

Kronik Yarada Biyofilm ve Yönetimi

Dr. Ş. Barçın ÖZTÜRK

Aydın Adnan Menderes Üniv.

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD



Kronik Yara

- 4-6 haftada iyileşmeyen
- 2 ila 4 haftalık optimal tedaviden sonra alanda % 20 - 40 azalma göstermeyen
- 3 ay içinde iyileşmeyen
- Süreye bakılmaksızın, anatomik ve fonksiyonel olarak iyileşmeyen ya da patolojik düzelme gösteren
- Sıklıkla diabetes mellitus, venöz staz, periferik vasküler hastalıklar ve basınç ülseri ile ilgili

Fowler E. Chronic wounds: an overview. In: Krasner D, ed. 1990. p. 12-8
Singh A et.al. Asian J Surg 2004;27: 326-32.

Brunnicardi F. Charles Schwartz's principles of surgery 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2004.

Yara iyileşmesi

İnflamasyon fazı

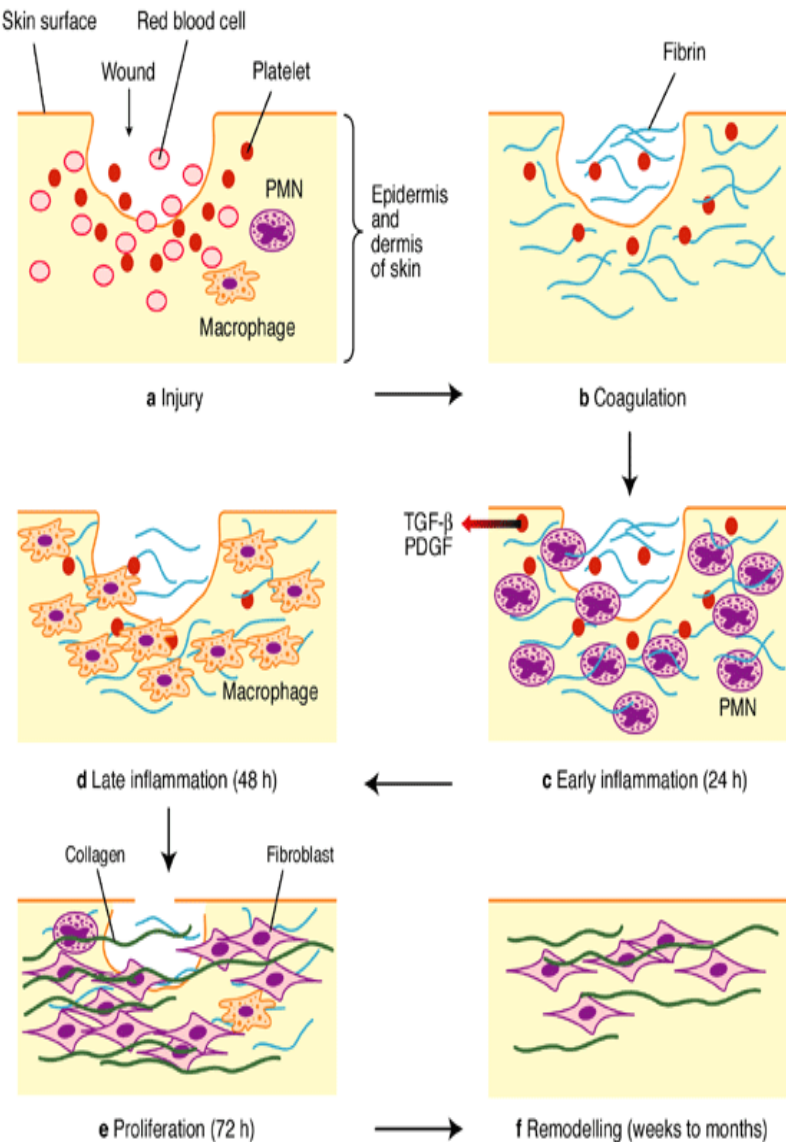
- 4-6 gün

Proliferasyon fazı

- 2-3 hafta

Maturasyon (remodeling) fazı

- 3 hafta-2 yıl



The phases of cutaneous wound healing

Expert Reviews in Molecular Medicine© 2003 Cambridge University Press

Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

- Enfeksiyon
- İskemi (Sigara, DM, Şok, Anemi)
- Malnütrisyon, dehidratasyon
- Yaş
- DM
- Steroidler/sitotoksik ilaçlar
- Obezite
- Bağ dokusu ve damar hastalıkları
- Üremi
- Karaciğer hastalıkları

Kontaminasyon – İnfeksiyon Süreci

- Replikasyon yok / doku hasarı yapmayan replikasyon
- Endojen flora /çevre
- Tüm kronik yaralar
- Yara iyileşmesini gecikmez

- Yara yatağında bakteri yükü ↑
- Lokal immün yanıt ↑
- Beklenen oranda iyileşme

- Doku hasarı ve replike olan mikroorganizma
- Lokal/Sistemik konak immün yanıtı
- İnfeksiyon bulguları (ağrı, eksuda, anormal granülasyon)

Klinik kötüleşme

Kontaminasyon

Kolonizasyon

Lokal
infeksiyon /
Kritik
kolonizasyon

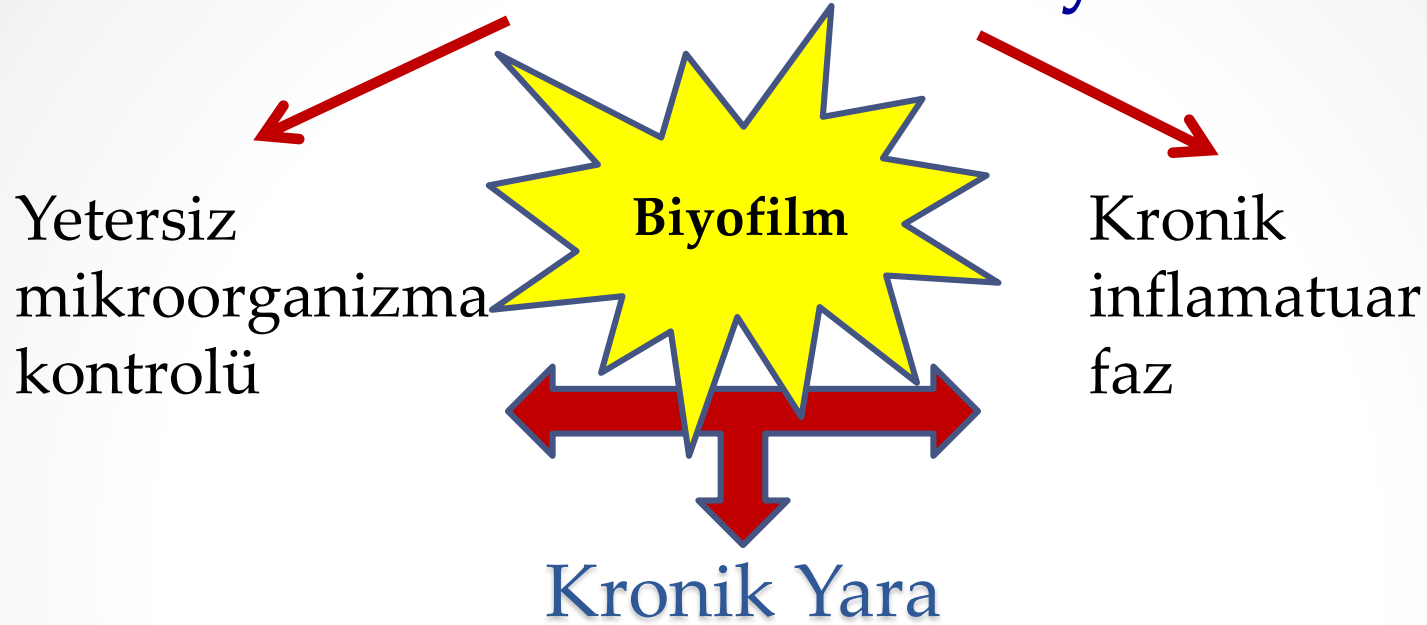
Yaygın
infeksiyon

Sistemik
infeksiyon

Klinik izlem

Klinik müdahale

Bozuk / Yetersiz konak yanıtı



Uzamış inflamasyon

Yetersiz re-epitelizasyon

Bozuk matriks şekillenmesi

İnflamasyon fazı

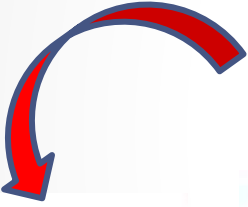
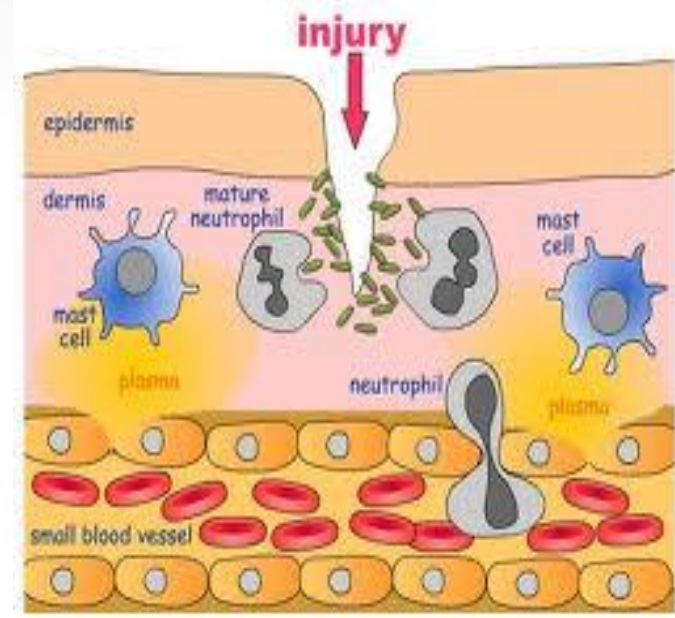
(Metabolitler toplanır, 1-6 gün)

Erken dönem (hemostaz)

Platelet

Geç dönem (fagositoz)

Makrofaj



Makrofaj opsonizasyonundan korunur

Fagositik hücrelerin biyofilme penetrasyonu ↓

Nötrofiller biyofilmdeki bakteriyi öldüremez,

Proinflamatuvar sitokinler ↑

Biyofilm Yarada Nasıl Çalışır ?

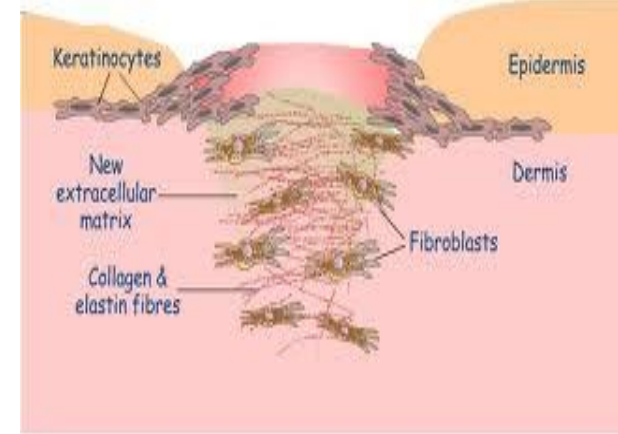
- Birden çok tür barındırır
 - ≥ 4 tür yara iyileşmesini olumsuz etkiler
 - Virulans faktörlerinin sinerjistik çalışması
- Uzamış inflamasyon / Hiperinflamatuvar yanıt
 - Serbest radikaller ve litik enzimlerin salınımı ile bozulmuş hücresel süreç
 - Proteinazlar
 - Büyüme faktörleri ve doku proteinlerinin yıkımı
- Bozulmuş MMPs üretimi
 - MMPs 2, 9 (makrofaj), MMP 8 (nötrofil)
 - *S. aureus* MMP 1, 9; *P.aeruginosa* elastaz

Proliferasyon fazı

(Angioplazi & Fibroplazi, 6-14 gün)

Fibroblast

- Kollajen sentezi
- Angiogenez
- Epitelizasyon
- Doku kuvveti dereceli olarak artar



BIOFILM

Keratinosit inhibisyonu
Kollajen sentezinde bozulma

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

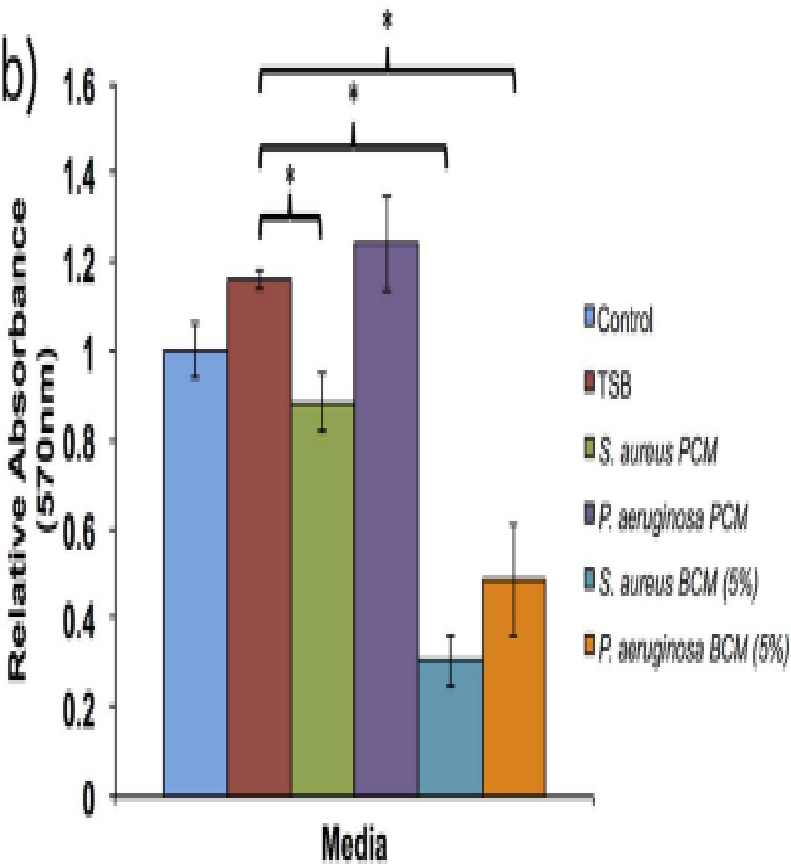
Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses *in vitro*

Received: 27 May 2015

Accepted: 16 July 2015

Published: 17 August 2015

Robert Jeffery Marano^{3,2}, Hilary Jane Wallace^{3,4}, Dulharie Wijeratne^{3,4}, Mark William Fear^{3,4}, Hui San Wong⁵ & Ryan O'Handley⁵



- İnsan Derive Primer Keratinositlerinde (hEKs) (epidermis) proliferasyon
- Planktonik media (PCM) ve Biofilm media (BCM)
- P.aeruginosa ve S. aureus
- Kontrol ortam TSB

- PCM ve BCM S.aureus ile proliferasyonda anlamlı azalma ($p=0.0025$, < 0.01)
- PCM P.aeruginosa' da anlamlı etki yok ($p=0.7$)
- BCM'de $p=0.03$

Biyofilm Yarada Nasıl Çalışır ?

- Yara iyileşmesi için gerekli oksijenin varlığını azaltarak lokalize doku hipoksisini arttırır.
- Farklı metabolik durumdaki heterojen yapı
 - Mikrokoloninin O₂ den fakir merkezinde düşük metabolik hızdaki dormant hücreler
 - Antibiyotik toleransı
 - İmmun yanıtın sınırlı erişimi

The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data

- Ocak 2008 – Aralık 2015
- Cochrane Library / Embase / Pub Med
- «Biyofilm» ve «Kronik Yara» anahtar sözcükleri
 - Diyabetik ayak ülseri, venöz bacak ülseri, basınç ülseri, dekübit ülseri, iyileşmeyen cerrahi yaralar, taramalı elektron mikroskopu, floresans in-situ hibridizasyon , 16S rRNA
- Prospektif klinik çalışma, olgu sunumu, olgu serisi, konferans özetleri
 - Klinik gözlem dışlanmış
- PRISMA veri inceleme kılavuzu
- Doku biyopsisi, küretaj, debritleme
 - Sürüntü örnekleri dışlanmış

- 554 Çalışma incelenmiş
- Dışlama sonrası 185 kronik yara içeren 8 prospektif kohort ve 1 olgu serisi incelenmiş
 - DAÜ 33
 - VÜ 67
 - BÜ 26
 - İCY 28
 - Belirtilmemiş 31

wounds met the inclusion criteria. Prevalence of biofilms in

ch
in
Re
tr
ni
pr
bi
ti
re

to
pe
fe
pl
an
in

un
bi
in
(B
C
si
ca
an

on correctly diagnosing and managing biofilm-associated infections in non-healing chronic wounds. This will require a shift in treatment paradigms to more multifaceted biofilm-based approaches, given the resilience of biofilms in responding to planktonic-based treatments.

Table 1. Random-effects model of nine chronic wound biofilm studies

Author/s (year)	Study design	Number of participants	Visualisation methods	Chronic wound aetiologies	Number of samples with confirmed biofilm (%)
James et al. (2008) ¹⁰	Prospective study case versus control	66	Light microscopy, SEM 16S rRNA with DGGE	13 DFUs, 21 PUs 8 VLU, 24 NHSWs	30/50 (60%)
Kirketerp-Møller et al. (2008) ³⁹	Prospective cohort study	22	PNA-FISH, CLSM	Unspecified chronic wounds	13/22 (60%)
Fazli et al. (2009) ⁴¹	Prospective cohort study	9	PNA-FISH, CLSM	10 VLU	10/10 (100%)
Thomsen et al. (2009) ⁴⁴	Prospective cohort study, sub analysis	2	PNA-FISH, 16S rRNA	2 VLU	2/2 (100%)
Han et al. (2011) ³⁸	Prospective cohort study	15	PNA-FISH, CLSM, 16S rRNA	4 DFUs, 5 PUs, 2 VLU, 4 NHSWs	9/15 (60%)
Neut et al. (2011) ⁴³	Case report	2	CLSM	2 DFUs	2/2 (100%)
Oates et al. (2014) ⁴⁰	Prospective cohort study, sub analysis	4	FISH, SEM	4 DFUs	4/4 (100%)
Martinez-Velasco et al. (2014) ³⁶	Prospective cohort study, conference abstract	20	SEM, LM	Unspecified chronic wounds	20/20 (100%)
Honorato-Sampaio et al. (2014) ³⁷	Prospective cohort study	45	TEM	45 VLU	45/45 (100%)

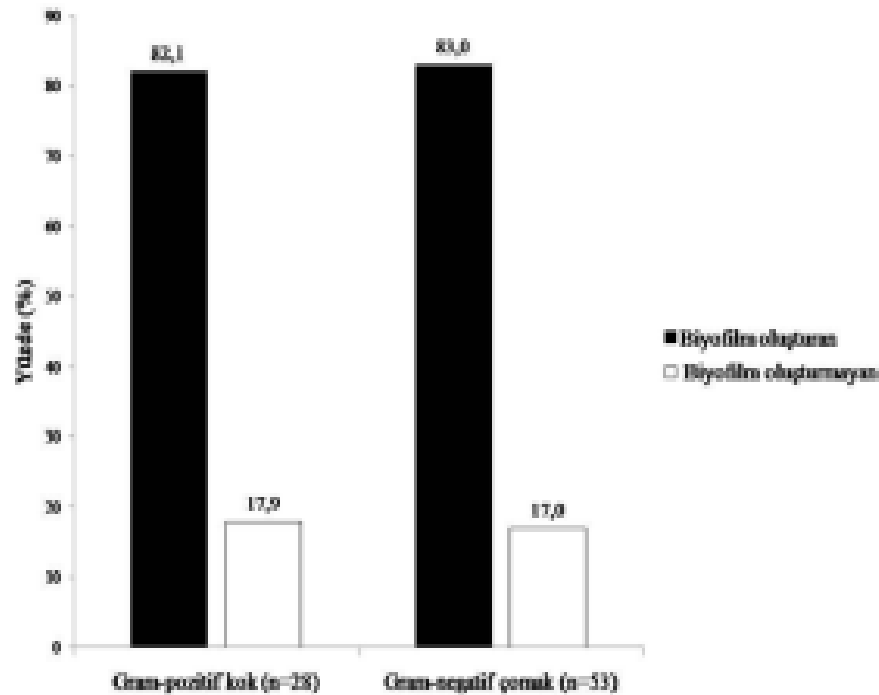
Kronik yaralarda biyofilm prevalansı % 78.2
(p < 0.002)

SEM–scanning electron microscopy; 16S rRNA–16S ribosomal RNA sequencing for identification of microbes; DGGE–denaturing gradient gel electrophoresis; PNA–FISH–peptide nucleic acid–fluorescent *in situ* hybridisation, CLSM–confocal laser scanning microscopy; LM–light microscopy; TEM– transmission electron microscopy; DFU–diabetic foot ulcer; PU–pressure ulcer; VLU–venous leg ulcer; NHSW–non-healing surgical wound

Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları[§]

Ş. Barçın ÖZTÜRK, M. Bülent ERTUĞRUL, Esra ÇÖREKLİ

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın



Şekil 1. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin biyofilm oluşturma oranları.

Tablo 1. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında izole edilen türler ve biyofilm oluşturma oranları.

Mikroorganizma	n (%)	Biyofilm n (%)
Gram-pozitif kok	28 (34.5)	23 (82.1)
Koagülaz negatif stafilokok	15 (18.5)	13 (86.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (9.9)	6 (75)
<i>Enterococcus</i> spp.	4 (4.9)	3 (75)
Grup D streptokok	1 (1.2)	1 (100)
Gram-negatif çomak	53 (65.5)	44 (83.0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	16 (19.8)	15 (93.7)
<i>Escherichia coli</i>	14 (17.3)	9 (64.2)
<i>Acinetobacter</i> spp.	10 (12.3)	8 (80)
<i>Klebsiella</i> spp.	5 (6.2)	4 (80)
<i>Proteus</i> spp.	4 (4.9)	4 (100)
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
<i>Serratia</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
Toplam	81	67 (82.7)*

Bakteriyal Biyofilm Yara İyileşmesinde En Büyük Engeldir

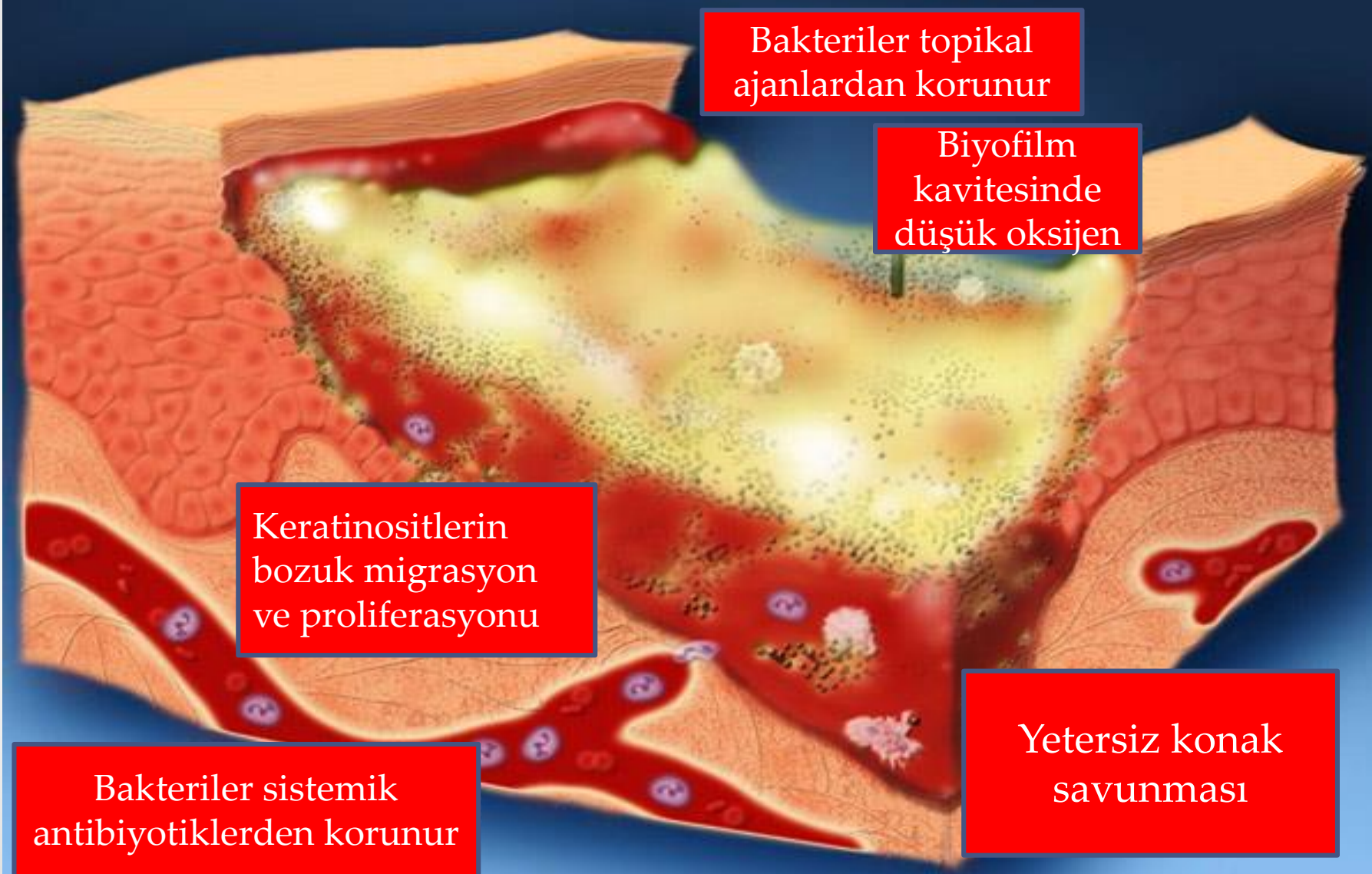
Bakteriler topikal ajanlardan korunur

Biyofilm kavitesinde düşük oksijen

Keratinositlerin bozuk migrasyon ve proliferasyonu

Bakteriler sistemik antibiyotiklerden korunur

Yetersiz konak savunması



Biyofilm İnfeksiyonlarında Klinik ve Tanısal Sorunlar

- Antibiyotik tedavisinde başarısızlık
- Tekrarlayan / iyileşmeyen infeksiyonlar
- Kültürde az sayıda mikroorganizma üremesi (etken ?)
- Gram boyamada bakteri / kültür negatifliği
- Kültür negatif / klinik infeksiyon göstergeleri
- Antibiyotik direnci (yaklaşık 1000 kat)
- Kronik inflamasyon (önemli ölçüde artmış antikor yanıtları)*

* ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014

Biyofilm Enfeksiyonlarında Tedavi

- Antibiyotikler
- Quorum Sensing (QS) İnhibitörleri
- Anti adhesinler
- Nonsteroid Antiinflatuar Ajanlar
- Antimikrobiyal Peptidler
- Enzimler ve Antiseptikler
- Hiperbarik oksijen tedavisi
- Bakteriyofajlar
- **Debritman**
 - Cerrahi
 - Mekanik (sonikasyon vb)
 - Biyolojik (Maggot tedavisi)
- Nanopartikül uygulamaları

Antibiyofilm Antibiyotikler

- Makrolid kombinasyonları fagositlerin biyofilm içine invazyonunu arttırabilir*
- Eritromisin, biyofilm formasyonunda inhibitör rol oynar**
- Rifampisin, fusidik asit, linezolid biyofilm penetrasyonu iyi olan antibiyotiklerdir#
- Daptomisin biyofilm altındaki mikroorganizmayı öldürebilir&
- Tigesiklin biyofilmin kendisine ve altındaki mikroorganizmaya etkilidir&

*Mitsua Y. et.al. J. Infect. Chemother. 2000; 6: 45-50

**Yamasaki O. et. al. J. Antimicrob. Chemother. 2001; 48: 573-577

LaPlante K, Antimicrob Agents Chemother, 2009; 53(9): 3880–3886

& Ozturk B. et.al. Can J Microbiol, 2016;62(9):735-43

Quorum Sensing İnhibitörleri

- Bakteriler arası iletişim sisteminin (QS) bozulması bakterilerin koordineli davranmasını engeller ve konakta kolonize olma yeteneklerini azaltır*
- Toksik olmaları ya da tolere edilebilir dozlarda etki gösterememeleri nedeniyle insan kullanımına çok uygun olmadıkları görülmüştür.
- İnsan kullanımına uygun QS inhibitörleri;
 - Dirençli bakterilerin gelişiminin önlenmesi
 - Konaktaki yararlı bakterilerin sağkalımı

*Rasko D, Sperandio V, Nature Reviews Drug Discovery, 2010;9, 117-128

Quorum sensing inhibisyonu için kullanılan stratejiler

```
graph TD; A[Quorum sensing inhibisyonu için kullanılan stratejiler] --> B[Sinyal molekülünün (AHL autoinducer) üretiminin önlenmesi]; A --> C[Sinyal molekülünün yıkılması (AHL sinyal molekülünün hidrolizi)]; A --> D[Sinyalinin alınmasının önlenmesi (LuxR-Tipi reseptör proteine bağlanacak analogların geliştirilmesi)];
```

Sinyal molekülünün
(AHL autoinducer)
üretiminin
önlenmesi

Sinyal molekülünün
yıkılması (AHL sinyal
molekülünün hidrolizi)

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

Quorum Sensing İnhibitörleri

- Doğal İnhibitörler (çoğu toksik)
 - Halojenlenmiş furanonlar, penisillik asit, sarımsak özütü, kimyon, greyfurt suyu, fesleğen, vanillin, kateşin vb
- Sentetik Analoglar
 - Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyalin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre (LuxR-tipi) karşı yarışan sentetik moleküller
 - V-06-018, 3OC12-HSL, RNA III inhibitör peptid, furanonlar, sikloheksanon vb
- Bazı İlaçlar
 - Salisilik asit, tobramisin, eritromisin, Nifuroxazide, Chlorzoxazone vb

Anti adhesinler

- Sortazlar
 - Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan yapılarının yüzey proteinlerine kovalan bağlanmasını sağlayan membran enzimi
 - Mikroorganizmanın dokuya adheransı
 - Önemli bir hedef molekül → Biyofilm gelişimi
 - Sortaz inhibitörleri
 - Coccus tribulus ve Coptis chinensis 'dan ekstrakte agregatlar
 - (Z)-diarylacrylonitriller
 - Toksisite nedeniyle sınırlı terapötik değere sahiptirler

Kim SW et.al. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66(12):2751-4.
Maresso AW et.al. Pharmacol Rev 2008;60(1):128-41.

Nonsteroid Anti İnflamatuvar İlaçlar

- Siklooksijenaz inhibisyonu → Mantar ve bakterilerde biyofilm oluşumunu ↓ (PG üzerinden)
- Aspirin, etodolac, diclofenac, selekoksib, nimesulide, ibuprofen ve meloksikam → Biyofilm oluşumunu önleyici
 - Aspirin → *C.albicans*' da %95 biyofilm engelleyici



Alem MA et.al. Antimicrob Agents Chemother 2004;48 (1):41-7.
del Prado G et.al. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;67(4):311-8.
Farber BF et.al. J Infect Dis. 1992;166(4):861-5.

Antimikrobiyal Peptidler

- Sitokin salımı, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve kemotaksis üzerine etki
- Birçok antibiyotik ile sinerjistik etki
- Defensin – I
 - Revamil balı / arı sütünde
 - Katyonik antibakteriyel peptid
- Magainin
 - Afrika pençeli kurbağasında (*Xenopus laevis*) bulunan bir antimikrobiyal peptit sınıfı
- Cathelicidin (lökositler tarafından üretilir)
- Citropin 1.1
- Laktoferrin
- Melimin

Antiseptikler

- Gümüş
- İyod
- Poliheksametilen biguanid (PHMD)* (Suprasorb®, Acto Actolind®)
 - Propyl-betaine (kozmetik surfaktan) ve polyhexanide (lens suyu) içerir
 - Cilt üzerinde iyi tolere edilir, biyofilm konsantrasyonunu ↓, inflamasyonu ↓, iyileşmeyi hızlandırır
- Bal
- Hipokloröz asit (Crystalin®)
 - Biyofilm oluşumunu ve matür formunu bozar; biyofilm altındaki mikroorganizmaları öldürür**

*Davis SC et.al., Int Wound J. 2017, doi: 10.1111/iwj.12734

**Sakarya S et.al., Wounds 2014;26(12):342-50

Bal

- 1999 Avusturalya' da ilk tıbbi kullanım onayı
- Tıbbi bal preparatları
 - Manuka balı (Manuka çalısı /Leptospermum scoparium)
 - Karabuğday, kestane veya yonca ballarını içeren preparatlar
- Antibakteriyel (> 80 mikroorganizma türüne etkili)
- Anti adhesive (yüzey adezyonunu engeller)
- Quorum sensing inhibisyonu
- Biyofilm oluşumunu engeller, oluşmuş biyofilmi parçalar

Maddocks S.E. et.al. Future Microbiol. (2013) 8(11), 1419–1429

Debridman

- En etkin antibiyofilm strateji
 - Biyofilmi hasarlama ve biyofilm gelişimine uygun fibrin ve ölü dokuları uzaklaştırma
- **Cerrahi**
- Mekanik (ultrasonik debridman)
- Biyolojik (sinek kurtçukları ile)
- Otolitik / Enzimatik

Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes

Biyofilm matriks hasarının yara iyileşmesine katkısının belirlenmesi

- 3 kollu randomize kontrollü çalışma
 - Standart tedavi
 - Standart tedavi + Jel (antibiyofilm + AB)
 - Jel
- Haftada 3 gün / 4 hafta
- Sonlanma noktası yara hacminde % 50 azalma

- Standart tedavide % 53 iyileşme
- Jel % 80 iyileşme
- Standart + jel % 93 iyileşme

Yara biyofilm matrisini hedeflemek yara iyileşmesini artırır

R. Wolfe
Medical
Southw
Wound
Southw
Wound
Lubbock

Email: R.
randallw



PERSPECTIVE ARTICLE

Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds

Gregory Schultz, PhD¹; Thomas Bjarnsholt, DMSc^{2,3}; Garth A. James, PhD⁴; David J. Leaper, DSc⁵; Andrew J. McBain, PhD⁶; Matthew Malone, MSc^{7,8}; Paul Stoodley, PhD⁹; Theresa Swanson, MHSc¹⁰; Masahiro Tachi, MD¹¹; Randall D. Wolcott, MD¹²; for the Global Wound Biofilm Expert Panel

Table 1. Key consensus statements

- Wounds ...
agreement
- Biofilms ...
the surface ...
mean 4.3
- Wound ...
by clinical
- Important ...
tics [strong agreement, mean 4.3, SD 0.67].
- The most important measure for future diagnostic tests to consider is indication of where the biofilm is located within the wound [strong agreement, mean 4.0, SD 0.82].
- **Debridement is one of the most important treatment strategies against biofilms, but does not remove all biofilm, and therefore cannot be used alone**—this is one of the critical principles of wound bed preparation (tissue, infection/inflammation, moisture balance, and edge of wound) [strong agreement, mean 4.9, SD 0.32].
- Biofilms can reform rapidly; **repeated debridement alone is unlikely to prevent biofilm regrowth**; however, effective topical antiseptic application within this time-dependent window can suppress biofilm reformation [strong agreement, mean 4.0, SD 0.67].
- Topical antiseptics that are effective antibiofilm treatments should have strong antibiofilm effects in appropriate in vitro test models against mature biofilms [strong agreement, mean 4.0, SD 0.67].
- In vitro biofilm methods with clinically relevant test conditions are useful to screen treatments for their antibiofilm efficacy [strong agreement, mean 4.5, SD 0.71].
- RCTs and comparative clinical evidence of antibiofilm treatment should be used to support clinical guidelines, protocols, and treatment choices. However, in the absence of RCT-level data, antibiofilm interventions should be supported by RCT evidence of the broader impact on wound healing [strong agreement, mean 4.2, SD 0.79].

Debridman, biyofilmlere karşı en önemli tedavi stratejilerinden biridir, ancak tüm biyofilmleri ortadan kaldırmaz ve bu nedenle tek başına kullanılamaz

Wound Rep Reg (2017) 25 744–757 VC 2017 by the Wound Healing Society

Larva (Maggot) Tedavisi

- Steril şekilde üretilmiş *Lucilia sericata* larvaları
- Biyolojik debritleman
 - Antimikrobiyal etki
 - Granulasyon artışı
- Biyofilm üzerine etki
 - Mekanik
 - Ekzoenzimleri biyofilm tabakasını parçalar
 - Kimotripsin-1 ile kollajenin sindirilmesi sonucu kolonizasyon ↓
 - DNase aktivitesi
 - *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.cloacea*
 - *P.mirabilis*' de biyofilm uyarımı (?)
 - Yeni biyofilm oluşumunu önler

Yan L. et.al. Evid Based Complement Alternat Med 2018 May 3;2018:4934890

Bakteriyofajlar

- Bakteri hücrelerine girerek lizise neden olan «bakteri virusları»
- İç kısımda nükleik asit (DNA/RNA), bunu çevreleyen protein yapıda kapsid
- Antibiyofilm etkili immunoterapi
- Bakteriyofaj kodlu peptidoglikan hidrolazlar → Lysin
 - *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*
 - *A.baumannii*, *P.aeruginosa*
- Tüm bakteriyofajla kullanıma uygun değil !

Schuch R. et.al. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jun 27;61(7). pii: e02666-16
Mendes JJ et.al. J Med Microbiol. 2014;63(Pt 8):1055–1065.

Gelecek.....

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

open access to scientific and medical research

 Open Access Full Text Article

REVIEW

Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review

Gupta et al. *Nanoscale Research Letters* (2017) 12:454
DOI 10.1186/s11671-017-2222-6

Nanoscale Research Letters

NANO REVIEW

Open Access

Nanoparticles as Efflux Pump and Biofilm Inhibitor to Rejuvenate Bactericidal Effect of Conventional Antibiotics



Divya Gupta^{1,2}, Ajeet Singh³ and Asad U. Khan^{1*}

- Biyofilm içinde antibiyotiklerin taşınmasını sağlayan nanopartikül konjuge antibiyotik teknolojisi
- Antibakteriyel ve antibiyofilm nanopartiküller geliştirilmek

Sonuç

- İyileşmeyen kronik yaralar, ilişkili sistemik patolojilerin düzeltilmesinin ardından, **biyofilm bazlı tedavinin** temel unsurlarını gerektirir.
- Debritmanı izleyen ilk 24 saat biyofilmi önlemede önemli
- Etkili debritmanı izleyerek hızla etkili antibiyofilm tedavisi
- Kademeli azaltma

