

Diyabetik Ayakta Biyofilm Direnç İlişkisi : Biyofilm Tanı ve Tedavi

Prof. Dr. Neşe Saltoğlu

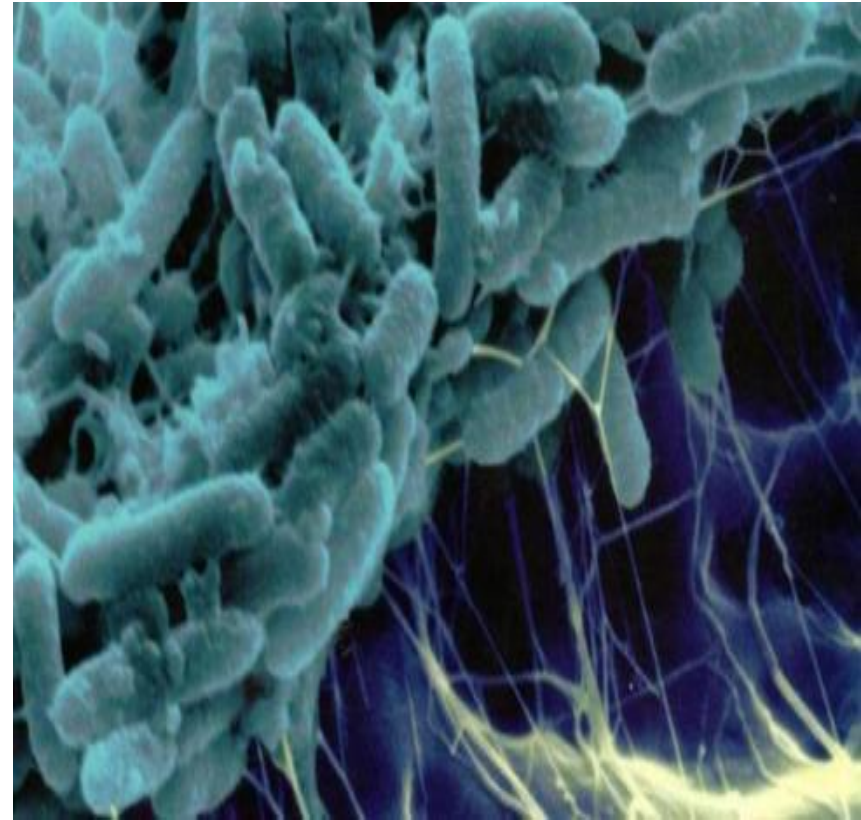
İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

- Biyofilm ve özellikler,
- Biyofilm oluşumu
- Diyabetik ayakta biyofilm
- Biyofilm infeksiyonu tanı
- Biyofilm infeksiyonu tedavi

Biyofilm

- Mikroorganizmalarca oluşturulan; herhangi bir yüzeye/ ara yüzeye tutunan, farklı fenotip gösterebilen, **ekstrasellüler polimerik matriks içerisinde** bulunan mikrobiyal yapı kümeleri



Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15 (2): 167-93

- Biyofilmlerin en belirgin özelliği, polisakkaritler, ekstraselüler DNA (eDNA) ve proteinlerin DNABII ailesini de içeren proteinlerden oluşan **hücre dışı polimerik maddenin** (EPS) varlığıdır

Mol Oral Microbiol. 2017 Apr;32(2):118-130. doi: 10.1111/omi.12157.
Epub 2016 Apr 25.

Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics.

Rocco CJ¹, Davey ME², Bakaletz LO¹, Goodman SD¹

• Biyofilm oluşturan organizmalar planktonik hücrelere göre **daha dirençli**

- oksijen radikalleri,
- dezenfektanlar,
- besin yoksunluğu,
- pH değişiklikleri,
- fagositoz
- antibiyotiklere

Biyofilm oluşturma süreçleri

- Tutunma ve Kolonizasyon
- Yaşanabilir çevre geliştirme
- Topluluk oluşturma

1

Tutunma



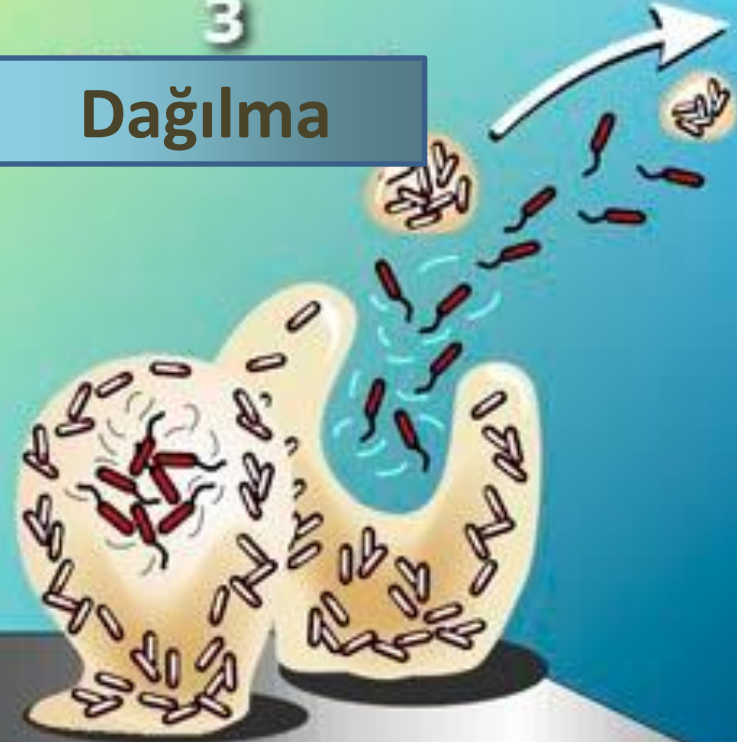
2

Çoğalma



3

Dağılma



Detachment
of clusters

Biofilm streamers

1. Yüzeye geri dönüşümlü bağlanma
2. Yüzeye geri dönüşümsüz bağlanma
3. Mikrokoloni oluşumu
4. Olgun biyofilm oluşumu
5. Planktonik hücrelerin biyofilmden kopması

Heterogeneity

Seeding
dispersal

Mature
biofilm

Early
structure

Aggregate migration

Attachment

Single cells

Biyofilm oluşan durumlar

- Kronik yara enfeksiyonları
- Kronik enfeksiyonlar
 - kronik bakteriyel prostatit, kistik fibröz akciğer enfeksiyonları,
 - periodontit, otitis media
- Yabancı cisim enfeksiyonları
 - protez kapak, santral venöz kateter, üriner sonda, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar.

Biyofilm - antibiyotik ilişkisi

1. Biyofilm içine düşük penetrasyon
2. Bakterilerin çoğalma oranlarında değişiklikler
3. Mikro çevre değişiklikleri

Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9: 34-9.

Antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonu

- EPS ler fiziksel bariyer görevi yapar.
- Penetrasyonunu engeller
 - Özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi
 - Vankomisinin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulması

Biyofilm içine düşük penetrasyon

- *P. aeruginosa*'nın serbest formuna siprofloksasinin penetrasyonu normalde **40 saniye**
- Biyofilm oluşturmuş formunda penetrasyon **21 dakika**

Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(9): 2125-33.

Bakterilerin çoğalma oranlarında değişiklikler

- **Biyofilm üreten bakterilerin çoğalma hızı serbest yaşayan formlara göre çok daha yavaş**

Antimikrobiyaller hızlı üreyen bakterilere daha etkili

Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(9): 1824-8.

- Biyofilm içindeki osmotik çevre değişiklikleri osmotik strese yol açar.
- Bakterideki porin yapısında veya miktarında değişiklikler özellikle beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine girişini kısıtlayabilir
- Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu ile birlikte olduğunda direnç daha da belirginleşmekte

Mikro çevre değişiklikleri

- Biyofilm içerisindeki heterojen yapı antimikrobiyal ajanların öncelikli olarak metabolik olarak aktif hücreleri hedef almaları nedeniyle **antibiyotik duyarlılığında farklılıklara yol açar**
- Özellikle **aminoglikozid, tetrasiklin ve makrolidlerin** antibakteriyel etkisini olumsuz etkiler

Dunne WM, Jr. Buckmire FL. Effects of divalent cations on the synthesis of alginic acid-like exopolysaccharide from mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios 1985; 43(174-175): 193-216.

- Ayrıca, biyofilm mikroçevresinde oluşan pH ve osmotik değışiklikler de antimikrobiyal ilaç etkinliğini değıştirmekte

Leid J. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 2002; 70(11): 6339-45.

- Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketilmesi ve dip kısımlarda anaerob ortamın oluşması özellikle **aminoglikozidlerin etkinliğini azaltır ve direnç gelişebilir.**

Uludağ Altun H, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci.
Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39: 82-88.

Diyabetik Ayak biyofilm ilişkisi

- **Biyofilm varlığı kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir.**
- Ayak yaralarında mikroorganizmalar (% 60 – 80) oranında biyofilm üretmekte
 - Malik A, The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. Diabetes Metab Syndr 2013; 7: 101-7.
- **Biyofilm** oluşumu bakteriyi antibiyotik etkisinden koruyan önemli mekanizma
- **Biyofilm** içerisinde tek bir mikroorganizma türü ya da birden fazla tür olabilir.

Diyabetin kronik yarada biyofilme etkisi

- Glukozun bakteriler tarafından kullanılması ekstrasellüler polimerik substans (EPS) ekspresyonunu artırarak biyofilm oluşumunu artırır .

James G, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in Chronic wounds. Wound Repair Regen. 2008; 16(1): 37-44.

Diyabetik hastalarda fagosit fonksiyonları bozulur

- Biyofilm yapısında fiziksel bir bariyer görevi olan EPS, **fagositik hücrelerin biyofilme penetrasyonunu** azaltır.
- Nötrofiller biyofilm içindeki bakteriyi öldüremez, **ancak salgıladıkları proinflamatuar sitokinler** kronik inflamasyona **neden olur.**

- Biyofilm içindeki **polisakkarid bileşenler** konak antikor ve komplemanı inaktive eder.
- Konak immün faktörlerinde birikim, **immün kompleks hasarına** sebep olur ve **kronik inflamasyonu** başlatır

Percival L, Bowler P. Biofilms and their potential role in wound healing. Wounds. 2004; 16: 234-40..

P.aeruginosa ve *S.aureus* kronik yaralardaki biyofilmden en sık sorumlu bulunan patojenler

Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(4): 322-32.

- Psödomonas ve stafilokoklar ülkemizde de diyabetik ayakta önemli patojenler

- Biyofilm içinde olumsuz yaşam koşullarında bakterilerin büyüme hızının yavaşlatarak durağan fazda yaşamaları nedeniyle antimikrobiyallerin etkinliği azalır

Patricia M. Mertz. Cutaneous Biofilms: Friend or Foe?
Wounds 2003; 15(5): 1-5.

- Olgunlaşmış biyofilm içindeki bakterileri inhibe etmek için 100 – 1000 kat daha yüksek antibiyotik konsantrasyon gerekir.

-

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1771–1776.

- MİK değerlerinin altında kalan antibiyotik konsantrasyonları dirençli suşların seçilmesine ve MDR gelişimine katkıda bulunur

Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL, Xia PY. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2707-2711.

Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3357-3363.

Biyofilm -dezenfektanlara direnç

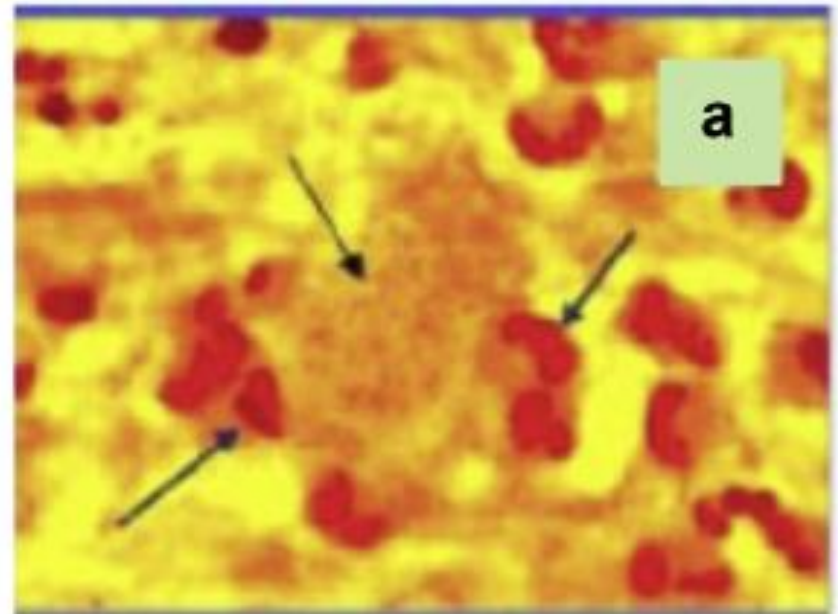
- Biyofilm oluşturan bakteriler serbest üreyen bakterilere göre **dezenfektanlara 10 - 100 kat daha dirençli**
- Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmekte

Biyofilm şüphesi?

- Hastanın anamnezi yol gösterici
 - Akut enfeksiyonlarda biyofilm oluşumu % 6
 - Kronik enfeksiyonlarda biyofilm oluşum oranı % 60'a kadar artmakta

Biyofilm şüphesi?

- Klinik örneklerde ışık mikroskopisi ile incelemede **Gram boyamada** inflamatuvar hücrelerin varlığı ve kendi **ürettikleri matriksle çevrelenmiş mikrobiyal agregatlar** görülmesi biyofilm varlığını düşündürür.



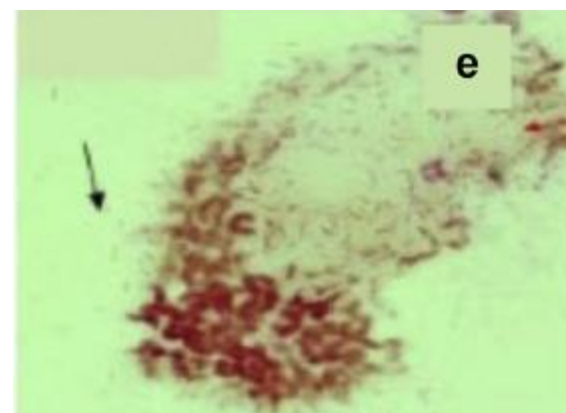
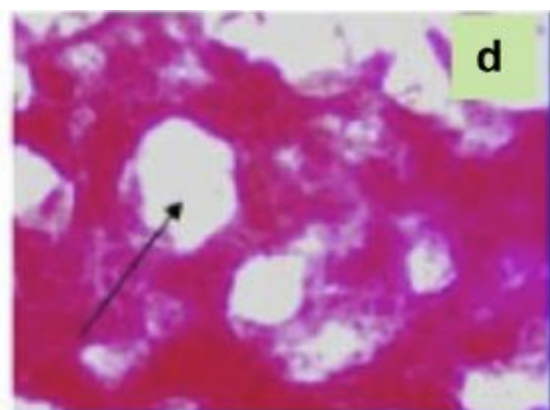
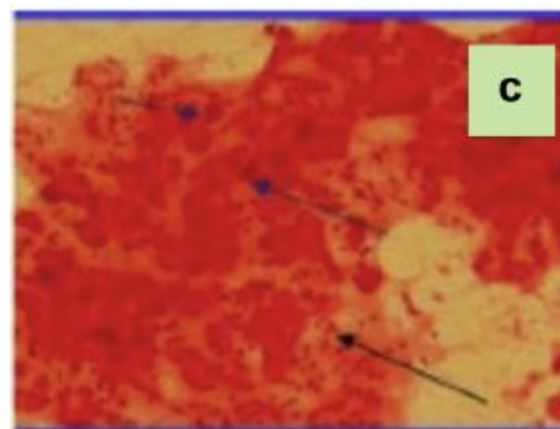
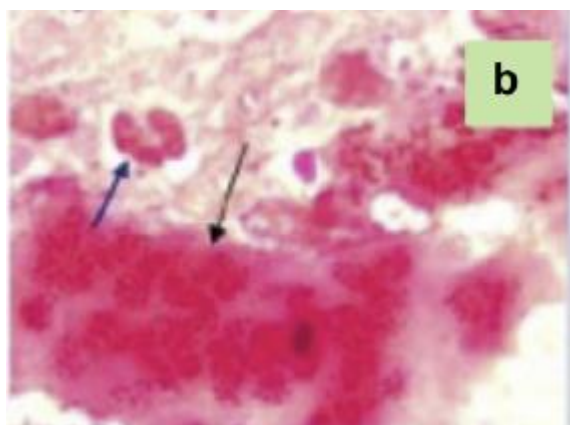


FIG. 2. Biofilm causing tissue infection. Biofilms of *P. aeruginosa* from sputum of cystic fibrosis patients. Gram-staining (a-e), PNA-FISH staining with a *P. aeruginosa* specific probe (f, g). The bacteria and the matrix are visible. A diversity of shapes of the biofilms are seen, a: with surrounding polymorphonuclear leukocytes (arrows), b & c: with a few leukocytes within the alginate matrix, d: with channel-like holes (arrow), e: with liberated planktonic bacteria (arrow). Magnification $\times 1000$ [8] (reproduced with permission).

Biyofilm tespiti

- Bakterilerde biyofilm oluşumu tespitinde in-vivo ve in-vitro yöntemler mevcut
- (Mikroplak yöntemleri, Calgary Biofilm Device Modified Robbins Device, Plug Flow Reactor Systems, CDC Biofilm Reactor gibi)

- Mikroplak yönteminin **tarama yöntemi** olarak seçilmesi uygun !
 - Kullanım kolaylığı, ucuz olması, kısa sürede sonuç alabilme, birçok farklı bakteri ve tedavi rejiminin değerlendirilebilmesi

Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 2010; 83(2): 89-105.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 2000; 40(2): 175-179. .

Biyofilm nasıl saptanmalı?

- Enfekte yaralarda biyofilmi göstermek için en güvenilir yöntem doku biyopsisi
- Alınan doku örneğinin **ezilmesi ve doku homojenizasyonu sağlanması** biyofilm saptanma olasılığını artırır.
 - Biyofilm formasyonu canlı ve küçük, dokularda 4 - 200 μm , yabancı yüzeylerde 5 - 1200 μm boyutlarında

- Biyofilm yapısı içinde bulunan bazı mikroorganizmalar canlı olmalarına rağmen kültürde üretilemeyebilir.
- Moleküler tekniklerden faydalanılmalı

Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam J, et al. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. Cell Rep. 2014 30; 6(2): 293-300.

Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in Staphylococcus aureus growing in biofilms. J Antimicrob Chemother 2013; 68(8): 1812-7.

- Konfokal lazer tarama mikroskopu,
- Elektron mikroskopisi ve
- **PNA FISH** (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) doku örneklerinde biyofilmi göstermek için **en uygun yöntemler**
 - **ANCAK rutin laboratuvarlarda rutin kullanıma uygun değil !**

Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. Clin Microbiol Infect 2015 [E-pub Suppl 1:S1-25],

- Biyofilm tespiti için örnekleri **sonikasyona**
- **maruz bırakmak** vorteksleme ve mekanik kazıma işlemlerine göre çok daha etkili



Rohacek M, Weisser M, Kobza R, Schoenenberger AW, Pfyffer GE, Frei R, et al. Bacterial colonization and infection of electrophysiological cardiac devices detected with sonication and swab culture. Circulation 2010; 121: 1691-7.

. Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Bauer TW. Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study. Clin Orthop Relat Res 2009; 467: 1360-4.

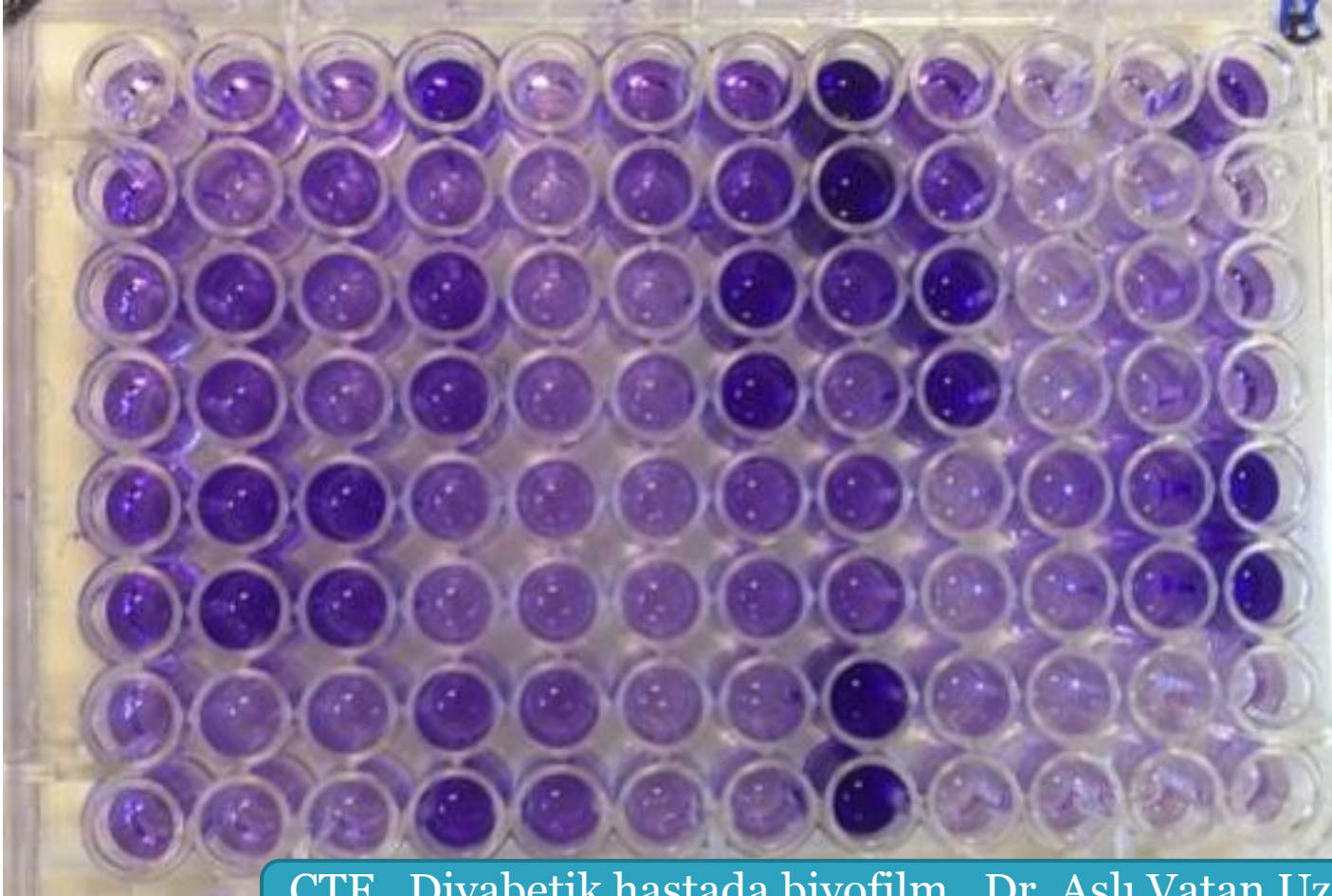
Biyofilm infeksiyonları: sorunları ve sonuçları

- Rutin antibiyotik duyarlılık metotlarıyla serbest büyüyen mikroorganizmaların duyarlılık sonuçları belirlenebilir.
- Serbest mikroorganizmalara ait duyarlılık sonuçları tedavi başarısını öngörmede yetersiz
- Biyofilm üreten mikroorganizmalar antibiyotiklere daha dirençlidir, **ancak duyarlılık ve direnç sınır değerleri belirlenmemiş**
- Biyofilm odağı ortadan kaldırılmadığı sürece rekürrens ve tedavi başarısızlığı!!

- **Diyabetik ayaklı hastalarda biyofilm oluşumu ile ilişkili faktörler**

- Dr. Aslı Vatan Uzmanlık Tezi, CTF 2017.
 - Tez Danışmanı Prof. Dr. Neşe Saltoğlu

Biyofilm üretiminin Modifiye Mikroplak Yöntemi ile değ erlendirmesi



CTF , Diyabetik hastada biyofilm , Dr. Aslı Vatan Uzmanlık tezi,
2017

Çalışmamızda 165 hastadan 339 etken izole edildi.

PEDIS enfeksiyonevrelmesi ve biyofilm ilişkisi		
PEDIS enfeksiyon evresi	n,%	Biyofilm pozitif
Evre 2 (hafif enfeksiyon)	71 (43,3)	50 (35)
Evre 3 (orta dereceli enfeksiyon)	52 (31,7)	35 (33)
Evre 4 (şiddetli enfeksiyon= SIRS)	41 (24,4)	29 (33)

- **Son altı ay içinde tekrarlayan ayak enfeksiyonu** öyküsü olan hastalarda biyofilm oluşumu ile sınırda anlamlı ($p = 0,05$)
 - **Taburculuk sonrası üç ay içinde aynı ayakta tekrar enfeksiyon gelişimi nedeniyle hastaneye yatış arasında ise anlamlı ($p = 0,03$) ilişki**

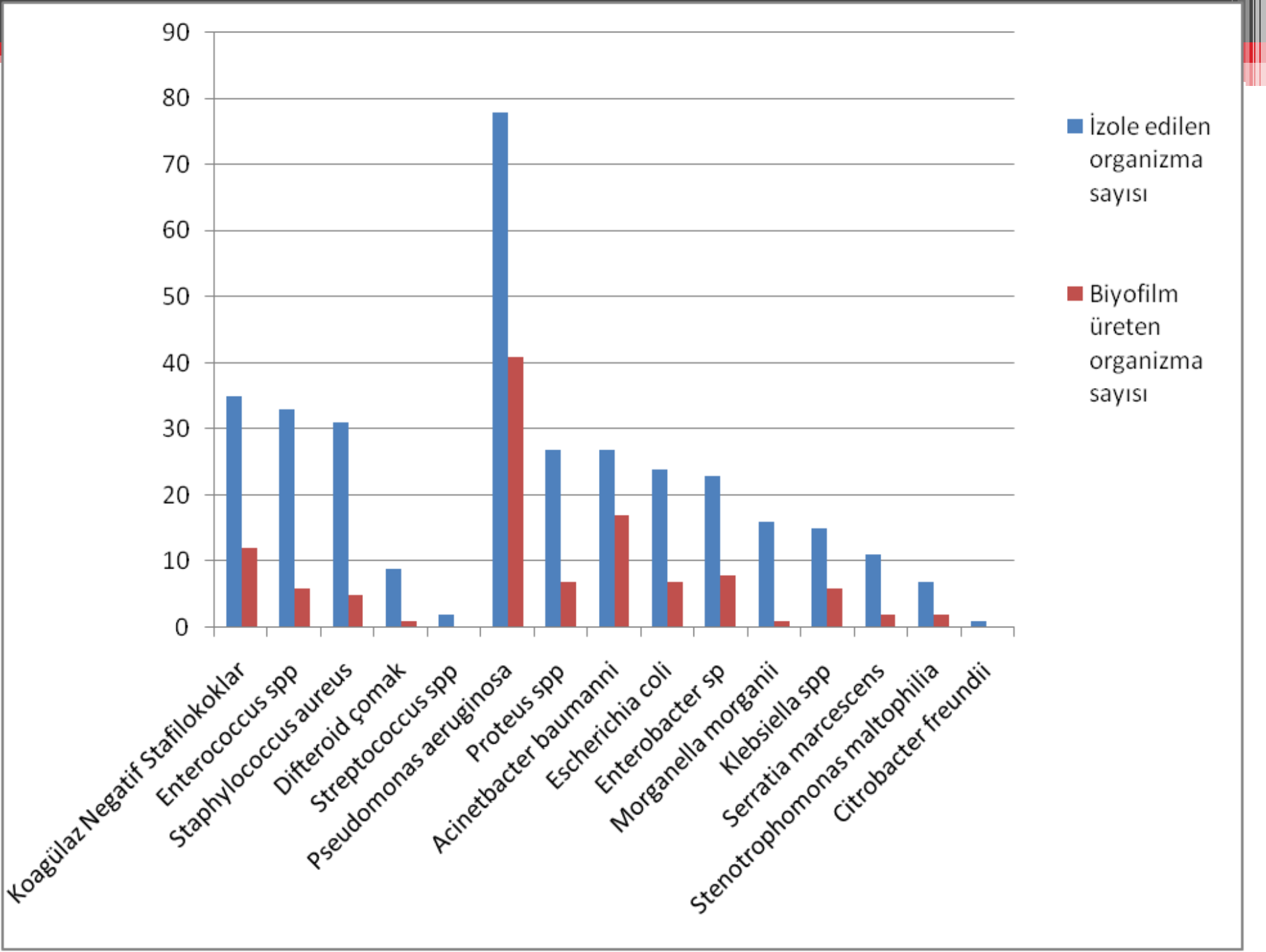
Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler

	Univariate analiz			Multivariate analiz		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Ekstremitte amputasyon öyküsü	2,20	1,14-4,24	0,01	1,00	0,43-2,3	0,98
Son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü	2,94	1,5-5,75	0,002	0,37	0,09-1,3	0,14
Son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu varlığı	2,35	1,23-4,53	0,01	0,94	0,25-3,5	0,93
Üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış	2,44	1,06-5,58	0,03	0,47	0,18-1,2	0,12
MDR	0,16	0,08-0,32	0,001	3,63	1,58-8,33	0,002
XDR	0,11	0,03-0,31	0,001	4,06	1,25-13,1	0,01

Biyofilm oluşumu ile hasta bulguları arasında anlamlı ilişki

- Ekstremitte amputasyon öyküsü,
- Son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü
- Son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü,
- Üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış ile
- **MDR ve XDR mo. ile infekte olmak**

- **Toplam 339 mikroorganizma**
- 115' inde (% 34) biyofilm oluşumu pozitif,
- **Gram pozitif bakteriler 24/110 (% 21)' u**
- **Gram negatif bakteriler 91/229 (% 39)'i**
- Gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumu oranı Gram pozitiflere göre **anlamlı yüksek** ($p = 0,01$).



- Biyofilm oluşturma oranı en fazla olan bakteriler
 - *A. baumannii* (% 62),
 - *P. aeruginosa* (% 52),
 - *Klebsiella* spp. (% 40)
 - KNS (% 43)

.Non-fermentatif bakterilerde biyofilm oluşumu ile MDR ilişkisi

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=78)	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=41)	31 (76)	10 (24)	<0,001
Biyofilm negatif (n=37)	14 (38)	23 (62)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=27)	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=17)	16 (94)	1 (6)	0,69
Biyofilm negatif (n=10)	9 (90)	1(10)	

Biyofilm oluşumu ile dirençli diğer etkenler arasındaki ilişki

<i>S. aureus</i>	MRSA (n,%)	MSSA (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=5)	3 (60)	2 (40)	0,93
Biyofilm negatif (n=26)	5 (19)	21 (81)	
Enterokoklar	VRE pozitif (n,%)	VRE negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=6)	4 (67)	2 (33)	0,02
Biyofilm negatif (n=27)	4 (15)	23 (85)	
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=31)	17 (55)	14 (45)	<0.001
Biyofilm negatif (n=85)	15 (18)	70 (82)	

GSBL yapan <i>Enterobacteriaceae</i> spp. ve biyofilm ilişkisi			
<i>Klebsiella</i> spp.	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=6)	5 (83)	1 (17)	0,01
Biyofilm negatif (n=9)	1 (11)	8 (89)	
<i>Escherichia coli</i>	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=7)	6 (86)	1 (14)	0,01
Biyofilm negatif (n=17)	5 (29)	12 (71)	

. Biyofilm oluşumu ile MDR ve XDR gelişimi arasındaki ilişki

	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=115)	84 (73)	31 (27)	< 0,001
Biyofilm negatif (n=224)	58 (26)	166 (74)	
	XDR var (n,%)	XDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=115)	37 (32)	78 (68)	< 0,001
Biyofilm negatif (n=224)	9 (4)	215(96)	

- DFU'nda iyileşmeye engel olan önemli bir faktör, **çoklu ilaca dirençli veya biyofilm üreten bakteri enfeksiyonları**

Kronik yaralarda biyofilm enfeksiyonlarını önleme ve tedavi stratejileri

- biyofilm oluşumunu önlemeye yönelik aşı,
- biyofilm etkili ilaçlar ile antibiyotik kombinasyonları,
- topikal antimikrobiyal tedavi rejimleri,
- lökosit yamaları
- otolog plateletten zengin fibrinlerin lokal uygulamaları,
- bakteriyofaj tedavileri,
- selektif debridman özelliği olan larvaların antimikrobiyallerle kombine kullanımı çalışmaları
- QS inhibitörleri ile kombine kullanımı çalışmaları

- Diyabetik ayak tedavisinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç bulunmakta
 - Bakteriyofajlar
 - probiyotikler
 - antimikrobiyal peptidler

Bacterial Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Potential Alternative Therapeutics

Raquel Santos, Ana Salomé Veiga, Luis Iavarone,
Miquel Castanho and Manuela Oliveira

- Bakteriyofaj tedavisi, patojenik bakterileri azaltmak veya ortadan kaldırmak için litik bakteriyofajların kullanılması
- Bakteriyofaj polimerik matrikse yayılmakta ve biyofilmi yok etmede
- Diyabetik ayakta bakteriyofajlar **topikal olarak** kullanılabilir.

▪Njoroge J, Sperandio V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. EMBO Mol Med. 2009;1(4):201–210.

▪Sillankorva S, Oliveira R, Vieira M, Sutherland I, Azeredo J. Bacteriophage Phi S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. Biofouling. 2004;20(3):133–138

- Topikal bakteriyofaj süspansiyonu,
 - *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* ile enfekte kronik ülserlere karşı yara iyileştirme özelliği açısından test edildi.

Bakteriyofaj tedavisinin

- bakteri koloni sayılarını azalttığı
- biyofilmlerdeki hücre bozulmasını önemli ölçüde arttırdığı
- yara iyileşmesini arttırdığı gözlemlendi.

Mendes J, et al. Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* 2013; 21: 595–603

Mendes J, et al. *In vitro* design of a novel lytic bacteriophage cocktail with therapeutic potential against organisms causing diabetic foot infections. *J Med Microbiol.* 2014; **63**(Pt 8):1055–1065.

Bakteriyofajla ilgili sorunlar

- Ancak, Tüm bakteriofajlar kullanıma uygun değil!!
- Potansiyel olarak yararlı fajların,
 - hedef bakterilerle olan etkileşimleri ve
 - genetik içeriği ile ilgili ayrıntılı çalışmaları, daha fazla bilgi gerekli!

Probiyotikler

- Probiyotikler mikroorganizma ile yarışmakta ve konak yanıtını modüle etmekte
- Enfekte kronik DAÜ üzerine **Lactobacillus plantarum** etkinliği çalışması ; topikal uygulama
 - diyabetik hastaların yarısında debridman, granülasyon dokusu oluşumu ve total iyileşmeyi indükledi.

Probiyotikler

- Lactobacillus reuteri,
- Lactobacillus rhamnosus,
- Lactobacillus casei,
- Lactobacillus acidophilus
- Lactococcus lactis
- MRSA klinik izolatları da dahil patojen mikroorganizmaları doğal olarak elimine edebilir

Sikorska H, Smoragiewicz W. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Int J Antimicrob Agents. 2013;42(6):475–481

Probiyotikler

S. aureus+ *P. aeruginosa* probiyotik in vitro çalışması

- *L. fermentum* patojen suşun sitotoksosite ve biyofilm oluşum becerisini azalttı

Varma P, Nisha N, Dinesh K, Kumar A, Biswas R. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Mol Microbiol Biotechnol. 2011;20(3):137–143

Bakteriosinler

- Biyofilm üreten hücreler üzerinde etki yapan bakteriyosinler DA enfeksiyonlarının tedavisinde uygun

O'Driscoll N, Labovitiadi O, Cushnie TP, Matthews K, Mercer D, Lamb A. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. Curr Microbiol. 2013;**66**(3):271–278.

- Klinik olarak izole edilmiş ve biyofilm üreten MRSA suşuna karşı üç bakteriosin, **nisin A, laktisin Q ve nukasin ISK-1'in antimikrobiyal aktivitesi ve etki mekanizması**
 - **L. lactis tarafından üretilen nisin A ve laktisin Q, planktonik ve biyofilm hücrelerine karşı bakterisidal etkili**

Okuda K, Zendo T, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, et al.
Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5572–5579

Antimikrobiyal peptidler

- Antimikrobiyal peptidler immunmodülatör
- Bakteriyel toksinleri nötralize eder
- Biyofilm oluşumunu önler ya da ortadan kaldırır.

Hancock R, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006;**24**:1551–1557

Hou S, et al.. Effects of Trp- and Arg-containing antimicrobial-peptide structure on inhibition of *Escherichia coli* planktonic growth and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2010;**76**(6):1967–1974.

Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2011;**20**(4)

Antimikrobiyal peptidler

- AMP anjiogenezde ve yara iyileşmesinde rol oynar
- Gramicidin S;
 - *Bacillus aneurinolyticus* tarafından üretilen siklik bir dekapeptid
- Gram pozitif bakterilere etkili topikal

Gause G. Gramicidin S. Lancet. 1946;**2**:46

Antimikrobiyal peptidler

- Nisin
 - Gram pozitif bakterilere karşı etkili mikrobiyal ajan
- 50 yıldan beri gıda koruyucusu olarak güvenle kullanılan bir bakteriyosin

Cleveland J, Montville T, Nes I, Chikindas M. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol. 2001;71:1–2

Cotter D, Hill C, Ross P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol. 2005;3:777–788.

Antimikrobiyal peptidler

- Sorunlar
 - Direnç gelişimi?
 - Maliyet
 - Üretim maliyetleri amino asit gramı başına yaklaşık 50-400 dolar

Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr Opin Pharmacol. 2006;6(5):468–472

Guar gum as a new antimicrobial peptide delivery system against diabetic foot ulcers *Staphylococcus aureus* isolates

Raquel Santos,^{1,2} Diana Gomes,³ Hermes Macedo,¹ Diogo Barros,⁴ Catarina Tibério,¹ Ana Salomé Veiga,² Luís Tavares,¹ Miguel Castanho² and Manuela Oliveira¹

Correspondence

Manuela Oliveira
moliveira@fmv.ulisboa.pt

¹Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

²Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

³ISPA Instituto Universitário SA, Lisbon, Portugal

⁴Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

Diabetic patients frequently develop diabetic foot ulcers (DFUs), particularly those patients vulnerable to *Staphylococcus aureus* opportunistic infections. It is urgent to find new treatments for bacterial infections. The antimicrobial peptide (AMP) nisin is a potential candidate, mainly due to its broad spectrum of action against pathogens. Considering that AMP can be degraded or inactivated before reaching its target at therapeutic concentrations, it is mandatory to establish effective AMP delivery systems, with the natural polysaccharide guar gum being one of the most promising. We analysed the antimicrobial potential of nisin against 23 *S. aureus* DFU biofilm-producing isolates. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) were determined for nisin diluted in HCl and incorporated in guar gum gel. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon matched-pair test. Nisin was effective against all isolates, including some multidrug-resistant clinical isolates, independent of whether it is incorporated in guar gum. While differences among MIC, MBC and MBIC values were observed for HCl- and guar gum- nisin, no significant differences were found between MBEC values. Inhibitory activity of both systems seems to differ only twofold, which does not compromise guar gum gel efficiency as a delivery system. Our results highlight the potential of nisin as a substitute for or complementary therapy to current antibiotics used for treating DFU infections, which is extremely relevant considering the increase in multidrug-resistant bacteria dissemination. The guar gum gel represents an alternative, practical and safe delivery system for AMPs, allowing the

Biyofilmi mekanik uzaklaştırma

- **Kronik yaralarda biyofilme yönelik uygulamalar**
 - öncelikli olarak biyofilmi uzaklaştırmaya yönelik **debridman**,
 - negatif basınçlı vakum tedavisi
 - Kompresyon

Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. Clin Microbiol Infect 2015 [E-pub Suppl 1:S1-25], doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.

Hiperbarik oksijen tedavisi

- Biyofilmlerin anaerobik ve mikroaerofilik ortamı nedeniyle azalan antibiyotik etkinliğini artırarak anti-biyofilm etkinliğe katkıda bulunur.

Antibiyotiklerin biyofilme etkileri

- Antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarda, MİK değerinin altında kalan dozları biyofilm oluşumunu arttırmakta
 - Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs 2011; 9: 737-751.
- Antibiyotik tedavilerinin başlangıç ve bitiş dozları,
- dozlar arasında uzayan dönemler
- devam eden düşük doz tedaviler
 - Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Int J Antimicrob Agents 2001;17(1):1-8.

Çare hastaya uyarlı antibiyotik tedavisi mi?

- İki farklı gruptan sistemik antibiyotik birlikte kullanımı?
- Sistemik ve lokal antibiyotik birlikte kullanımı ?
- Antibiyotik ve lokal dezenfektan kombinasyonları?
- Biyofilme etkili antibiyotikler mi?

Biyofilm enfeksiyonu antibiyotik kullanımı önerileri

- Kronik enfeksiyonu olan hastalara uygulanan antimikrobiyal tedavide biyofilm oluşması nedeni ile tekli ilaç rejimleriyle **kısa süreli ve düşük doz tedavilerden kaçınılması** önerilmekte
- Biyofilme etkili antibiyotiklerin seçilmesi

Biyofilme etkinliği gösterilen antimikrobiyal ve antiseptikler

- rifampisin,
- daptomisin,
- azitromisin,
- tobramisin,
- oritavansin,
- taurolidin,
- N-klorotaurin

Biyolojik ve kimyasal ajanlar

- Bal, dispersin-B, laktoferrin, galyum, bizmut, iyodin gibi biyofilme yönelik tedavide kullanılabilecek biyolojik ve kimyasal ajanlar üzerine çalışmalar yapılmakta

Zapata, P.A.^a, et al. [Materials Science and Engineering C](#). 2016; 69: 1282-1289

Polyethylene/silver-nanofiber composites: A material for antibacterial films

- Gümüş-nanofiber kompozitlerinin Escherichia coli ATCC 25923'ün büyümesini % 88 ve % 56 oranında inhibe ettiği
- Başarı nanokompozitten salınan artan gümüş iyonlarına atfedildi
- Antibakteriyel etkinin membran bozulması ile ilişkili olduğunu

Doğrudan biyofilme etkili ajanlar

- Matriks çözücü enzimler,
- **QS inhibitörleri,**
- Virülans faktör antikorları,
- Lökosit yamaları
- Otolog trombositte zengin fibrinlerin lokal uygulamaları
- Antimikrobiyalle QS inhibisyonu özelliği olan ultrason dalgaları, elektrik ve ultraviyole ışık kombinasyonları

Quorum sensing:

Bakterilerin harici sinyallere karşı yanıtlarını senkronize etmek ve aktivitelerini koordine etmek için kullandıkları iletişim

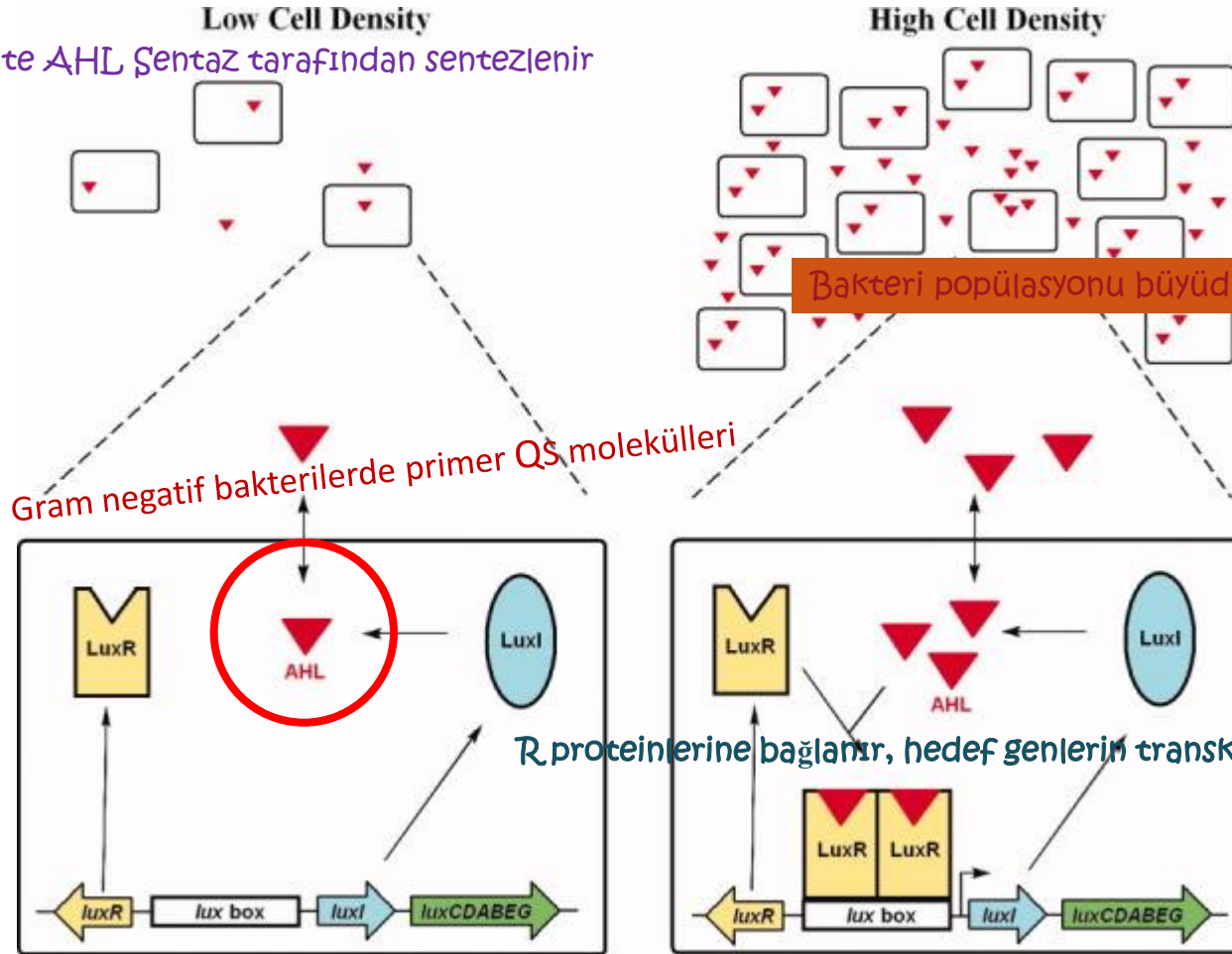
- Bakteri biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan quorum sensing (minimum popülasyon birimini algılama) adı verilen **iletişim sinyalleri** aracılığıyla kontrol etmekte
 - Enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konak immün yanıtından kaçabilir.

Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. J Infection 2003; 46: 207-14

QS sisteminin antimikrobiyal direnç katkısı

- Diyabetik ayak ülserleri sıklıkla polimikrobiyal etkenlerle kolonize olur.
- Polimikrobiyal biyofilmde virülans faktörleri **QS molekülleri** aracılığıyla birbirleriyle sinerjistik etkili

Low Cell Density
Cognate AHL Şentaz tarafından sentezlenir



Acyl homoserine lactone (AHL)-bağımlı quorum sensing sistemi : Ör. *V. Fischeri* kökeninde LuxI/R

Bakterilerdeki sinyal molekülleri

- Gram negatif bakterilerde asilhomoserin lakton, siklik dipeptidler,
- Gram pozitif bakterilerde küçük peptidler,
- hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde autoinducer-2

QS inhibitörleri,

- QS inhibisyonu enfeksiyonlara karşı umut vadeden bir strateji
 - Yaklaşık 40 patent ile çok sayıda QS inhibitörü keşfedilmiştir
 - QS inhibitörlerinin geçerli doğrulama yöntemleri optimize edilmeli
 - QS parçalanmasının lehte veya daha tehlikeli suşları seçebileceğinin keşfi derinlemesine araştırılmalı

S. Scutera, M. Zucca, D. Savoia

Novel approaches for the design and discovery of quorum-sensing inhibitors

Expert Opin. Drug Discov., 9 (2014), pp. 353–366

Çalışmalar sürmekte

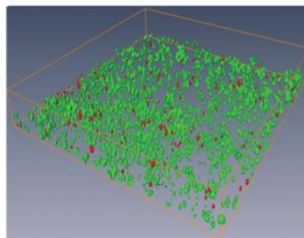
- Selektif debridman özelliği olan larvaların antimikrobiyaller ve QS inhibitörleri ile kombine kullanımı??

- Ayrıca antimikrobiyaller ile **QS inhibisyonu** özelliği olan ultrason dalgaları, elektrik ve ultraviyole ışık kombinasyonlarının da kullanımı üzerine de çalışmalar ve deneyimler gerekmektedir

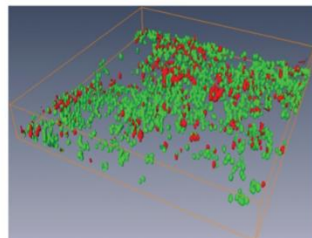
From: **Searching for new strategies against polymicrobial biofilm infections: guanylated polymethacrylates kill mixed fungal/bacterial biofilms**

J Antimicrob Chemother. 2015;71(2):413-421. doi:10.1093/jac/dkv334

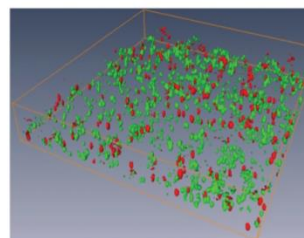
S. aureus
biofilms



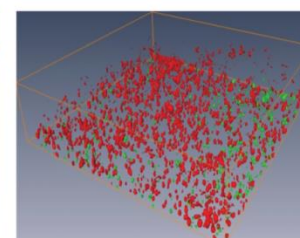
Control



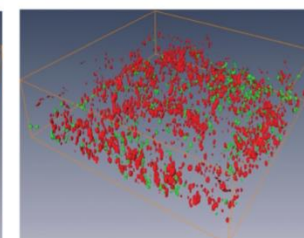
Vancomycin (1024 mg/L)



Ciprofloxacin (512 mg/L)

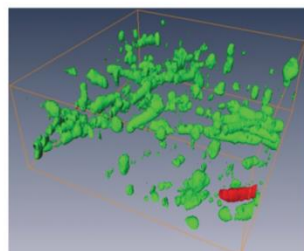


PG3 (128 mg/L)

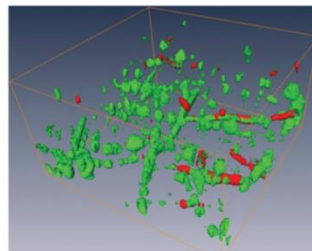


PG4 (128 mg/L)

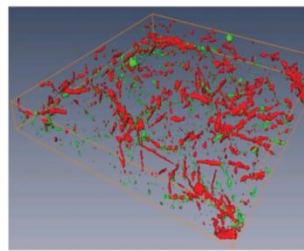
C. albicans
biofilms



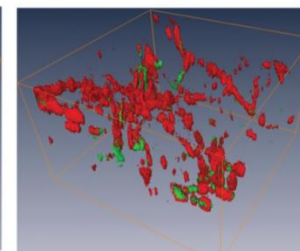
Control



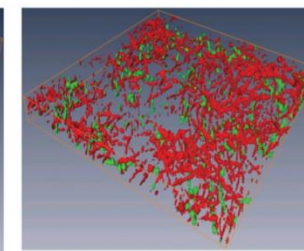
Fluconazole (1024 mg/L)



Caspofungin (4 mg/L)

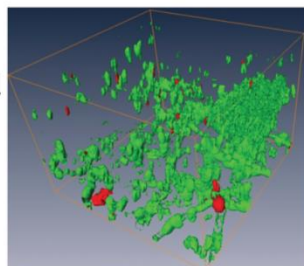


PG3 (128 mg/L)

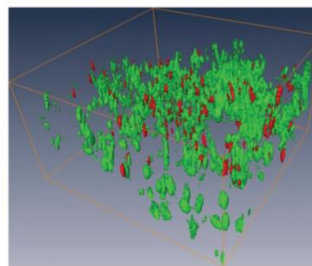


PG4 (128 mg/L)

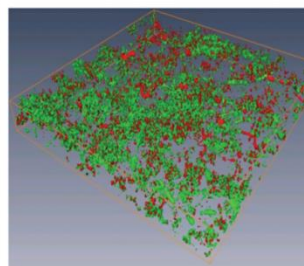
S. aureus/
C. albicans
polymicrobial
biofilms



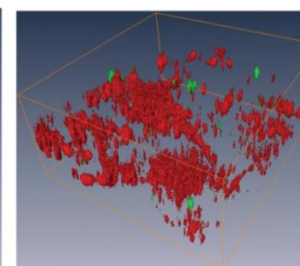
Control



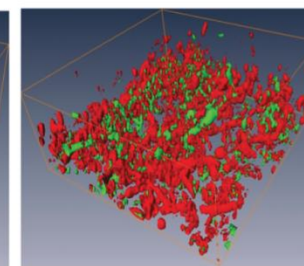
Oxacillin (16 mg/L) +
fluconazole (8 mg/L)



Ciprofloxacin (4.5 mg/L) +
caspofungin (4 mg/L)



PG3 (128 mg/L)



PG4 (128 mg/L)

Sonuç olarak,

- Çoklu ilaca dirençli bakterilerin polimikrobiyal topluluklarının oluşturduğu enfeksiyon, DFU iyileştirme engelinin önemli bir nedeni
- Kronik enfeksiyonda biyofilm oluşumu kaçınılmaz
- Biyofilmin tespiti her yerde yapılabilmesi,
- kolay yöntem geliştirme klinisyene hastaya uygulanacak multidisipliner tedavi yöntemleri hakkında seçenek sunabilecektir.

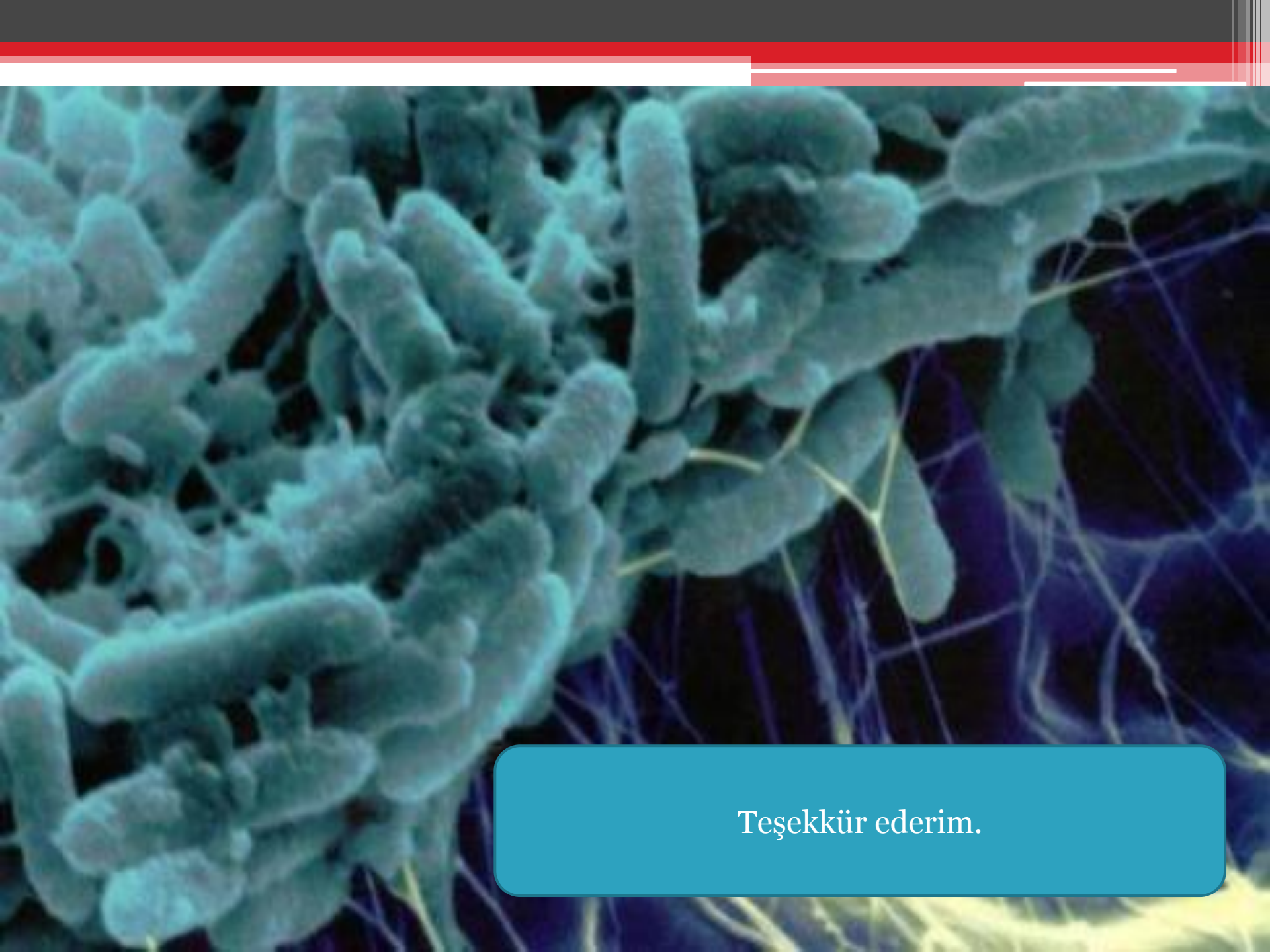
The Visualization of Biofilms in Chronic Diabetic Foot Wounds Using Routine Diagnostic Microscopy Methods

Angela Oates,¹ Frank L. Bowling,² Andrew J. M. Boulton,² Philip G. Bowler,³
Daniel G. Metcalf,³ and Andrew J. McBain¹

- Yara örneklerinde biyofilmlerin tanımlanmasına yönelik basit bir araca gereksinim vardır.
 - Biyofilm tespitinde Floresan boyama, Gram boyama
- Biyofilmlerin belirlenmesinde yöntemin daha kullanışlı olabilmeleri için kolaylık ve maliyet etkinlik gereklidir.

Biyofilme yaklaşım

- Daha yakın takip
- Uygun antibiyotik
 - **Biyofilme etkili antibiyotiklerin seçilmesi**
- **Mükerrer debritleme kararını gözden geçirme**
- Hastanın tekrarlayan enfeksiyonlarında antibiyotiklerin kombinasyonu (Lokal+sistemik)
- ÇİD hastane enfeksiyonlarının önlenmesine çalışmak!!



Teşekkür ederim.