

Hipokloröz asit (Crystalin®)'in biyofilm
üreten *Staphylococcus aureus* , *Candida*
albicans ve *Pseudomonas aeruginosa*
suşlarında biyofilm üzerine etkisi

SERHAN SAKARYA,
M. BÜLENT ERTUĞRUL,
Ş. BARÇIN ÖZTÜRK,
NECATİ GÜNAY



Giriş

Hipokloröz Asid



- Aktive olmuş nütrofiller,



- Ciddi mikrobisidal etkisi vardır.
- Bu etkisi nedeniyle;
 - Yüksek düzey dezenfektan olarak kullanılmaktadır.
 - İnsan, hayvan ve bitki enfeksiyonlarının eradikasyonunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir

Crystalin



- pH : 7.0 ± 0.5
- Stabilite: 24 ay (organik materyal ve direk güneş ışığı)
- ORP: 900 ± 50 mV
- Minerallenme: 0,60 - 1.0 gr/l

Diyabetik ayak



- Diyabetin neden olduđu kronik enfeksiyonlarda ;
 - Hiperglisemi, hipoksi ve endotel hasarı enfeksiyon oluşturan mikroorganizmanın fenotipi üzerine etki eder.
- ↓
- “Biyofilm” oluşturan mikroorganizmaların ortama hakim olmasına neden olur,
 - ✦ Ortamda oluşan patolojik yapının indüksyonu?
 - ✦ Bu fenotipe sahip mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturabilmelerinde kolaylık?
- ↓
- Antimikrobiyal etkinlik azalır
 - Cerrahi debridman gereksinimi artar



Amaç



- Crystalin'in diyabetik ayak enfeksiyonlarında etkili olan etkenlere;
 - Zaman öldürme (Time Kill) ile direkt etkilerinin belirlenmesi,
 - Biyofilim eradike edici konsantrasyonlarının belirlenmesi
 - Biyofilm eradikasyonunun canlı mikroorganizma miktarı üzerine etkisi



Metod

Kullanılan mikroorganizmalar



- *Staphylococcus aureus* ATCC 35556,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (PAO-1)
- *Candida albicans* ATCC 90028 ve

Zaman ölüm (Time Kill)



- 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 dilüsyonda Crystalin ve PBS içinde 10^5 /ml patojen hazırlandı
- 0, 10, 15, 30, 60 ve 90. dakikalarda katı besiyerine ekilerek 24 saat 37°C de inkübe edildikten sonra üreme olup olmadığı kontrol edildi.

Biofilm Oluşumu



- *C. albicans* %8 glukozlu sıvı Sabouroud besiyerinde (SDA); *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşları da %0.25 glikozlu Triptik soy sıvı besiyerinde (TSB) O'Tooler (1) tarafından bildirilen teknik kullanılarak 96 lık mikropatlara her bir patojen için 2 ayrı plakta 2 şer sıra ekildi.
- 1. plağa 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 oranında besiyer ile dilüe edilmiş Crystalin su ve sadece besiyer eklenerek biyofilm oluşumu için 48 saat 37 °C de inkübe edildi
- 2. plak üzerine sadece besiyer eklenerek 48 saat 37 °C de inkübe edildip biyofilm oluşturuldu. Biofilm oluşumundan sonra PBS ile nazikçe üç kez yıkanıp 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 oranında PBS ile dilüe edilmiş hipokloröz asit ve sadece PBS, biyofilm oluşmuş kuyucuklara eklenerek 24 saat 37 °C de inkübe edildi.
- Plaklar PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra 200µl %1 lik kristal viole eklenerek 15 dk boyanması için beklendi ve tekrar üç kez yıkandı. Kuyucuklar içinde biyofilim tabakasını boyayan kristal viole, etanol-aseton (80:20) ile çözümlenerek kuyucuklar 595 nm de spektrofotometrik olarak OD değerleri belirlendi.

Biofilm altındaki canlı mikroorganizma üzerine etki



- Biyofilm oluşumu için kullanılan metod kullanılarak her iki plağın inkübasyon sonrasında kuyucuklardan 1. serisi mekanik olarak kazınıp karıştırılarak biyofilm altındaki üreme olup olmadığını test etmek için katı besiyerine ekildi,
- 24 saat $37^{\circ}C$ de inkübe edildikten sonra üremenin olmadığı konsantrasyonlar belirlendi



Bulgular

Zaman öldürme (Time Kill)



Kons	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	-	-
1/2	-	-	-
1/4	-	-	-
1/8	-	-	-
1/16	-	-	-
1/32	-	-	-
1/64	-	-	-
0	+	+	+

Zaman öldürme kontrol (0) ile karşılaştırıldığında tüm dozlarda 0. dk da etkin bulundu.

Biyofilim eradike edici konsantrasyon



Kons	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	0.467	0.405	0.654
1/2	0.484	0.47	0.586
1/4	0.452	0.432	0.993
1/8	0.88	1.026	1.07
1/16	0.806	1.046	0.932
1/32	0.854	0.906	1.048
1/64	0.892	0.832	1.731
0	0.887	0.888	1.954

Biyofilm oluşumu sonrasında Crystalin uygulaması

Biyofilm altındaki canlı mikroorganizmaya etki



Kons	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	-	-
1/2	-	-	-
1/4	-	-	-
1/8	+	+	+
1/16	+	+	+
1/32	+	+	+
1/64	+	+	+
0	+	+	+

Biyofilm oluşumu sonrasında Crystalin uygulaması ile eradike edilci konsantrasyon

Tüm Sonuçlar



Kons	S. aureus			P. aeruginosa			C. albicans		
	T.K.	B.E.K	M.E.K	T.K.	B.E.K	M.E.K	T.K.	B.E.K	M.E.K
1	-	0.467	-	-	0.405	-	-	0.654	-
1/2	-	0.484	-	-	0.47	-	-	0.586	-
1/4	-	0.452	-	-	0.432	-	-	0.993	-
1/8	-	0.88	+	-	1.026	+	-	1.07	+
1/16	-	0.806	+	-	1.046	+	-	0.932	+
1/32	-	0.854	+	-	0.906	+	-	1.048	+
1/64	-	0.892	+	-	0.832	+	-	1.731	+
0	+	0.887	+	+	0.888	+	+	1.954	+



Sonuç

Saptananlar



1. Çok düşük konsantrasyonlarda bile temas ettiđi anda bakteri için öldürücüdür,
2. Oluşmuş biyofilimi eredike edici özelliği vardır
3. Biyofilim altındaki dormant bakteriyi öldürebilmektedir,
4. Organik maddelerle karşılaştığında aktivitesi hızla düşmektedir,
 1. MIC değerleri
 2. Biyofilimin başlangıçta eredikasyonu belirlenememiştir (besiyer ile karşılaştığı için)

Çalışılması gerekenler



- Enfelamasyon sonrasında aktive olan nötrofillerden salınımı sonucu mikrobisidal etki dışında doku hasarı oluşturup oluşturmadığı tartışmalıdır. Bu nedenle;
 - Doku hasarı oluşturup oluşturmadığı
 - Yara iyileşimi üzerine etkinliği

Belirlenmelidir



Teşekkür ederim