimle oluşur

Protez yüzeyine ait özellikler

- Kimyasal bileşimi
- Elektrik yükü
- Hidrofobisitesi
- Fiziksel yapısı
- Düzgünlüğü

Vücutun reaksiyonu

- Yabancı implantlar fibronektin gibi konak proteinleri ile sarılır
- İmplantın polietilen partikülü gibi yüzey polimerleri interstisyel sıvıdaki komplemanı aktive eder, bu da lokal nötrofillerin degranülasyonuna yol açar
- Granülositler fagosit edemediği yabancı cisimle savaşır ve fonksiyonları bozulur
- Bu durum implantın aseptik gevşemesine bile yol açabilir

Mikroorganizmalar

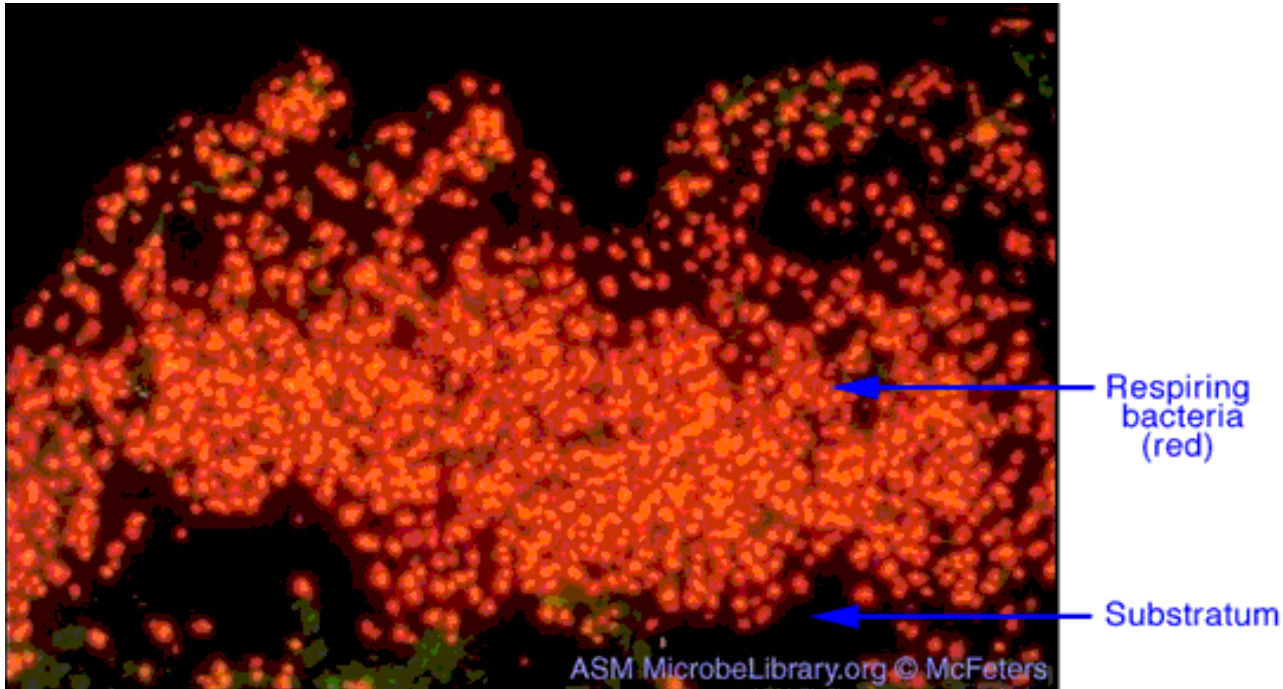
- Çok az sayıda bile mikroorganizmalar adere olarak enfeksiyon yapabilir
- Örn: 100cfu *S.aureus* enfeksiyona yol açabilir
- İmplant olmasa bu sayı 10.000 misli fazla olmalıdır
- Patogeneizde biyofilm oluşumu en önemli durumdur

Biyofilm tanımı

- Cansız ya da canlı yüzeylere
- Geri dönüşümsüz olarak tutunup çoğalan mikroorganizmaların
- Ekstrasellüler polimerik yapıdaki matriks içinde
- Birbirleriyle haberleşme, gen transkripsiyonu gibi özellikleri ile
- Planktonik mikroorganizmalara göre daha farklı bir fenotip kazanarak oluşturduğu mikroorganizma topluluğu

Biyofilmin basitçe tanımı

- Yüzeyle tutunarak ekstra sellüler matriks içinde birlikte yaşayan mikroorganizma topluluğu



Antonie von Leeuwenhoek 17.yüzyıl



Kendi diş (plağı)
kazıntılarını
kendi yaptığı
mikroskopta
inceleyerek bakterileri
gösteren bilim adamı

Biyofilm özellikleri

- Hidrotermal kayalarda, fosillerde 3.2 milyar yıldır varlığı gösterilmiştir
- Mikroorganizmalar sanıldığığının aksine %65-80 oranında biyofilmler oluşturarak yaşarlar, enfeksiyon oluştururlar
- Mikroorganizmaların varlığını sürdürmesinin evrensel stratejisi biyofilm oluşumudur
- Oysa mikrobiyolojik çalışmaların çoğu planktonik (serbest) yaşayanlarla yapılmıştır

Biyofilmin oluştuđu yerler

- Sıvı ve nemli ortamlarla teması olan yerlerde
- Mikroorganizmaların yaşadığı yumuşak dokuda
- Hava ile sıvının temas ettiği yüzeylerde



Biyofilm özellikleri

- Medikal önemi yanında endüstriyel sorunlara da yol açar
 - Her türlü borunun tıkanması
 - Yüzeylerin korozyonu
 - Gıda tezgahlarının kontaminasyonu
- Bakteriler dışında funguslar, protozoonlar, viruslar, algler de biyofilm oluşturur
- Genellikle birden fazla tür hatta cins birliktedir
- Sanayide bazan toksik maddelerin temizlenmesinde kullanılır

Biyofilmin önemi

Soğutma suyu



Gıda üretimi



Dişler



Petrol çıkarma

Gemi tekneleri



Kağıt imalatı



İçme suyu



Medical Implants

Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Dental plaklar
- Kateter (trakeal, damar, üriner, şant) enfeksiyonları
- Eklem ve kalp protez enfeksiyonları
- Endokardit
- Kistik fibrozis
- Kontak lens enfeksiyonları
- Böbrek taşları

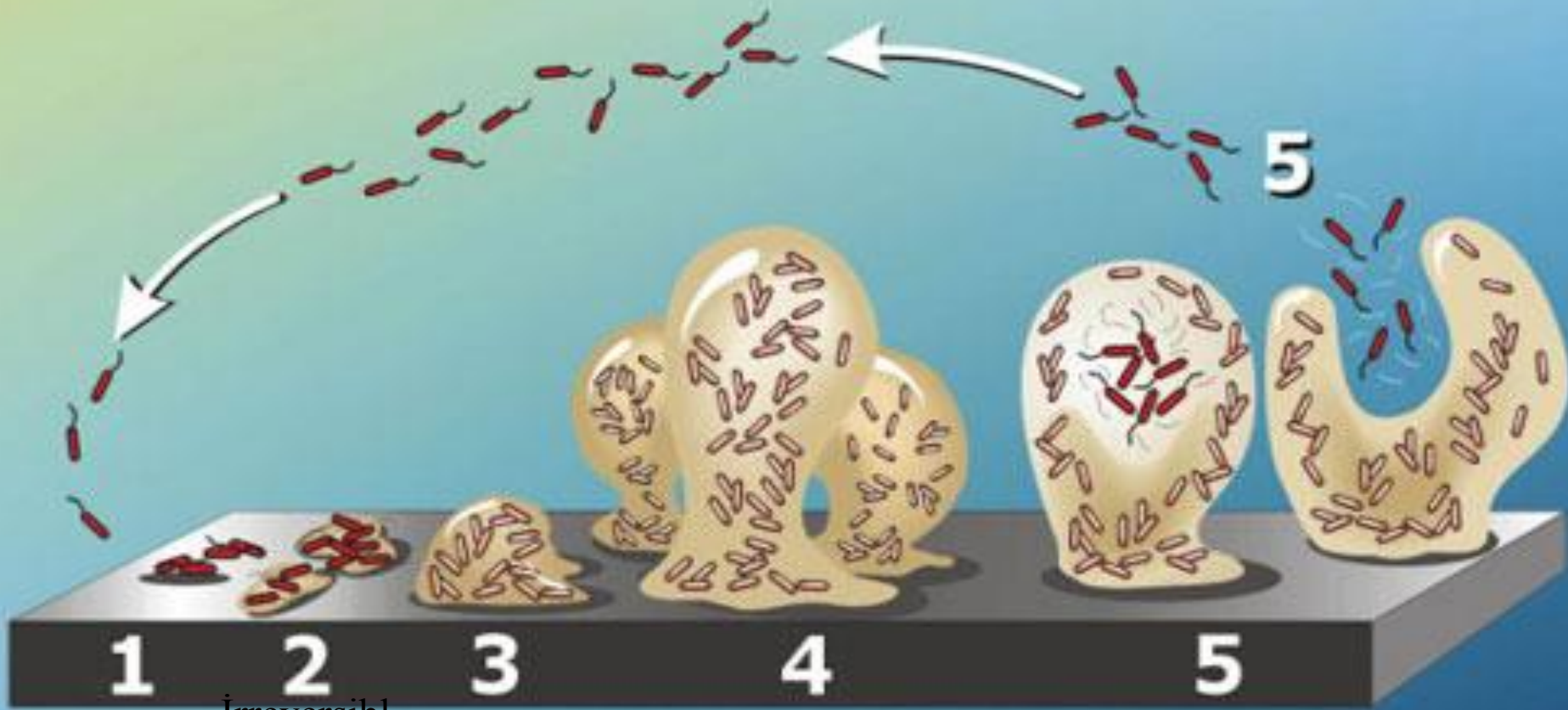
Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Osteomyelit
- Prostatit
- Kronik sinüzit
- Kronik otitis media
- Vajinal tamponlara bağlı TSS
- Prostatit
- Kronik enfeksiyonlar, diyabetik ayak enf.

Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Nekrotizan fasiit
- Safra yolu enfeksiyonları
- Kolera gibi gastrointestinal enfeksiyonlar
- CAPD peritoniti
- Greft enfeksiyonu
- Penil protez enfeksiyonu
- Safra yolu stent obstrüksiyonu
- Sütür enfeksiyonu

Biyofilm oluřma basamakları: Birbirini izleyen 5 evre



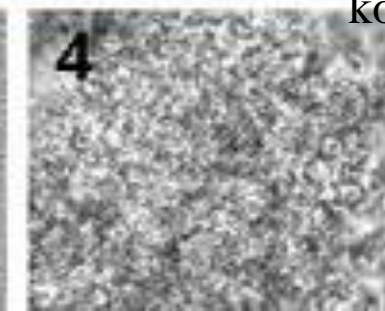
Tutunma

İrreversibl
bağlanma

Tabaka oluşumu

Tabakaların kalınlaşması

Planktonik formda
kopmalar



Biyofilm oluşumunun başlaması

- Mikroorganizmalar kendileri stresteyse biyofilm oluştururlar;
- Yüzeyin durumu
 - Yüzeyin düzgün veya pürüzlü olması
 - Teflon, plastik veya cam, metal
- Çevre sinyalleri
 - Yüzeyde organik ve inorganik besinlerin varlığı (müsin, aktin, DNA vb)
 - Ortamın oksijeni, pH, ısı, osmolite, demir iyonları vb gibi

Biyofilm oluşumunun 1. basamağı

- Saniyeler sürer
- Yüzeye irreversibl bağlanma vardır, bazı hücreler ayrılabilir
- Logaritmik çoğalma fazındadır m.o.lar

Biyofilm oluşumunun 2. basamağı

- Birinci basamaktan dakikalar sonra başlar
- Bağlanma irreversibldir, adezinler rol oynar
- Bakteriler yüzey adezinleri ile diğer hücrelere de bağlanır
- Bu evrede çoğalma devam eder, QS gen aktivasyonu
- Hücreler arası iletişimi sağlayan kimyasal sinyaller göndermeye başlar (QUORUM SENSING)
- Sinyal yoğunluğu belli bir düzeye ulaşınca ekzosellüler polimerik madde (EPS: slime) salınımını sağlayan genetik mekanizmalar aktive olur

Biyofilm oluşumunun

2. basamağı(devam)

- Mikroorganizma agregatları oluşur, çevresi matriks ile sarılıdır
- Matriks yapısının %50-90'nını EPS, kalanı proteinler, eDNA vb moleküllerden oluşur
- EPS yapışkan oldukça hidrate bir maddedir,
- EPS planktonik bakterileri, gıdaları, mineral, kristal, korozyon maddelerini yakalar
- Giderek bu yapı tabakalar halinde kalınlaşır

Biyofilm oluşumunun 3. basamağı

- Biyofilm kalınlığı 10 μ m yi aştığında başlar
- I. Matürasyon basamağı da denir
- Tipik olarak biyofilm mikrokolonileri
 - % 10-25'i bakteri hücrelerinden
 - % 75-90'ı EPS matriksten oluşur

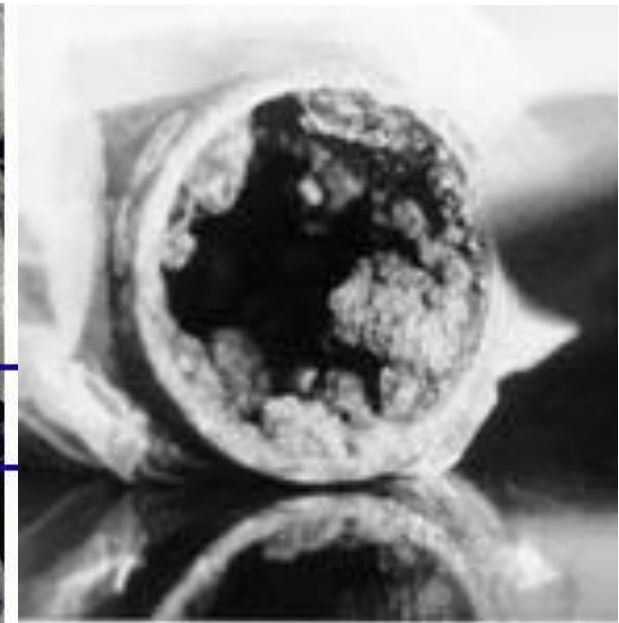
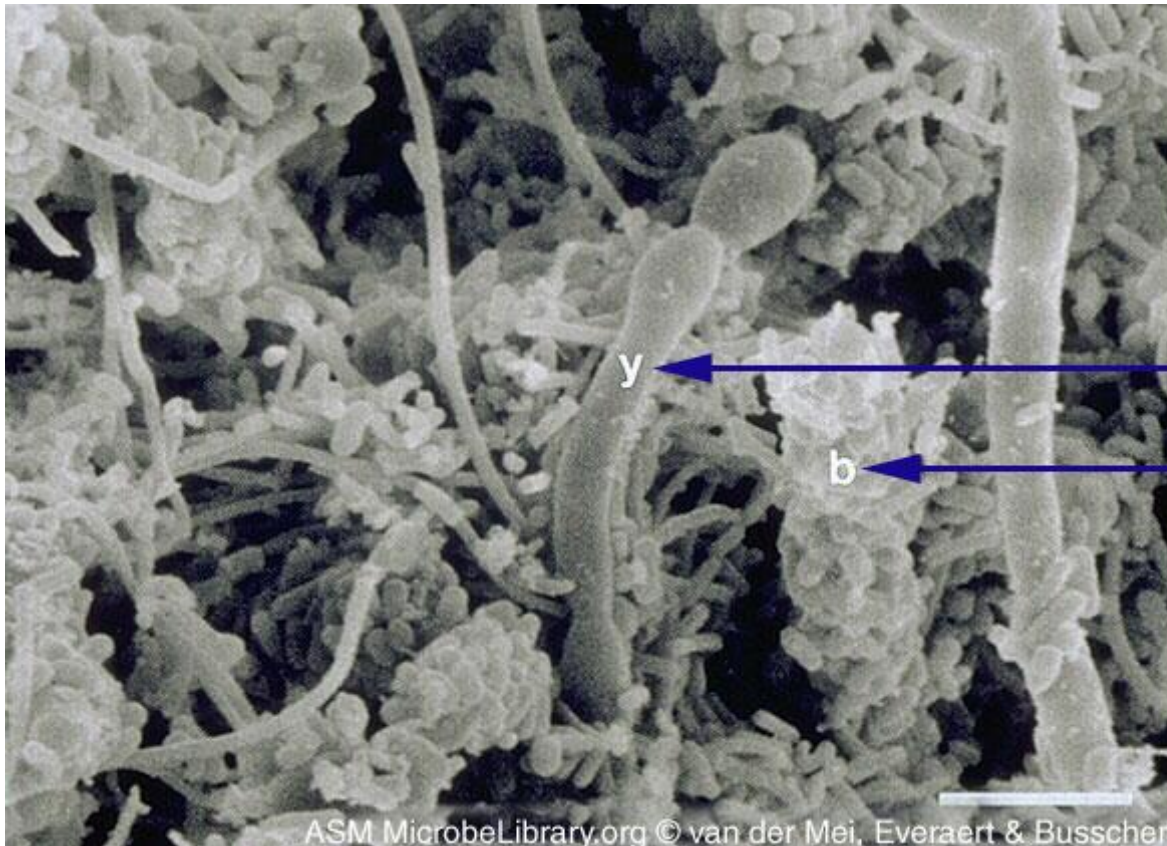
Biyofilm oluşumunun 4.ve 5. basamağı

- Biyofilm kalınlığı $100\mu\text{m}$ 'yi aştığında 4. basamak ve 2. olgunlaşma dönemi denir
- Biyofilmin 5.basamağında hücre ayrılmaları görülür
 - 4.aşamadan birkaç gün sonradır
 - Bakterilerin bazıları planktonik forma dönüşür
 - Biyofilmi terkeder, yeni yüzeylere doğru yola çıkar
 - Biyofilm bir mikroorganizma yuvasıdır

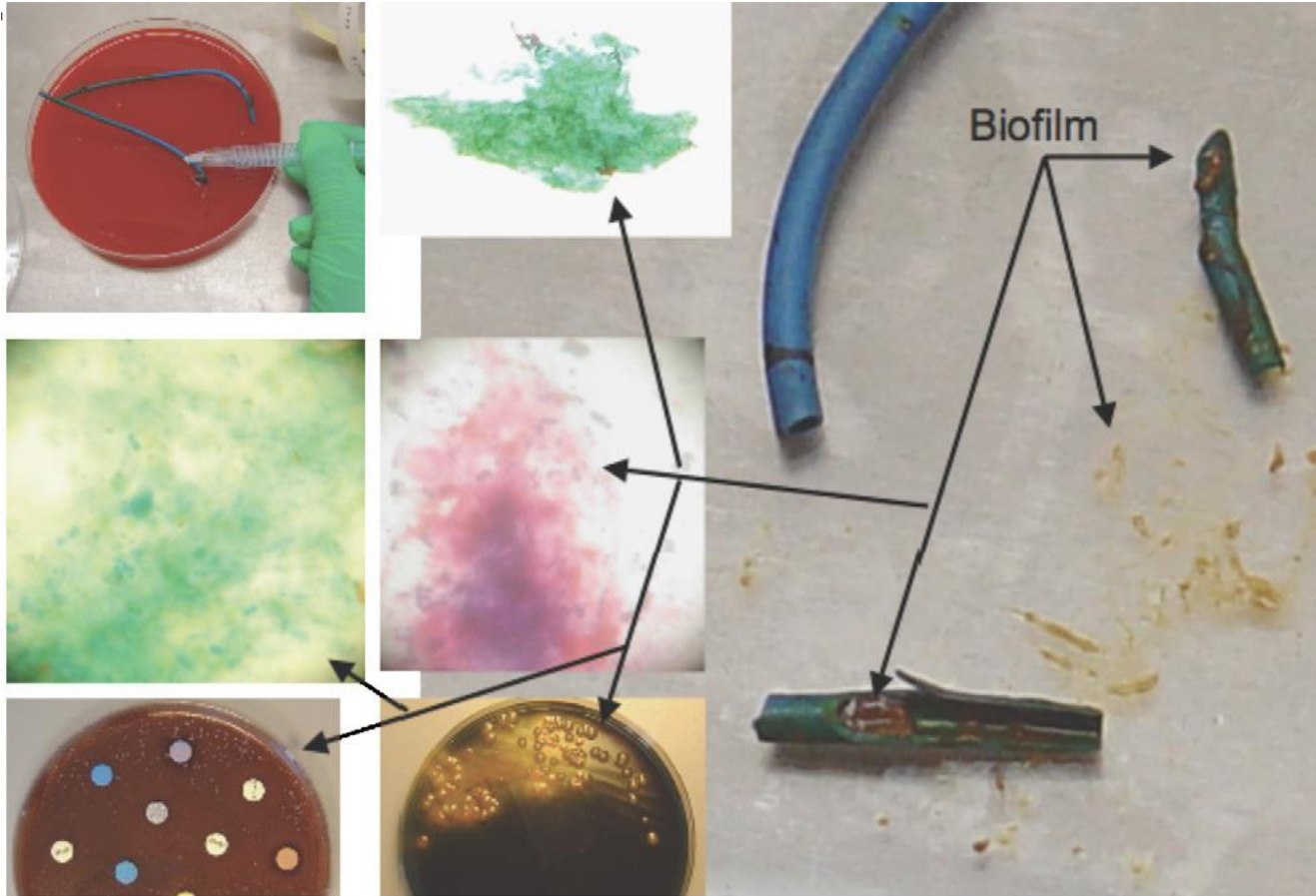


Biyofilm hareketleri: Koparak ayrılma dışında, kayarak, Yuvarlanarak, saçılarak, akarak da yayılır

Biyofilm morfolojisi



Safra yolu stendinde biyofilm



Kan kültüründeki ile aynı E.coli üremiş

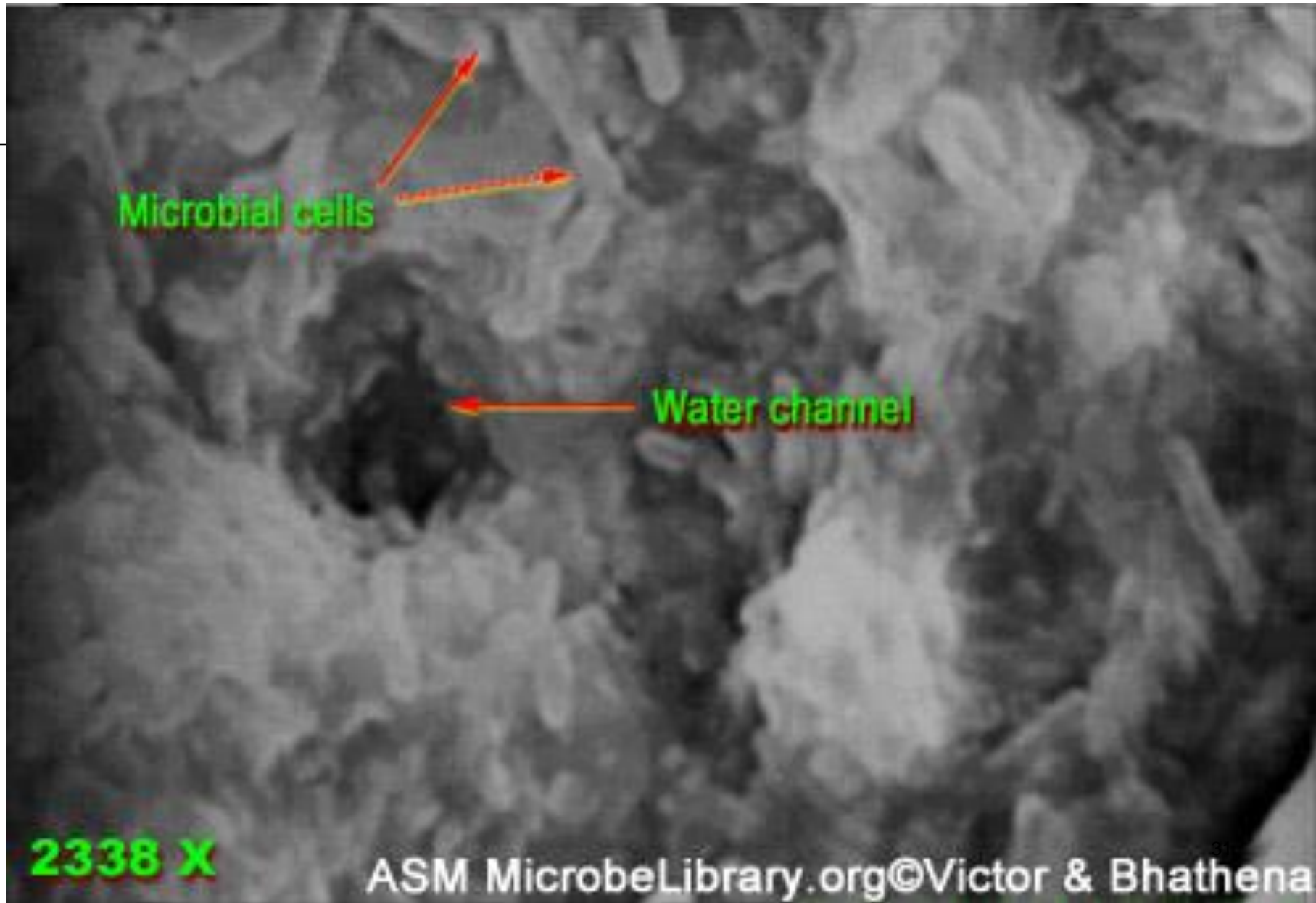
Intern J Antimicrob Agents 35 (2010) 322–332

Biyofilm özellikleri

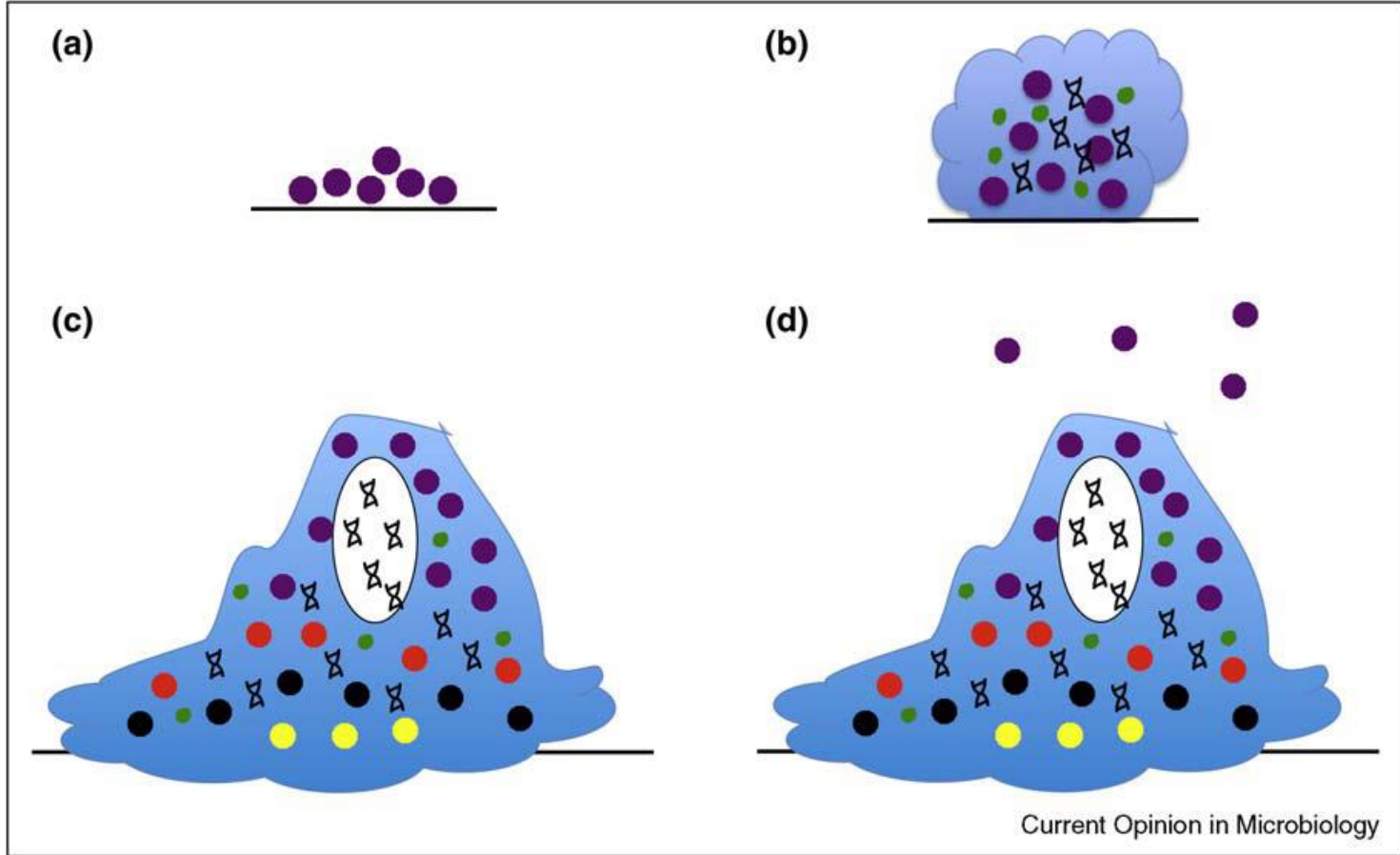
- Biyofilm içindeki bakteri topluluğu
 - Planktonik bakterilerden farklı bir fenotip çizer
 - Sesil bakteri de denir
 - Birbirleriyle iş birliği içinde
 - İş bölümü yaparak
 - Gıda paylaşımı ile
 - Koordine bir şekilde
 - Kendine ait metabolizması ile
 - Adeta çok hücreli bir canlıyı taklit eder

Biyofilm mimarisi

- **Oldukça karmaşıktır**
- **Matriks içindeki bakteri toplulukları yapısal ve metabolik olarak oldukça heterojendir**
- **Bu çok hücreli topluluğun değişik katmanlarında aynı anda hem aerop hem anaerop süreç çalışır**
- **Olgun bir biyofilmde besinlerin ve suyun dolaştığı su kanalları vardır**
- **Besinlerin dağıtımında ve atık gideriminde görev gören ilkel bir dolaşım sistemidir**



Biyofilm oluşumunun řematik izimi



**Sarı: Ölü bakteriler, Siyah: dormant bakteriler, Mor: aerop,
Kırmızı: anaerop/mikroaerobik**

Biyofilm bakterileri

- Açlık sınırında yaşar
- Yavaş çoğalır, antibiyotik etkisinden korunur
- Gıdaları su kanallarından molekül difüzyonu ve sıvı akımı ile temin eder
 - Sıvı akım gücü bakteri üreme kontrolünde rol oynar
 - Çevreye yakın olanlar daha hızlı ürer
- Çevrelerindeki matriks bunları dış etkilerden korur
 - Antibiyotik
 - Antikor
 - Toksik maddeler

Quorum sensing

- Hücreler arası sinyal sistemi
- Hücre dışı kimyasal moleküllerle, feromonlarla hücreler arası iletişim ağı
- Yüzeye tutunan bakteriler çevrede kaç bakteri olduğunu anlayabilir bu sistemle
- Çevresinde yoğun bakteri olan bir bakteri o topluluğa katılma eğilimi gösterir
- Hücre dışı enzim ve hücresel lizinlerin üretimini düzenler
- Biyofilm oluşumunda temel bir rolü var



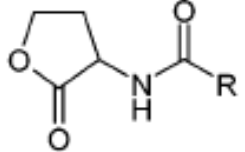
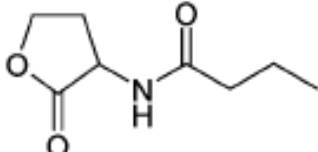
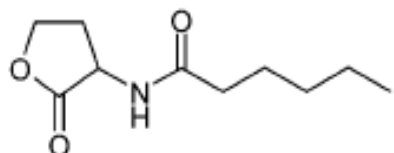
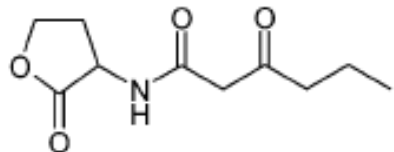
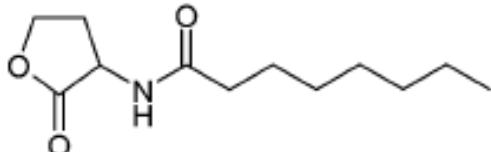
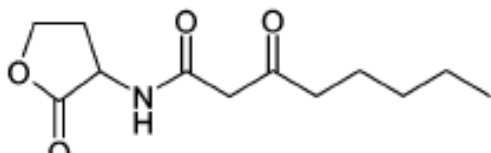
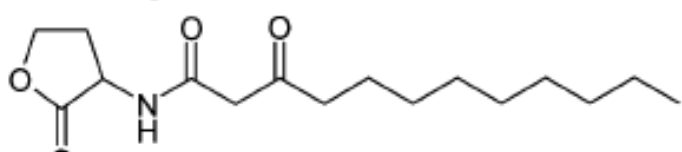
Bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla 3 tip sinyal molekülü kullanıyor

1. Acyl-homoserine lactones (AHLs) → Gram negatif

2. Autoinducer peptides (AIPs) → Gram pozitif

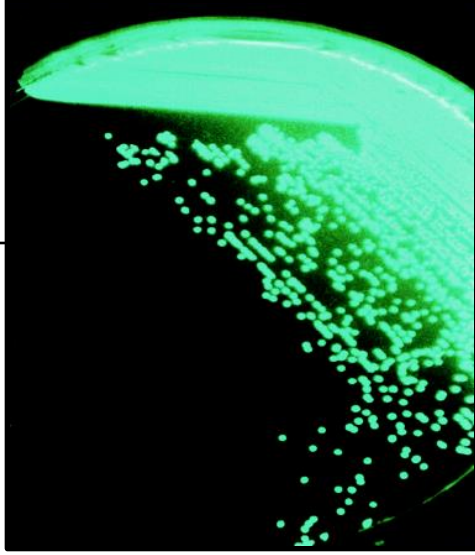
3. Autoinducer-2 (AI-2) → Gram negatif ve gram pozitif

Gram (-) bakterilerin sinyal molekülleri

	Structure	Microorganism
N-acyl-homoserine lactone (AHL)		
N-butyl-homoserine lactone (C4-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (RhII)
N-hexanoyl-homoserine lactone (C6-HSL)		<i>Chromobacterium violaceum</i> (CvII)
N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL)		<i>Vibrio fischeri</i> (LuxI)
N-octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL)		<i>Burkholderia cepacia</i> (Cepl)
N-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Tral)
N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LasI)

Quorum sensing

- Bakterilerin sosyal bir yaşamları olduğu ilk defa 1970'lerin başında bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* üzerinde yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıktı



•Bu bakteride biyolüminesens (biyoışıma)'in kollektif bir çalışma ile oluşturulduğu keşfedildi



•*Vibrio fischeri* kökenleri yalnız olduklarında ışık üretemeyip ancak çoğalıp belli bir sayıya ulaştıklarında, hepsi birden aynı anda ışık üretmeye başlıyorlar

•Denizde yaşayan kafadan bacaklı (bobtail squid gibi) canlılar üzerinde

Quorum sensing

- Birçok gram negatif
- Gram pozitif bakteriler
- İnsan, hayvan ve bitki patojeni tarafından yaygın olarak kullanıldığı anlaşıldı

Quorum sensing

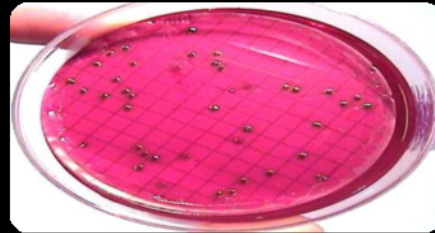
Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal molekül ağı:

- Koloni oluşumunu kontrol eder**
- Üreme hızını düzenler**
- Türler arası iletişimi sağlar**
- Toksin üretiminde rol alır**
- İnvazif özellikleri belirler**

SOCIO-MICROBIOLOGY

BIOFILMS AND QUORUM SENSING IN INFECTIOUS DISEASES

Dr.T.V.Rao MD



Biyofilm enfeksiyonlarının tanısı

- Tanı sorunludur, enfeksiyon kliniği varsa ve;
 - Kültür negatifse
 - Mikroskopi pozitif kültür negatifse
 - Koloni sayısı az ise
 - Antibiyotik direnci varsa
 - Sürüntü örneği ve kültür negatifse biyofilm enfeksiyonu akla gelmelidir

Çıkarılan kateterde biyofilm saptama yöntemleri

- Kateter ucu Gram boyama (Cooper)
- Kateter ucu akridin orange boyama
- Scanning E/M
- Maki yöntemi

Biyofilm gösterme yöntemleri

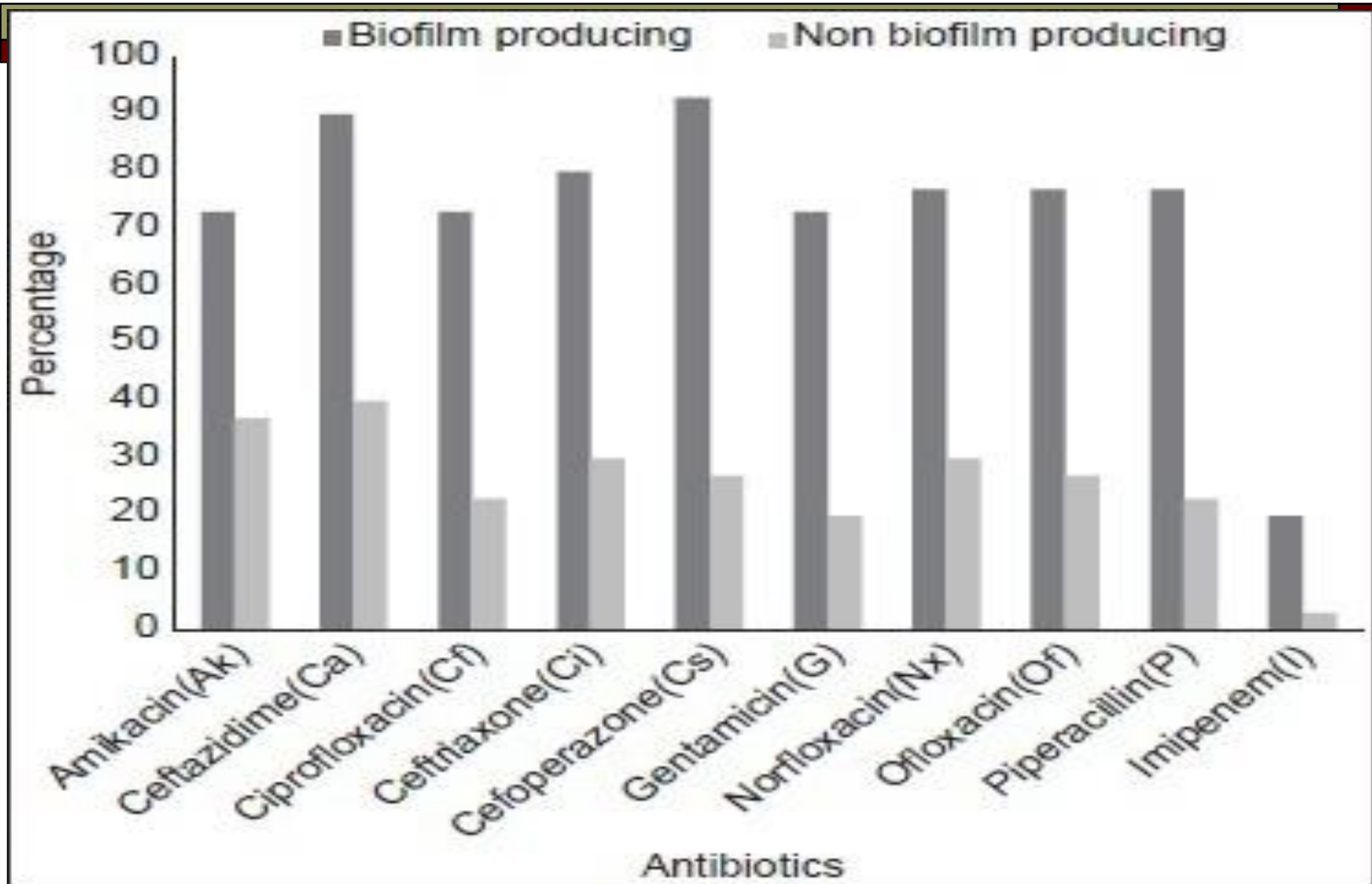
- TCP metodu (doku kültürü plak yöntemi)
- Tüp yöntemi
- Kongo kırmızısı agar yöntemi
- Bioluminesans inceleme
- Reflecting spectroscopy
- Piezoelektrik sensor

Biyofilm içindeki mikroorganizmalar dirençlidir

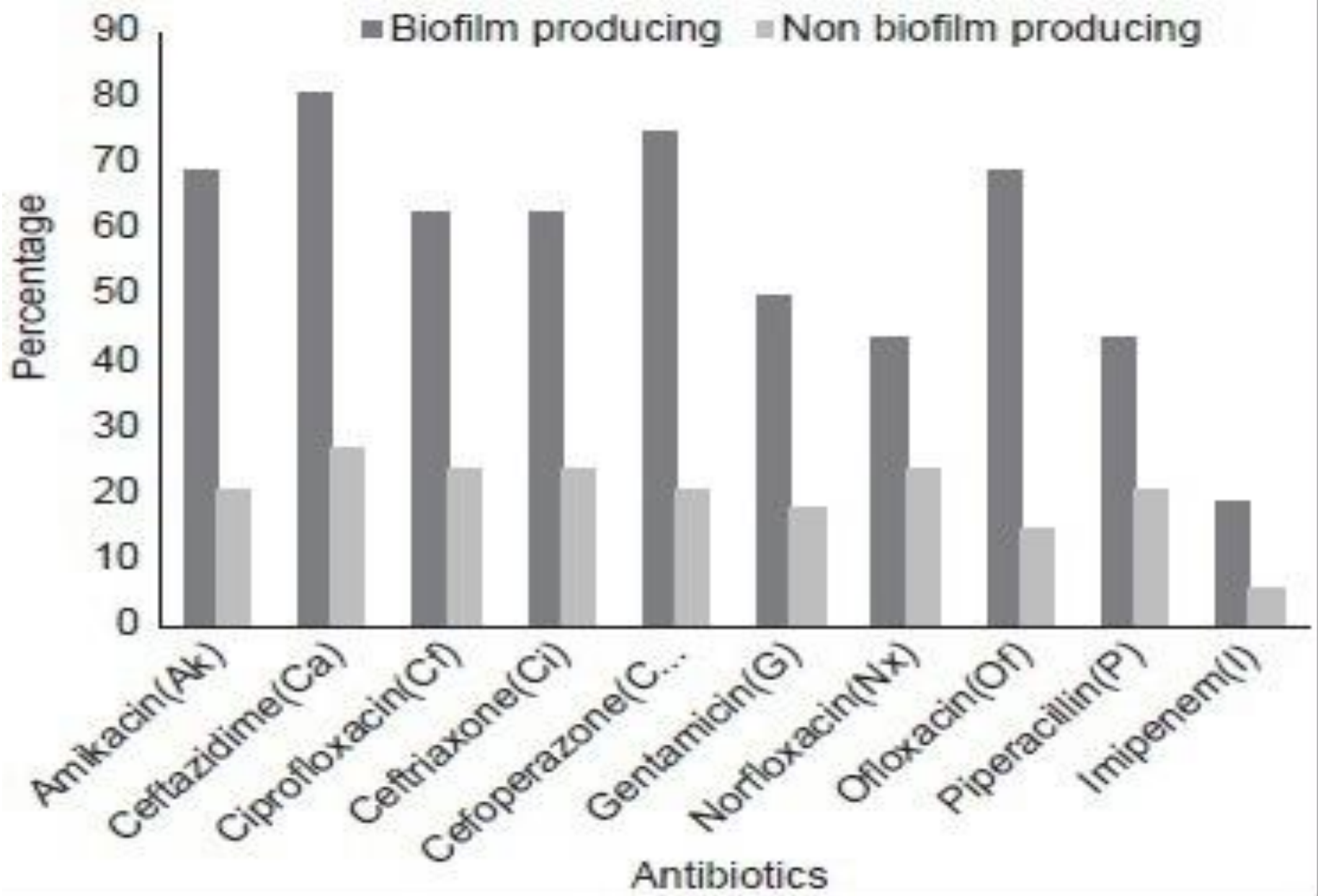
- Antimikrobiyal ilaçlar
- Dezenfektanlar
- Germisidler güç etkiler

Bakteri	Antibiyotik	Planktonik fenotip MIC/MBC (mg/L)	Biyofilm fenotipi MIC/MBC (mg/L)
S.aureus NCTC 8325-4	Vankomisin	2 (MBC)	20 (a)
P.aeruginosa ATCC 27853	İmipenem	1 (MIC)	> 1024 (b)
E.coli ATCC 25922	Ampisilin	2 (MIC)	512 (b)
P.pseudomallei	Seftazidim	8 (MBC)	800 (c)
Streptococcus sangius 804	Doksisiklin	0.063 (MIC)	3.15 (d)

(a): %99 azaltan konsantrasyon, (b): Minimum biofilm eradikasyon konsantrasyonu
(c): yaklaşık %99 azaltan konsantrasyon, (d): %99.9 azaltan konsantrasyon



Acinetobacter baumannii'nin biofilm yapan ve yapmayan kökenlerinin aby direnci



Pseudomonas aeruginosa'nın biofilm yapan ve yapmayan kökenlerinin aby direnci

Biyofilm içindeki bakteriler

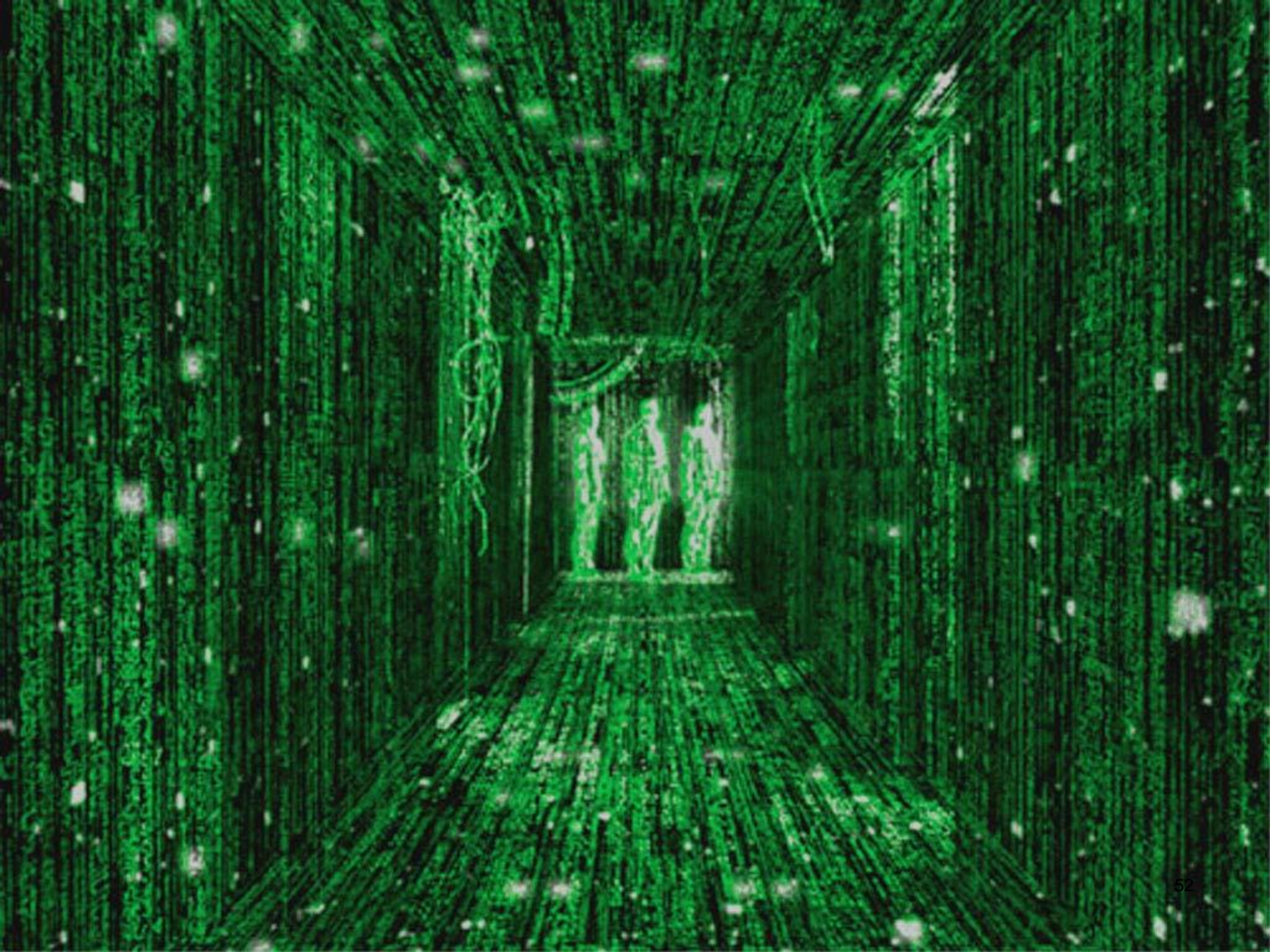
- Yüzeyde olan bakteriler antibiyotikten etkilenir
- Derindekiler bir enfeksiyon odağı olarak kalır

Biyofilm mikroorganizmalarının antimikrobiyallere direnç nedenleri

- Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksine penetrasyonunda güçlük
- Mikroorganizma üreme hızındaki azalma
- Oluşmakta olan biyofilme bağlı fizyolojik çevre değişiklikleri



Lacimeh
STUDIOS



Matrikse penetrasyon güçlüğü

- Matriks antibiyotiklerin biyofilme difüzyonunda bariyer
- *P.aeruginosa* enfeksiyonunda;
 - Siprofloksasin biyofilm yoksa 40 sn.de
 - Biyofilm varsa 21 dk.da enfeksiyon yerine ulaşıyor
 - Bu bakteriden elde edilen alginatın %2 suspansiyonu GM ve tobramisin difüzyonunu engellemiştir, alginat lyase bunu gidermiştir

Matrikse penetrasyon güçlüğü

□ Planktonik bakteriler;

- Biyofilm bakterilerine göre tobramisin etkisine 15 kez daha duyarlı

□ *S.epidermidis* slime tabakası;

- *Bacillus subtilis*'in bir çok antibiyotiğe karşı duyarlılığını azaltmıştır

- Glikopeptidler çok etkilenmiştir

- Rifampisin, klindamisin, makrolidler az etkilenmiştir

□ Beta laktamlar;

- Aminoglikozidlere göre matrikse daha kolay ulaşmıştır

Biyofilm bakterilerinin üreme hızı

- Serbest bakterilere göre daha yavaş çoğalırlar
- Oksijen düşükse üreme yavaştır
 - Çoğalma
 - Protein sentezi
 - Metabolik aktivite
- Biyofilm yüzeyindekiler hızlı, ortadakiler yavaş ürer.
- Yavaş üreme aby etkisini azaltır

yavaştır

Biyofilm bakterilerinin üreme hızı

- Bakteri ne kadar hızlı ürerse aby o kadar etkili
- Bir çalışmada biyofilm içeren balgamda *P.aeruginosa* üreme hızı 2-3 saat bulunmuştur
- Yeni (<10 gün) oluşmuş biyofilm bakterileri aby etkisine daha duyarlı
- Cerrahi profilaksi etkili

Fizyolojik çevre değişiklikleri

- Biyofilm bakterileri stres durumundadır
 - DNA harabiyeti
 - Reaktif oksijen varlığı
 - Osmotik baskı
 - Gıda azlığı
 - Toksik metabolitler
- stres yaratır

Fizyolojik çevre değişiklikleri

- Stres durumunda gen regülasyonunu sağlayan rpoS (RNA polimeraz sigma) genleri aktive olur
- rpoS mikroorganizmanın çoğalması yavaşlayınca aktive olur
- Aşırı mutasyona uğrayan yeni fenotip ortaya çıkar

Fizyolojik çevre değişiklikleri

- Endojen reaktif oksijen (ROS)yükü artar
- Enflamasyonla p.n.1 lerin ROS maruz kalır
- Mutasyon artışı aby direncini indükler
 - AmpC tipi beta laktamazlar → Beta laktam
 - gyrA mutasyonları → Kinolon
 - Eflux pompa sistemi artışı →
 - Çoklu ilaç eflux pompa sistemi → Tobramisin
 - Pmr sistem mutasyonları → Kolistin

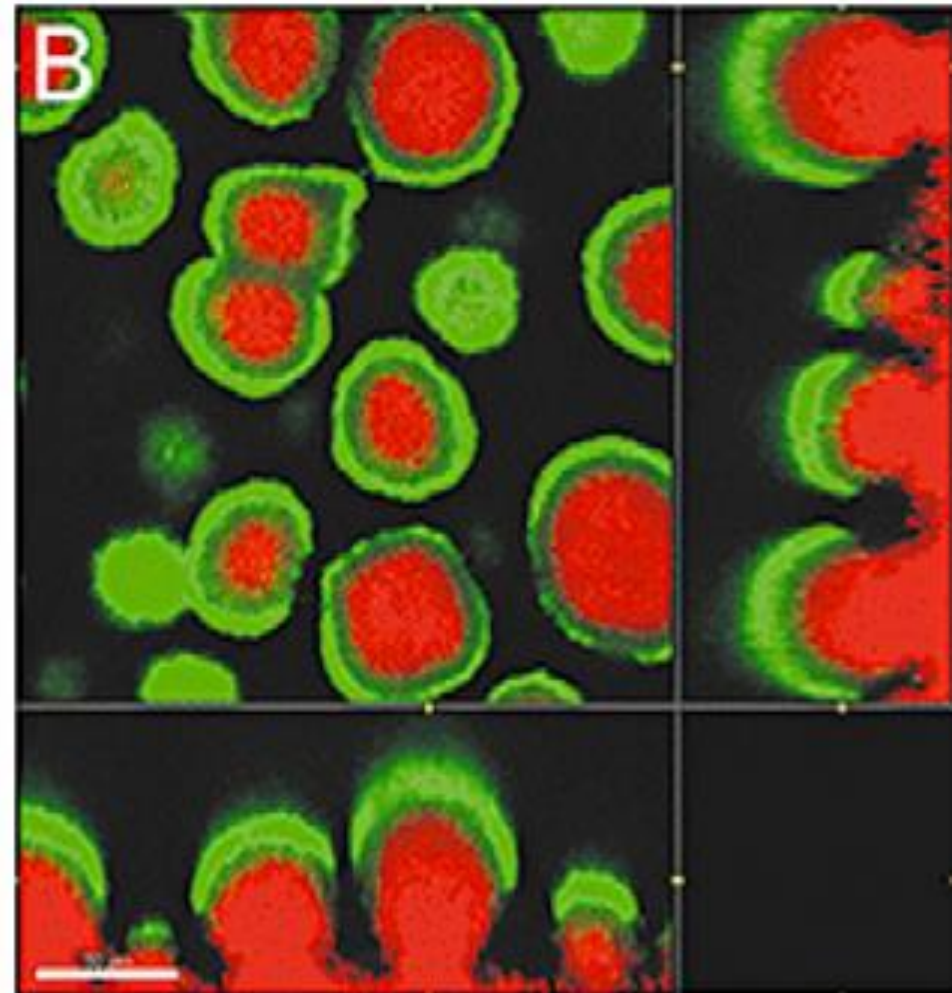
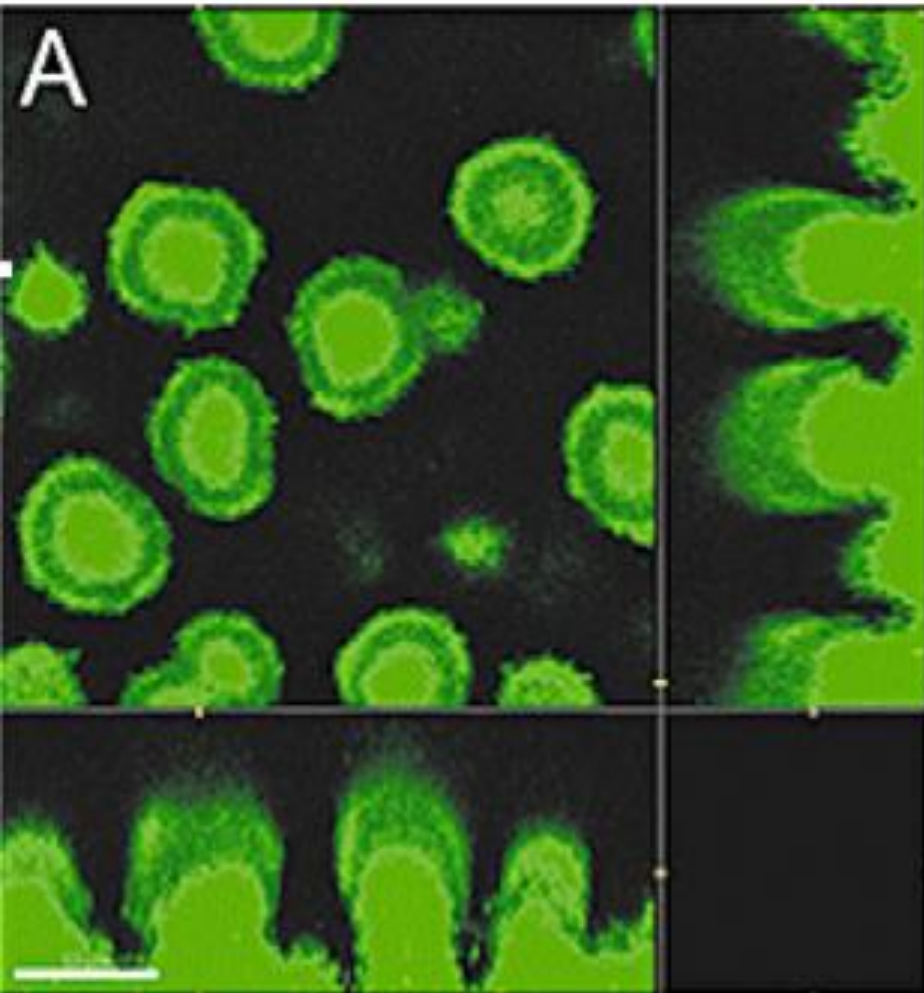
Kolistin ve tobramisin

- Kolistin *P.aeruginosa*'nın bölünmeyen formuna etkili tek aby.
- Biyofilm yüzeyindekilere etkili olmayabilir, bunlara da kinolonlar etkili
- İn vitro kolistin+siprofloksasin tüm tabakalara etkili
- Bu kombinasyon kistik fibrozisli hastalarda da etkili

control

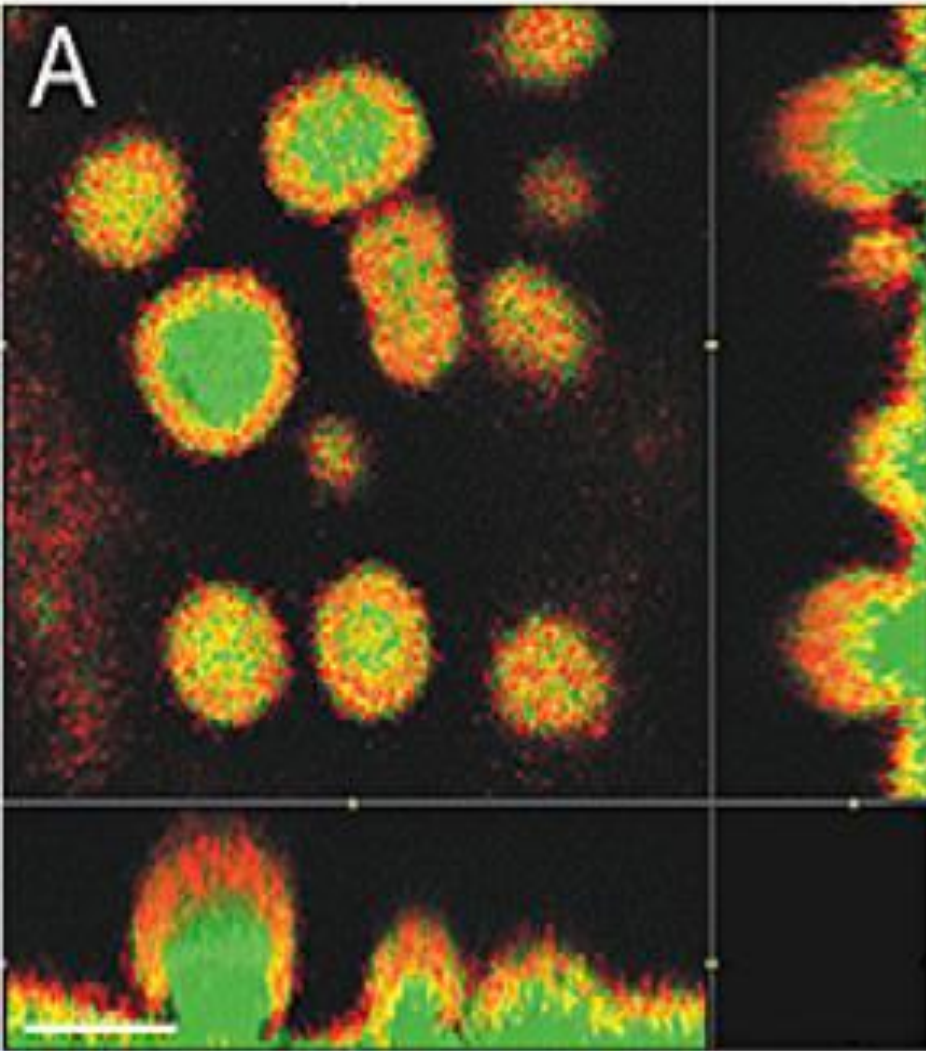
+ colistin

P. aeruginosa PAO1

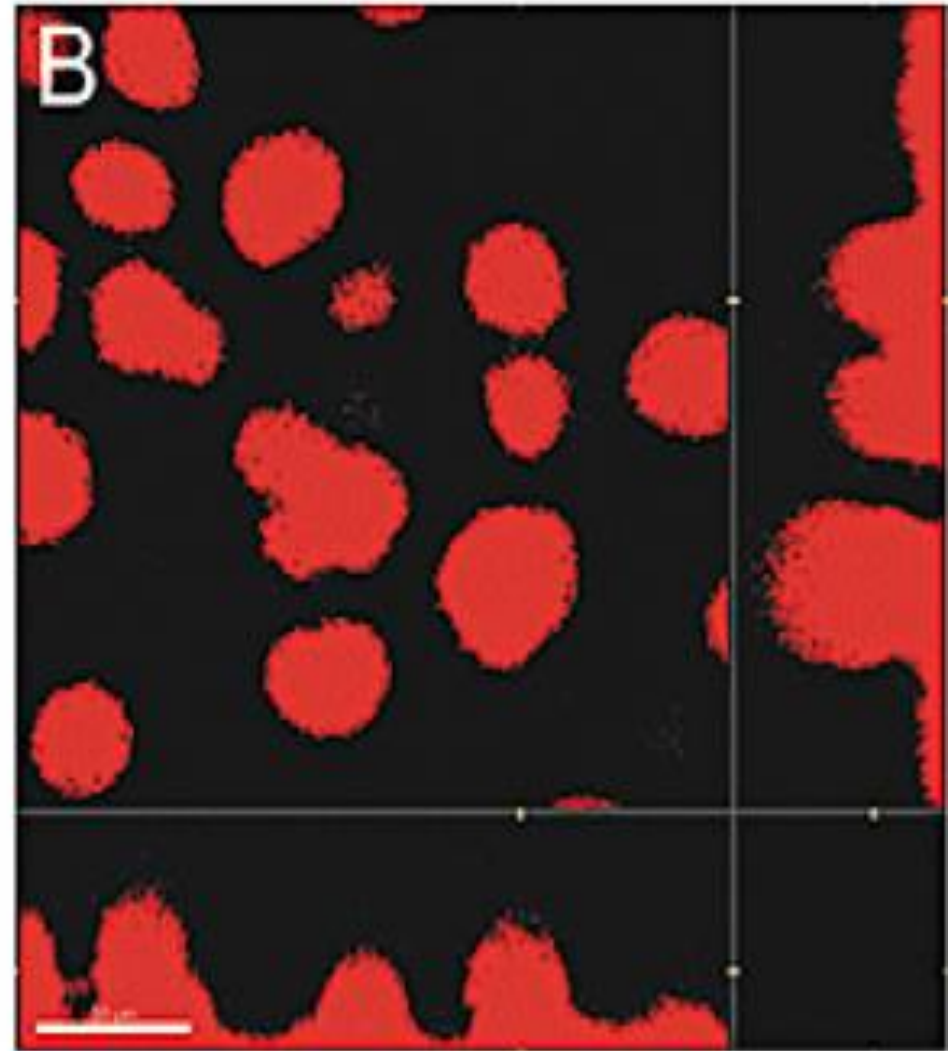


Yeşil renk: Canlı bakteriler
Kırmızı renk: Ölü bakteriler

+ ciprofloxacin



+ ciprofloxacin + colistin



Yeşil renk: Canlı bakteriler
Kırmızı renk: Ölü bakteriler

Kistik fibrozisli hastada akciğerde P.aeruginosa enf profilaksi ve tedavisi

- Hijyen ve izolasyon
- Erken eradikasyon tedavisi
 - Oral siprofloksasin
 - Nebülüze kolistin 3 hafta
 - Nebülüze tobramisin: 3 ay
- Nebülüze DNaz
- Sürekli antibiyotikle baskılama tedavisi

Antibiyotik tedavisinin güçlükleri

- İlacın biyofilm penetrasyonundaki güçlük
- Biyofilm bakterileri yavaş üredikleri için aby etkisine daha az duyarlıdır
- Yüzeyde olan bakteriler aby.ten etkilenir
- Derindekiler bir enfeksiyon odağı olarak kalır

Biyofilm eradikasyon yöntemleri

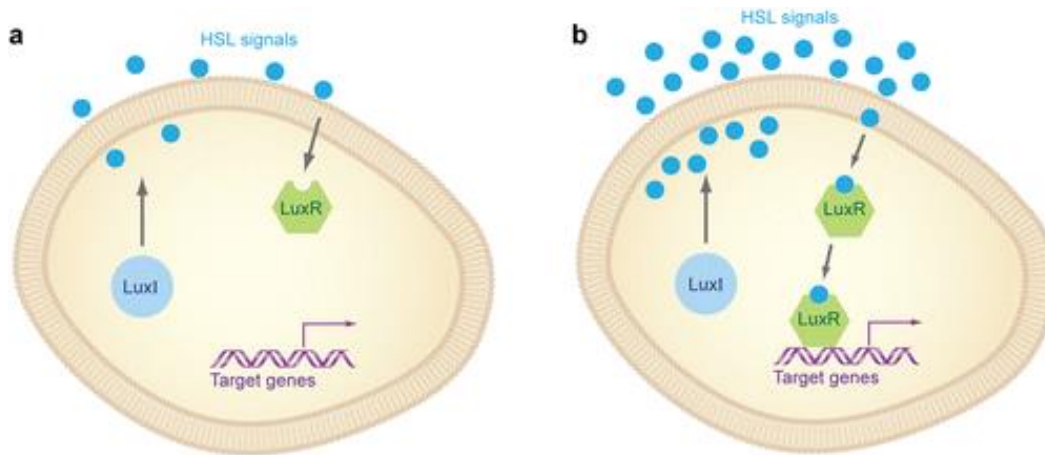
- ❑ Mekanik (sonikasyon vb) harabiyet/uzaklaştırma
- ❑ İmmün modülasyon (düşük doz azitromisin, doksisisiklin)
- ❑ Lokal antimikrobikler (gümüş veya tobramisin)
- ❑ Biyofilm penetrasyonu iyi olan ilaçlar (Örn: Rifampisin, ekinokandinler)

Quorum sensing inhibisyonu için kullanılan stratejiler

Sinyal molekülünün
(AHL autoinducer)
üretiminin
önlenmesi

Sinyal molekülünün
yıkılması (AHL sinyal
molekülünün hidrolizi)

Sinyalinin
alınmasının
önlenmesi (LuxR-
Tipi reseptör
proteine
bağlanacak
analogların
geliştirilmesi)



QS inhibitörleri

- 1- Doğal İnhibitörler
- 2- Sentetik Analoglar
- 3- Bazı İlaçlar

QS inhibitörleri

- *P.aeruginosa* QS molekülleri;
 - Azitromisin ve siprofloksasin sub inhibitör dozlarında inhibe ediliyor
 - Bu iki aby kistik fibroziste kombine kullanılıyor
- Sarımsak ekstraktları dirençli biyofilm bakterilerini antibiyotiklere duyarlı hale getiriyor

