

Kronik Yarada Antimikrobiyal Tedavi Yönetimi: Biyofilmin Önemi ve Yönetimi

Alper ŞENER

Kronik Yara

- Kronik yaralar, genellikle 3-4 hafta iyileşmeyen veya iyileşme belirtisi göstermeyen yara = kronik yara
- En sık
 - Diyabetik ayak yarası (ülseri)
 - Bası yarası (yatak yarası)
 - Vasküler ülser (Arteriyel veya vönöz)

Diyabetik Ayak İnfeksiyonları (DAİ)

Tüm yaralar içinde en sık
görülenidir... bunu yönetebilen
her yarayı yönetir....

Bir yara neden iyileşmez?

Hipoinsülinemi

- Azalmış nörotropik faktörler**
- İnsuline like growth factor
 - Vascular endothelial growth factor
 - Neurotrophin 3

Periferik sinir onarımı azalması

Hiperglisemi

Hücre içi glukoz artışı

Protein Kinaz Yolu

- Enflamasyon artışı**
- Protromboz
 - Vasokonstrüksiton
 - Arteriyel kalınlaşma

İskemi

AGE yolu

- Advanced Glycation End products**
- Enflamasyon
 - Vasküler permeabilite artışı
 - Prokoagülan aktivite
 - Monosit eflüks

Artmış serbest radikal oluşumu

Oksidatif stres

Poliol yolu

Glukoz-sorbitole döner ve hücre içinde birikir

Sensoriyal aksonal kayıp

Küçük miyelinli lifler

Ağrı, hafif temas, ısı duyusu kaybı

Ağrı, parestezi, distezi

Büyük miyelinli lifler

- Propriosepsiyon artışı **veya**
- Vibrasyon kaybı,
- Eldiven & çorap duyu kaybı

Charcot ayağı

SİNİR HIPOKSİSİ

Distal motor aksonal kayıp

- Ayak kasları atrofsi
- Ekstansör-fleksör dengesizliği
- Yük-basınç noktası değişimi

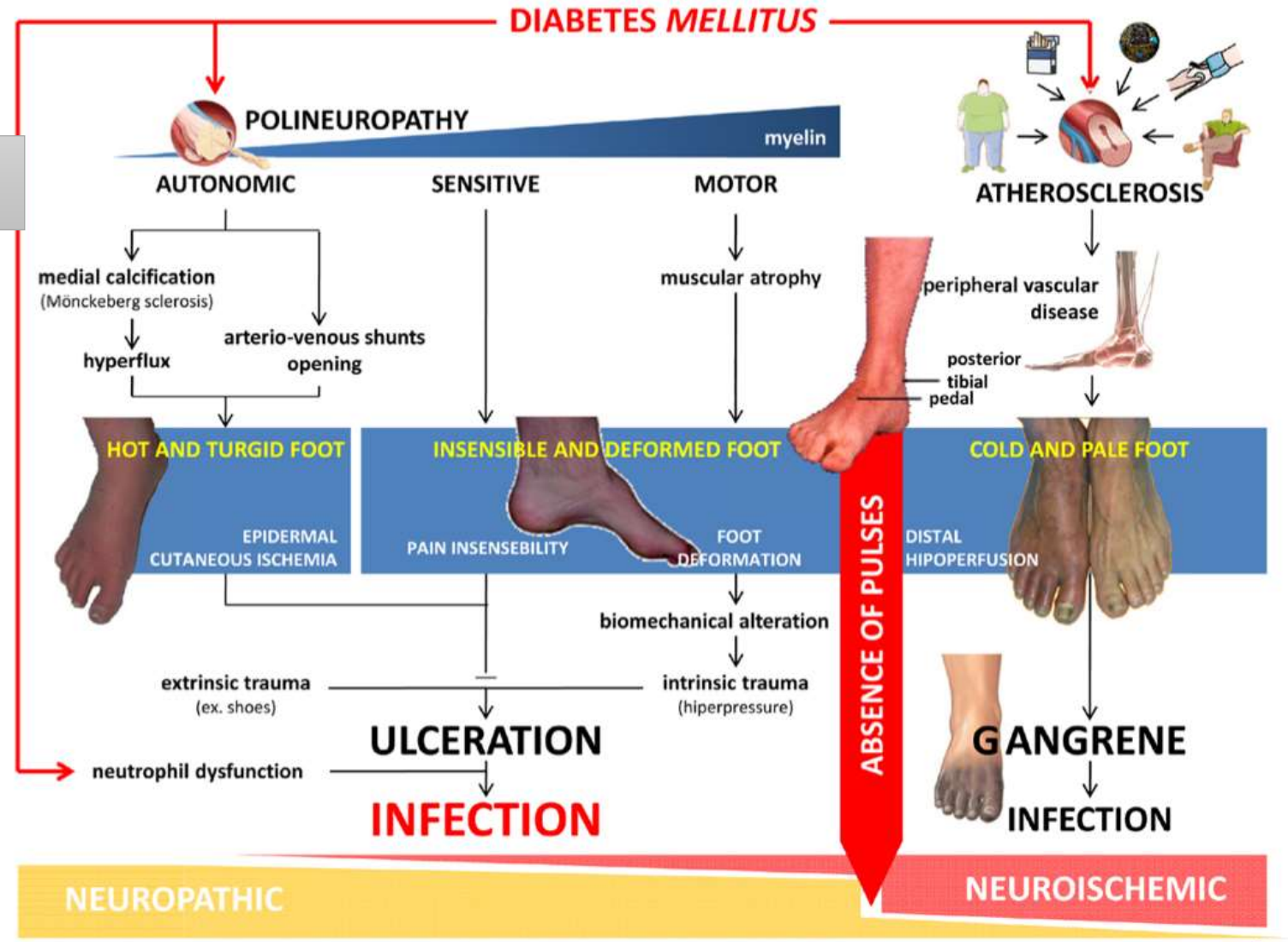
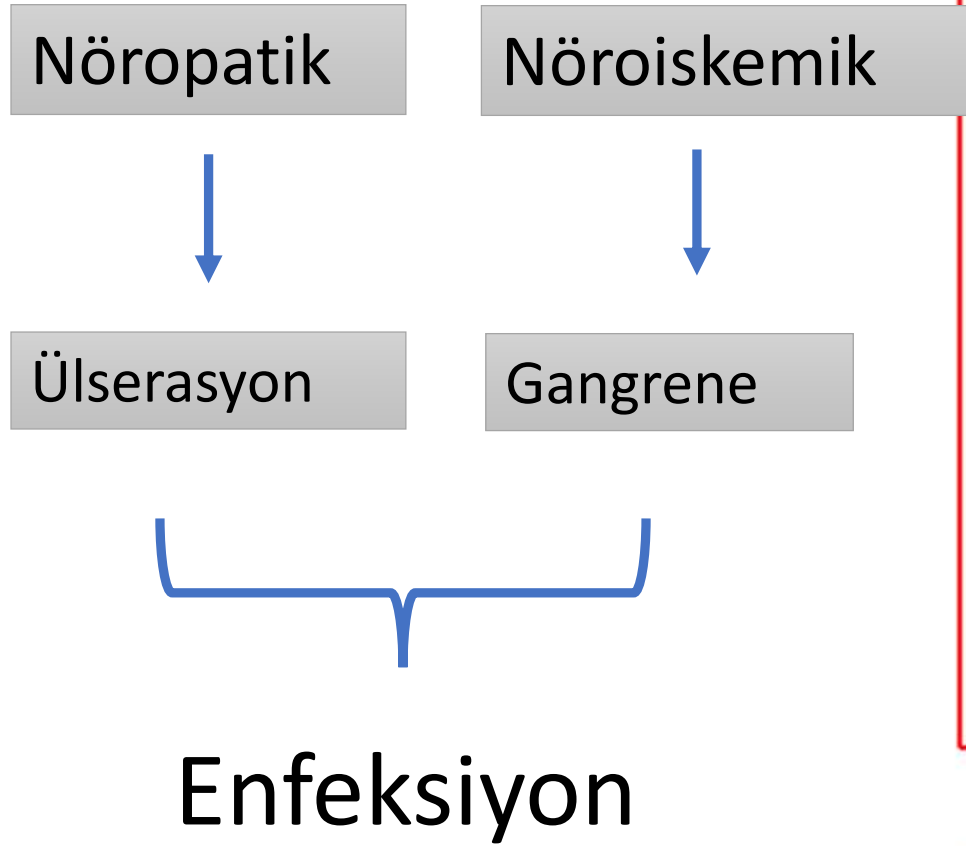
Tekrarlayan ülser - enfeksiyon

Pençe parmak deformitesi

Otonomik nöropati

- **Gastroparezi**
- **Erektile disfonksiyon**
- **Kardiyak-** istirahat taşikardisi, egzersiz intoleransı, ortostatik hipotansiyon

Patogenez



JJ Mendes, J Neves. Diabetic Foot Infections: Current Diagnosis and Treatment.

The Journal of Diabetic Foot Complications, 2012; Volume 4, Issue 2, No. 1, Pages 26-45

Patogenez

Makrofaj, nötrofil göçü



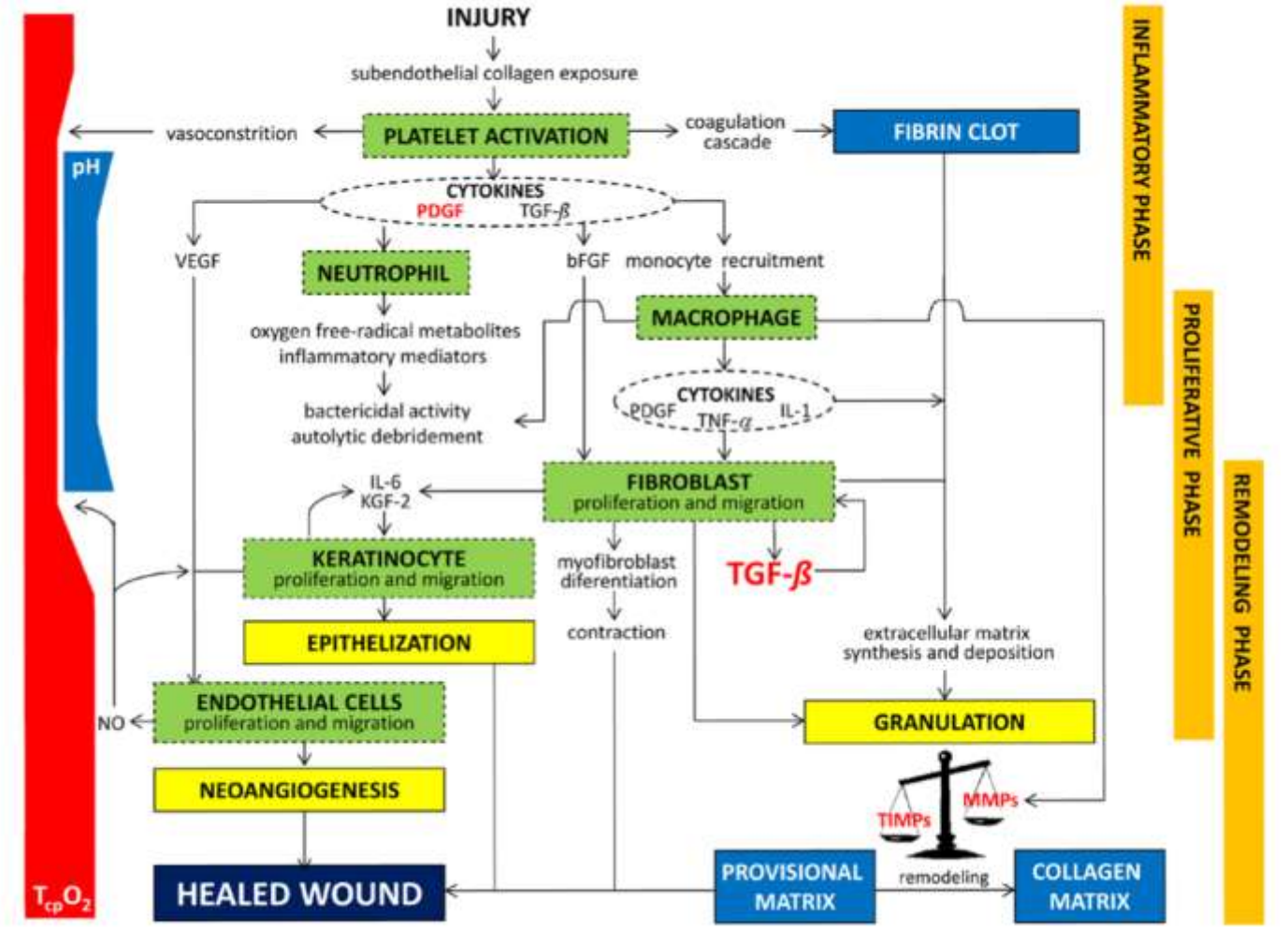
- Enfeksiyon
- Enflamasyon
- Sitokin/kemokin aktivasyonu



Otolitik ve bakteriyel enzimlerin aktivasyonu



- Fibrin tıkaç
- pH azalması, oksijenizasyonun bozulması,
- Nekroz
- Matrix metallo proteinaz
- Doku proteinaz



Enfeksiyon varlığı, yara iyileşmesinin her aşamasını olumsuz etkiler...

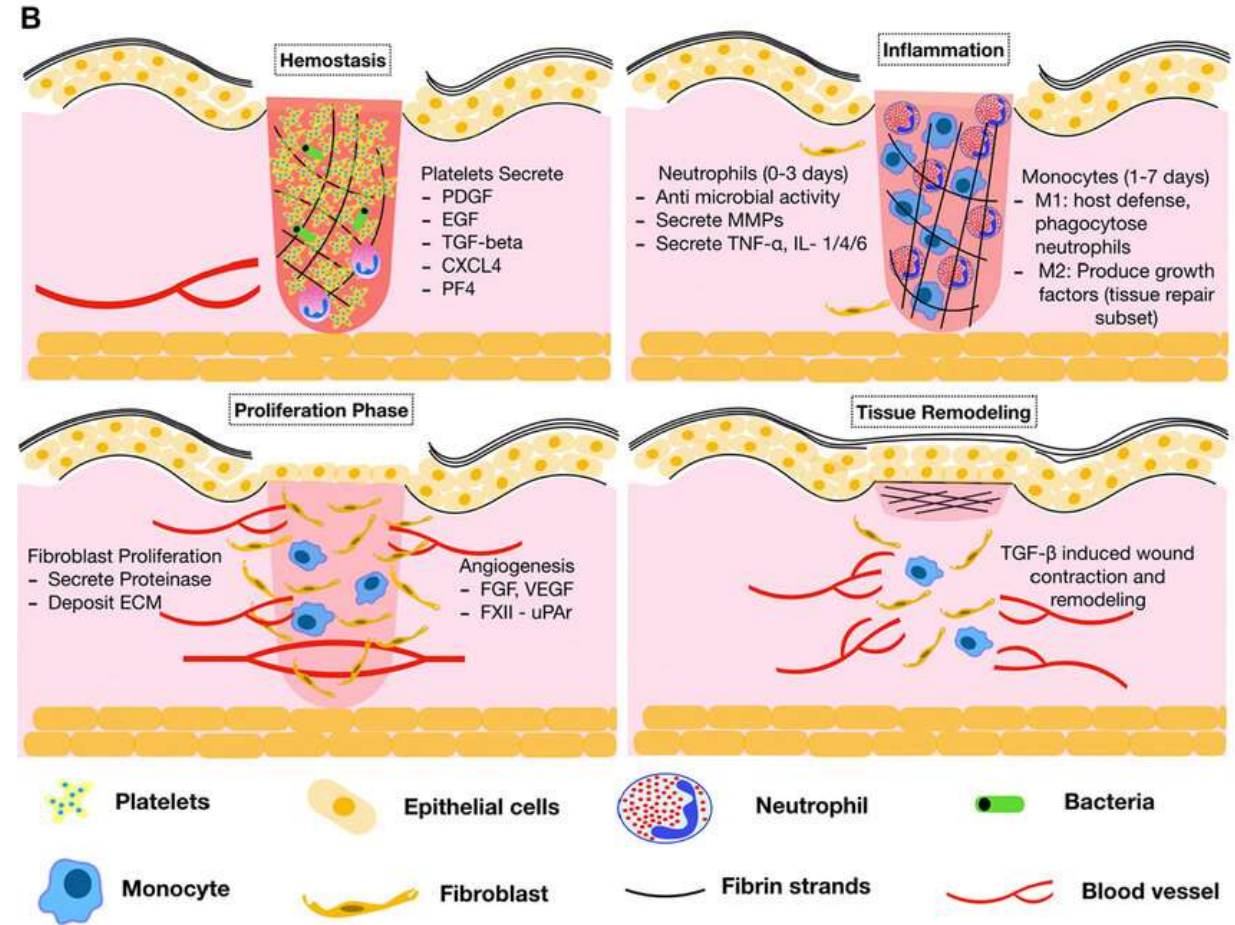
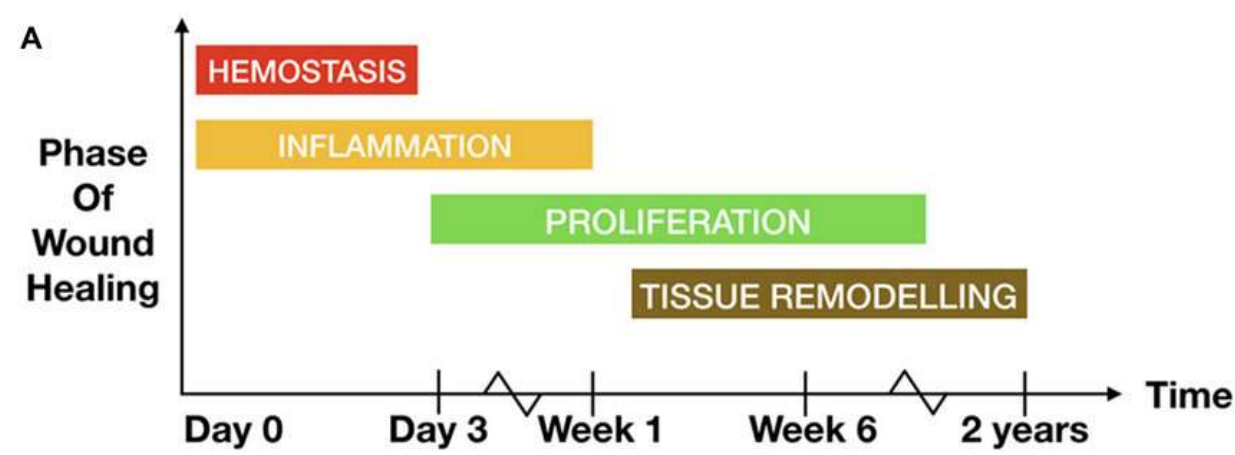
Yara iyileşmesinde kritik aşamalar?

1. Hemostaz-Trombosit sekresyonları
-Bakteri invazyonu

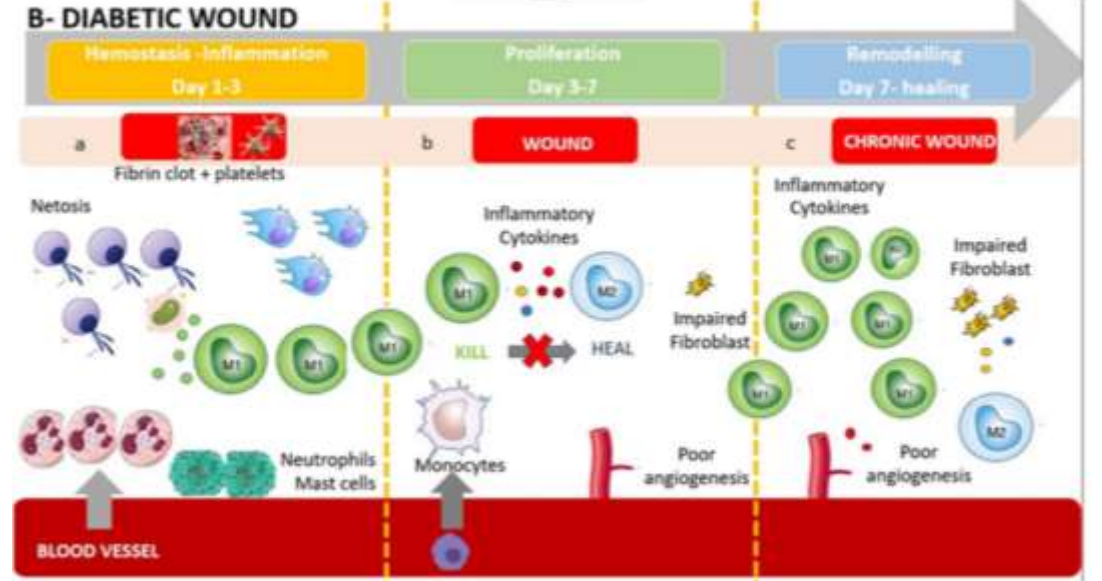
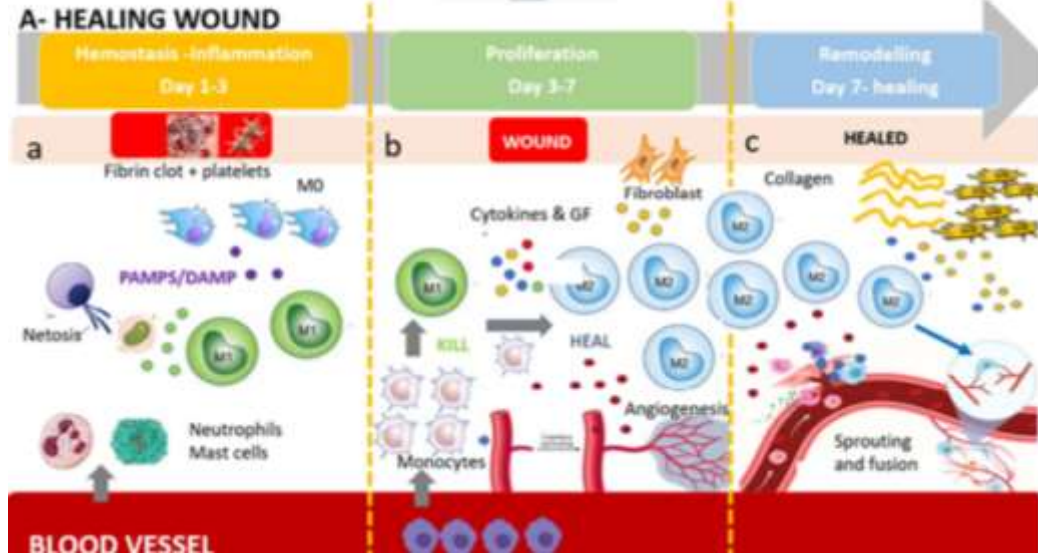
2. Enflamasyon -Doku pH
-Biyofilm

3. Proliferasyon-Fibroblast
-Anjiyogenezis
-Keratinosit göçü
-Epitelizasyon

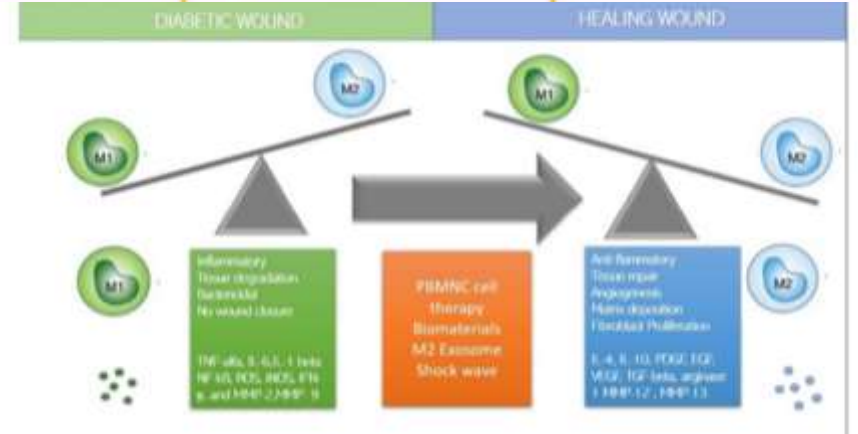
4. Remodelling -Büyüme faktörleri
-Fibrin bantlar
-Kollajen birikimi



İnflamasyon ana yolakta...



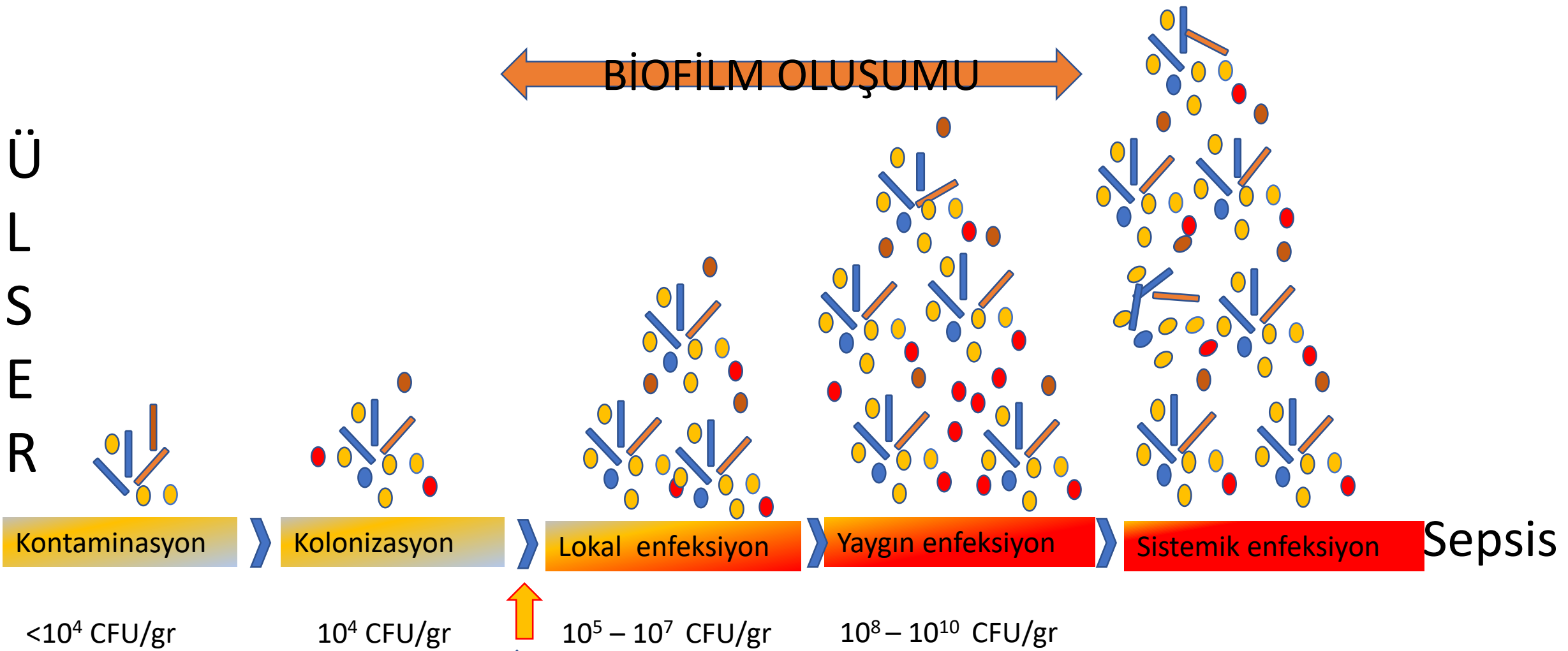
- Nötrofil, mast hücre artışı, inflamatuvar yanıt artışı
- Arteriyel oklüzyon ve mikrosirkülasyon yetmezliği
- Mikrosirkülasyonda kaçaklar
- Angienez bozulması...
- Fibroblast aktivitesi bozulması...
- Hipoksik doku hasarı... oksidatif stress
- Persistan inflamasyon
- **M2 ye dönüş azalması...bozulmuş fibroblast aktivitesi**



Rehak L, Giurato L, Meloni M, Panunzi A, Manti GM, Uccioli L. The Immune-Centric Revolution in the Diabetic Foot: Monocytes and Lymphocytes Role in Wound Healing and Tissue Regeneration-A Narrative Review. J Clin Med. 2022 Feb 8;11(3):889. doi:

Ü
L
S
E
R

← BIOFİLM OLUŞUMU →

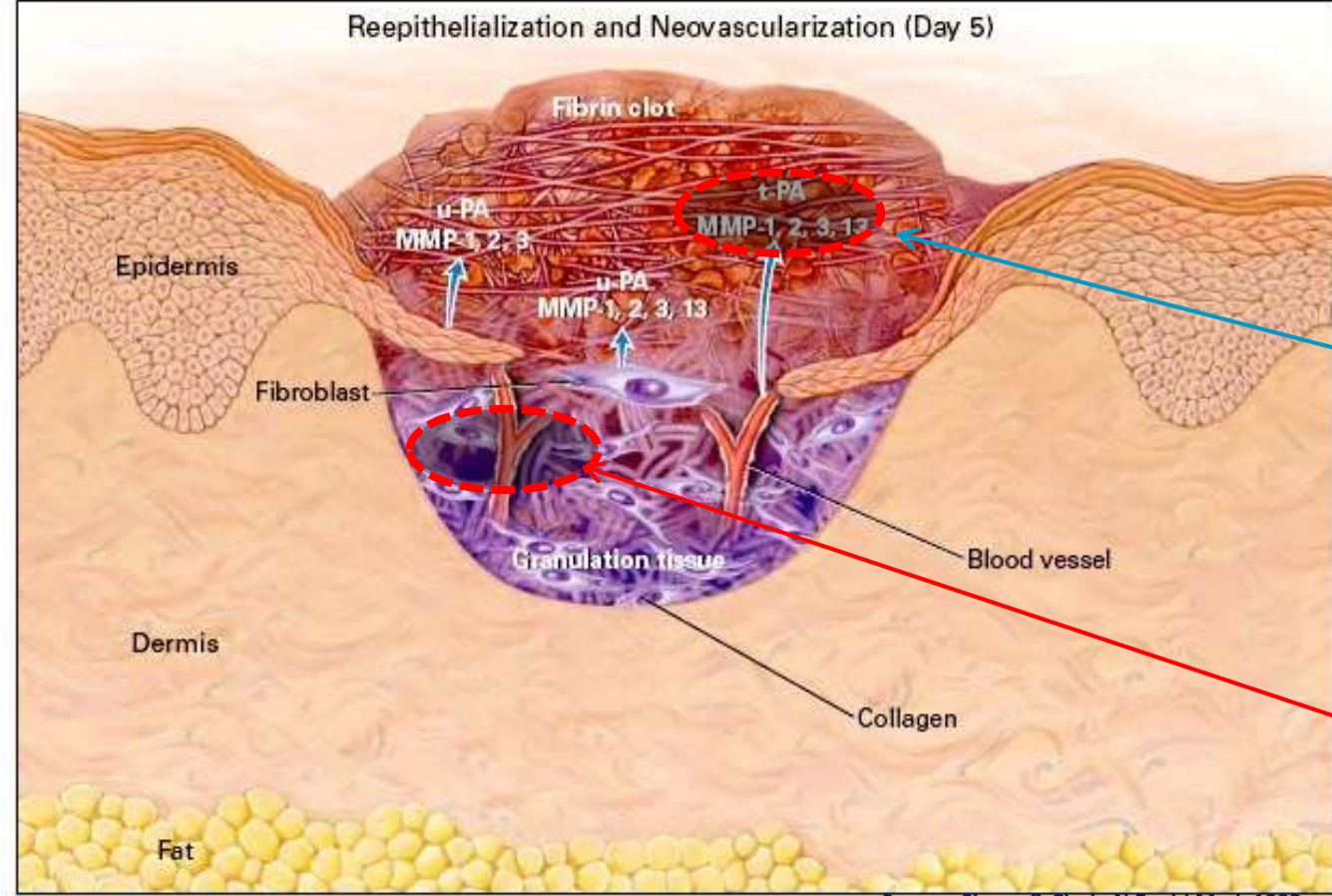


↑
Yara iyileşmesi
bozulmaya
başlar

Caldwell, M.D. Bacteria and Antibiotics in Wound Healing. *Surg. Clin. N. Am.* **2020**, *100*, 757–776.'den değiştirilerek alınmıştır.

Kronik Yarada Oksijen Seviyesi Düşüktür

- **Hipoksik ortam**
- Biyofilm
- Fibrinöz eksüda
- Bozulmuş granülasyon
- Doku yıkım enzimleri (sitokromoksidaz, matriks metalloproteinaz, kollajenaz, hyalülonidaz)
- Yarım-yamalak oluşan kollajenlerin yıkımı...



Yara yüzeyindeki pO₂ 60 mmHg

Yara merkezindeki pO₂ <10 mmHg

Source: Singer & Clark, N Engl J Med, 1999

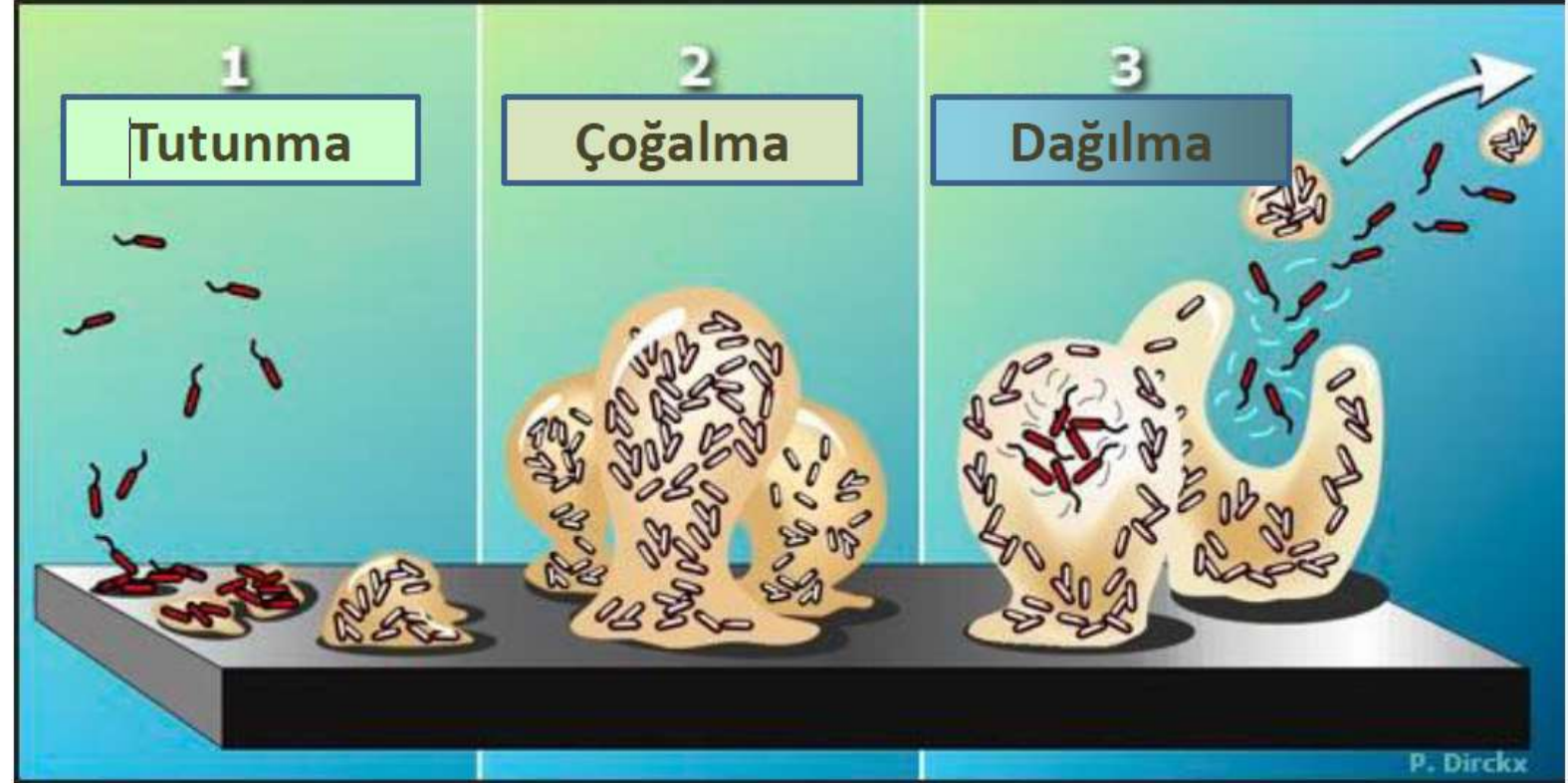
Vasküler yatak normal bile olsa, vasküler yan yollar ve çalma ile doku hipoksisi kaçınılmaz

Biyofilm-tanım...

- Mikroorganizmalarca oluşturulan; herhangi bir yüzeye/ ara yüzeye tutunan, farklı fenotip gösterebilen, ekstrasellüler polimerik matriks içerisinde bulunan mikrobiyal yapı kümeleridir
- Biyofilmlerin en belirgin özelliği
 - Polisakkaritler yapıdadır,
 - Ekstraselüler DNA (eDNA) içerir
 - Proteinlerden oluşan hücre dışı polimerik maddenin (EPS) içerir...

Biyofilm Oluşum Aşamaları

1. Yüzeğe tutunma
2. Mikrokolonilerin oluşumu
3. Matriks sentezi
4. Olgun biyofilm
5. Dağılma evresi



Invisibility cloak



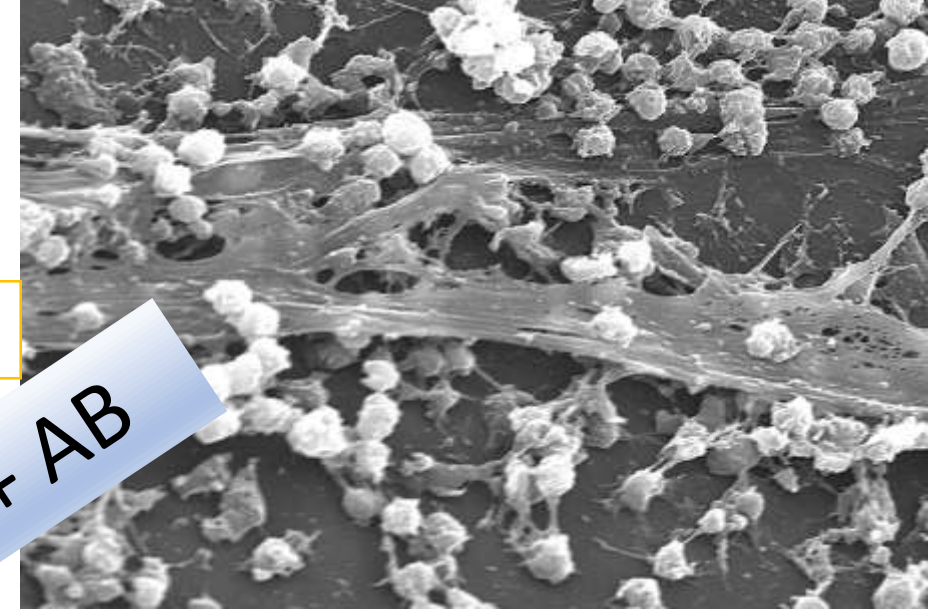
Kronik Yaralarda Biyofilmin Önemi?

1. Antibiyotiklere direnç...
2. Fagositozdan kaçış..
3. Kronik inflamasyon...

Her kronik yarada biyofilm var mıdır?
Nasıl anlaşılır?

Biofilm

Yapışma ➤ Bakteriyel Çoğalma ➤ Matürasyon ➤ Ayrılma



En çok biofilm üreten bakteriler
(ekstrasellüler matriks)

- *E.coli*
- *P.aeruginosa*
- *S. epidermidis*
- *S. aureus*
- *E. coli*
- *K.pneumonia*
- *A.israelii*
- *B.cepacia*
- *H.influenzae*

TEDAVİSİ DEBRİDMAN + AB

- Kimyasal yapısı
 - %97 su
 - %2-5 bakteri
 - %1-2 polisakkaritler
 - %1-2 protein
 - <%1-2 RNA –DNA (yıkım
 - Ürünleri)

Biyofilmin Mikrobiyal Özellikleri?

- Polimikrobiyal,
- EPS matriks= mikroorganizmaları koruyan bariyer,
- Quorum sensing =bakteriler arası iletişim ve biyofilm içine çekilme...
- Metabolik inaktivitesi azalmış bakteri = uyku hali= antibiyotik etkinliği azalması (AB'ler bölünme fazına maksimum etki gösterir)
- AB'ler biyofilm yüzeyine düşük penetrasyonu...içine geçiş çok mümkün değil... özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi...

Biyofilm içine düşük penetrasyon?

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

ÖZET- biyofilm içinde bakteri korunur...

Mikro çevre deęişiklikleri?

- Biyofilmin heterojen yapısı **antibiyotik direncinde artışa** yol açar (aminoglikozid, tetrasiklin ve makrolidler)...
- Biyofilm mikroçevresinde oluşan **pH ve osmotik değişiklikler** de antimikrobiyal ilaç etkinliğini değiştirmekte...Asidik/bazik ortam...
- **Oksijenin** biyofilmin yüzey katmanlarında **tüketilmesi** ve shuntlar ve çalma fenomeni ...yara zemininde **anaerob ortam**...

Diyabetik ayak ülseri biyofilm ilişkisi

- Ülser- mikroçevre-cilt florası **% 60 – 80 oranında biyofilm** üretmekte...
- Biyofilm içinde **tek** bir mikroorganizma veya **birden fazla tür** olabilir...
- **Hiper glisemik ortam** ekstrasellüler polimerik substans (EPS) ekspresyonu ile biyofilm oluşumunu artırır...

Diyabetin kronik yarada biyofilme etkisi

- EPS, fagositozu önler... hücrelerin biyofilme penetrasyonunu azaltır...
- Biyofilm içindeki bakteri, nötrofil ve makrofaj salgısı (proinflamatuvar sitokinler) kronik inflamasyona neden olur...M1 vs M2 yanıtı...
- Biyofilm içindeki polisakkarid bileşenler konak antikor ve komplemanı inaktive eder...antikor gelir, bağlanır, ayırlamaz...
- Konak immün faktörlerinde birikim, immün kompleks hasarına sebep olur ve kronik inflamasyonu başlar ve genişler...

Antibiyotik ve dezenfektan direnci

- Olgunlaşmış biyofilm içindeki bakterileri inhibe etmek için **100 – 1000 kat daha yüksek antibiyotik konsantrasyonu** gerekir.
- MİK değerlerinin altında kalan antibiyotik konsantrasyonları dirençli suşların seçilmesine ve MDR gelişimine katkıda bulunur
- Biyofilm oluşturan bakteriler serbest üreyen bakterilere göre **dezenfektanlara 10 - 100 kat daha dirençlidir...**

Biyofilmin Tanısı-1

- **Klinik olarak:**

- Granülasyon dokusunun zayıf olması, iyileş(e)meyen yara...mehter takımı
- Zaman kanama...
- Koku...
- Masif/taşan exüdasyon

- **Laboratuvar:** Konfokal mikroskopi, FISH, PCR teknikleri...

- **Rutin pratikte biyofilm tanısı zordur.**

Biyofilmin Tanısı-2

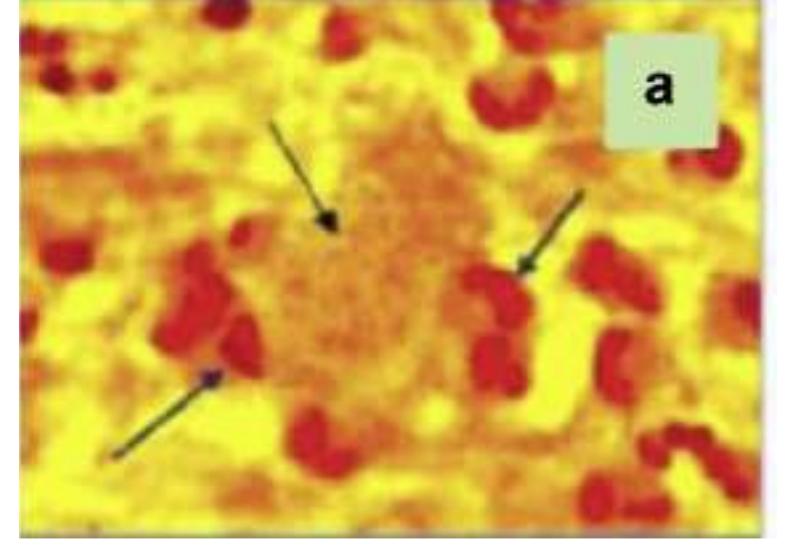
- En güvenilir yöntem **doku biyopsisi**
- Alınan **doku örneğinin ezilmesi ve doku homojenizasyonu sağlanması** biyofilm saptanma olasılığını artırır.
- Biyofilm formasyonu canlı ve küçük dokularda 4 - 200 μm , cansız yüzeylerde 5 - 1200 μm boyutlarında
- Antibiyotik baskısı altında üretilemeyen bakterilerde moleküler teknikler kullanılabilir...

Biyofilmin Tanısı-3

- Konfokal lazer tarama mikroskopu?
- Elektron mikroskopisi?
- PNA FISH (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization)?
- Hazırlık aşamasında örnekleri **sonikasyon uygulaması** vorteksleme ve mekanik kazıma işlemlerine göre çok daha etkili ...

Biyofilmin Tanısı

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



P.aeruginosa

A-İmmatür biyofilm

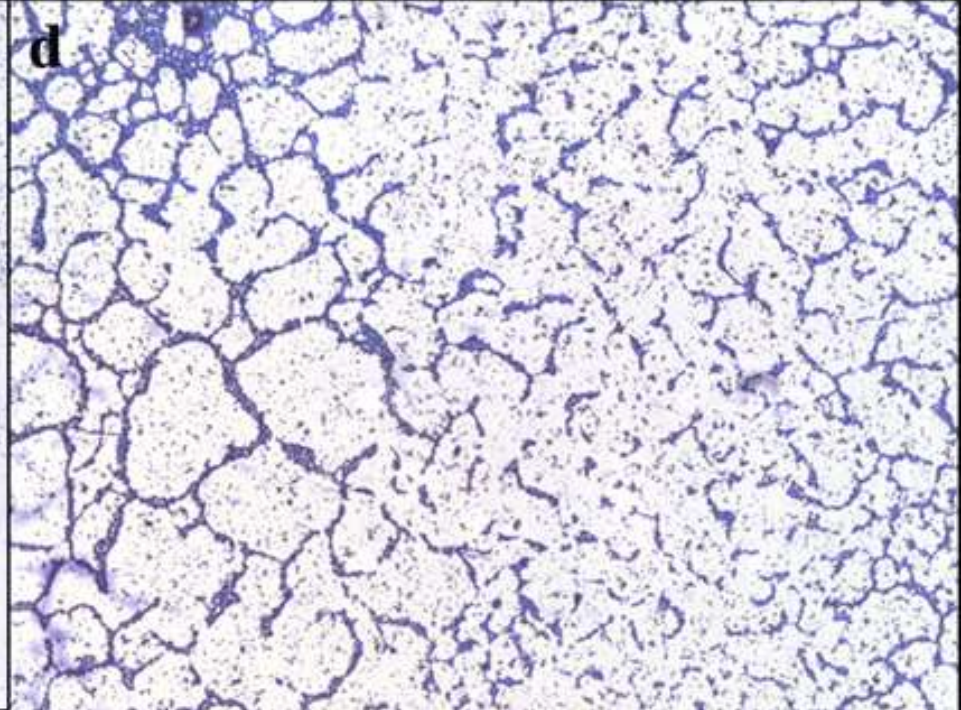
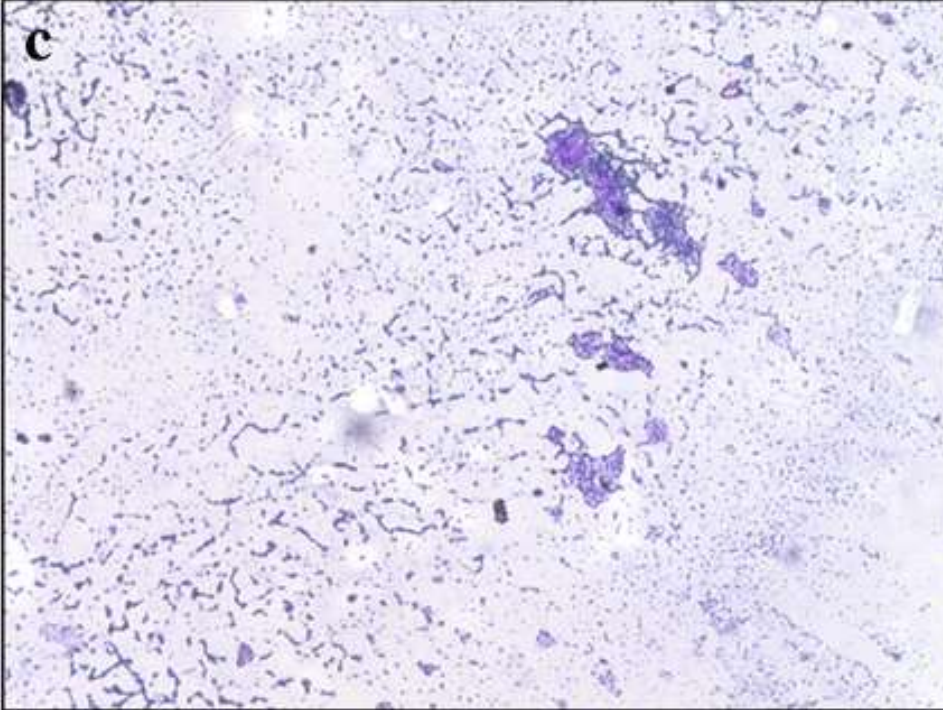
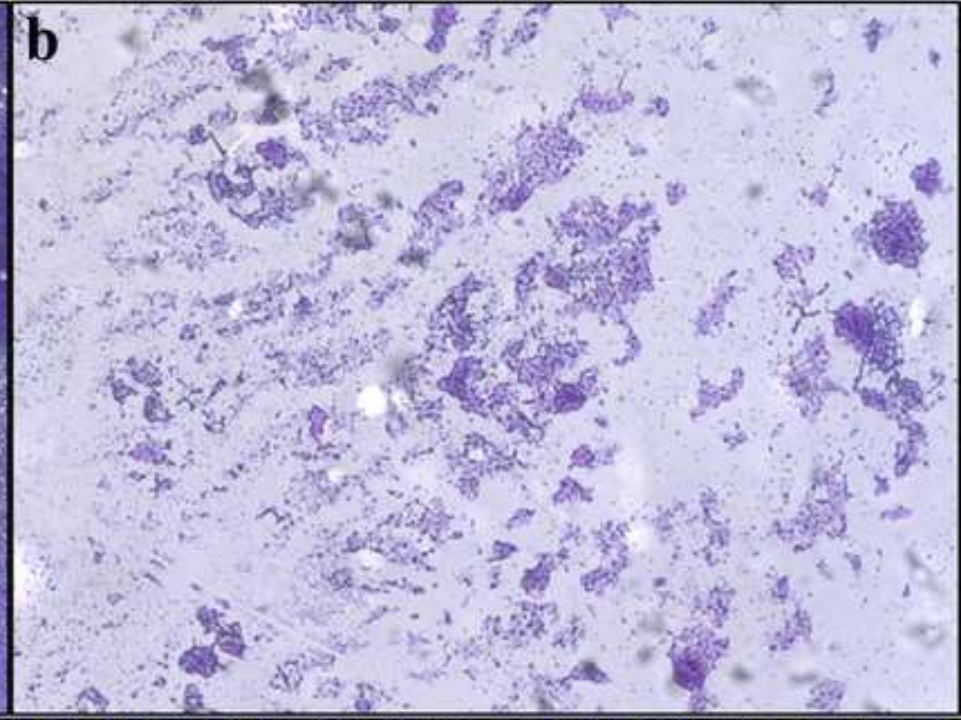
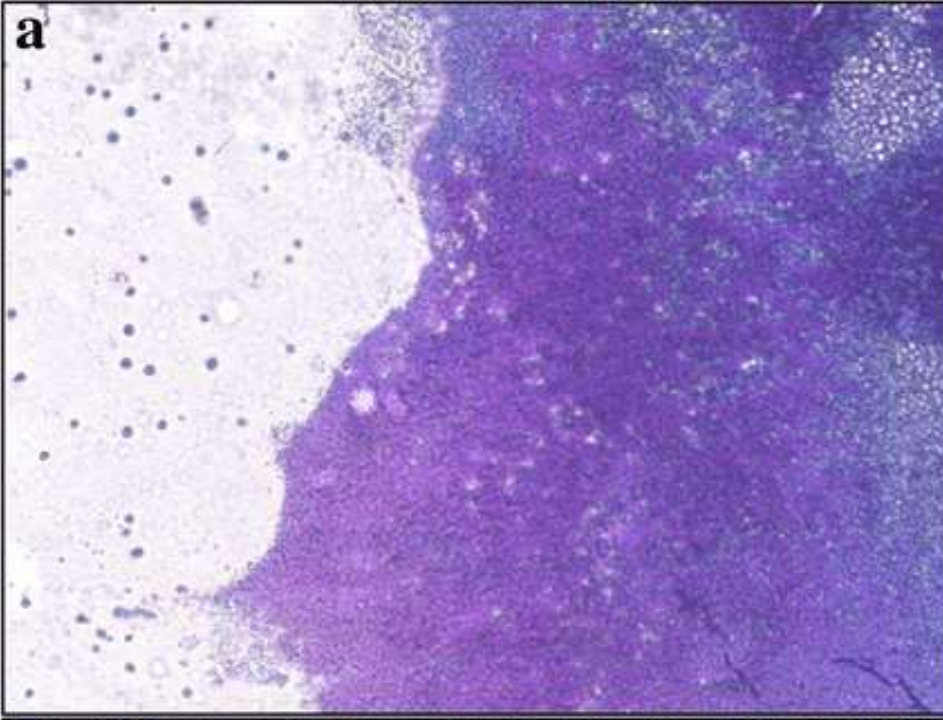
B-3. saat

C-6.saat

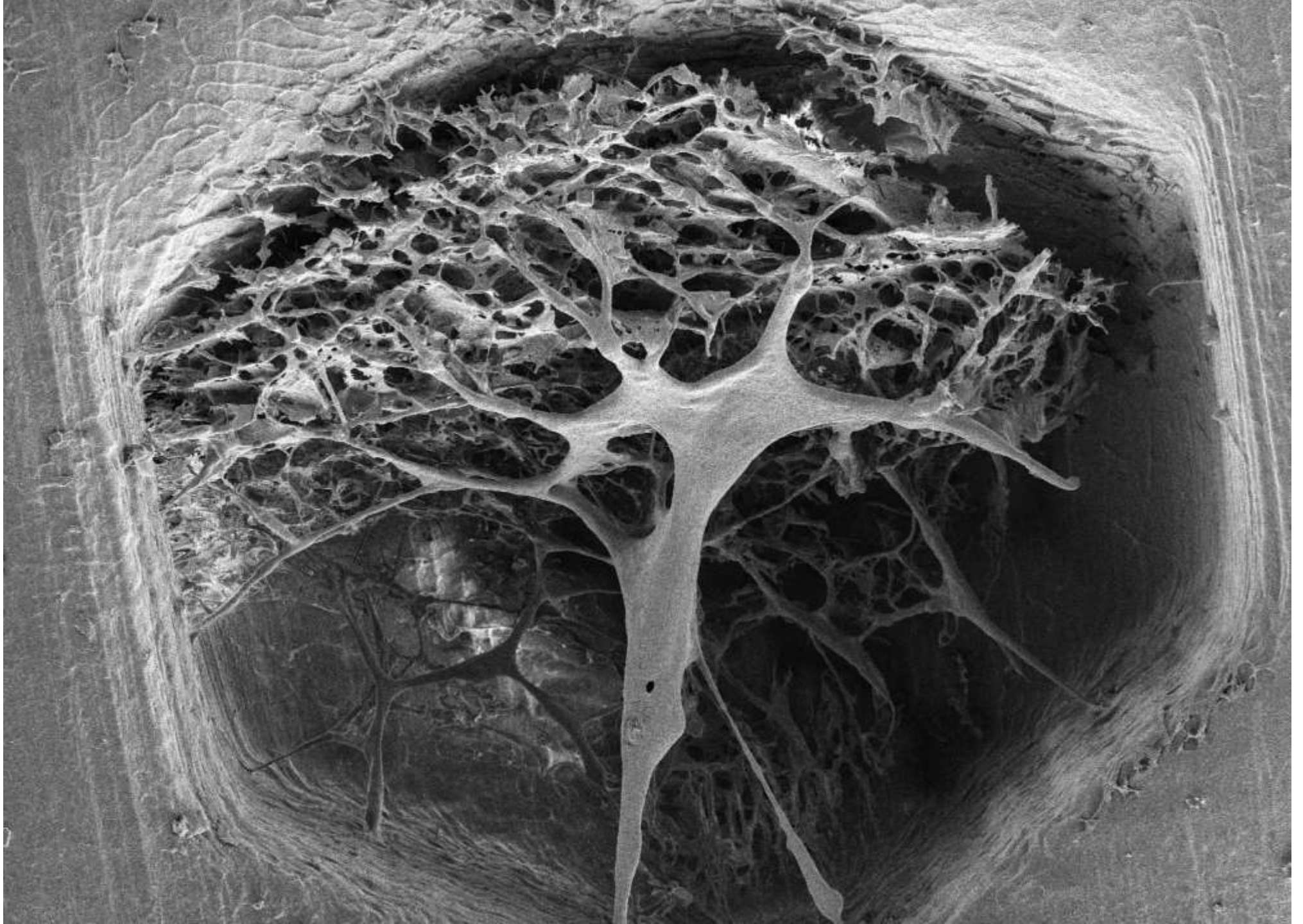
D-24.saat

Besi yeri,kristal viole

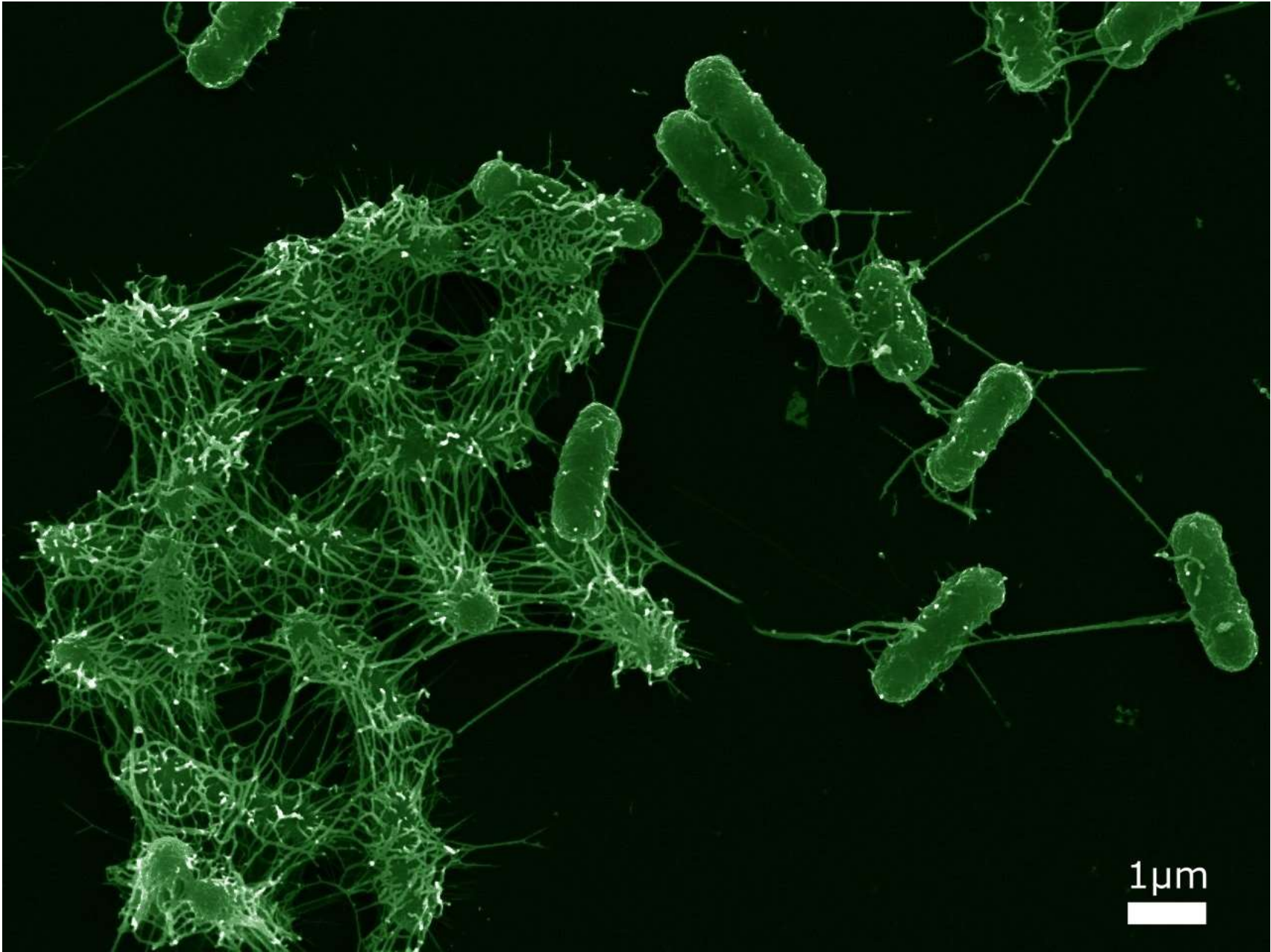
En büyük sorun x200
ve üstü büyültme
daha net yorum
yaptırıyor




SEM



SEM



Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection

Aslı Vatan¹ | Nese Saltoglu¹  | Mucahit Yemisen¹ | Ilker Inanc Balkan¹ | Serkan Surme¹ | Tayfur Demiray³ | Birgul Mete¹ | Fehmi Tabak¹ | Study Group, Cerrahpasa Diabetic Foot²

¹Cerrahpasa Medical Faculty, Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul University, Istanbul, Turkey

²Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey

³Sakarya University Medical Faculty, Microbiology, Sakarya, Turkey

Correspondence

Nese Saltoglu, Istanbul University Cerrahpasa Medical Faculty, Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul University, Istanbul, Turkey.

Email: saltoglu.nese@gmail.com


Summary

Purpose: We aimed to determine significant risk factors for biofilm production and to investigate the association between antimicrobial resistance profile and biofilm formation in the bacterial isolates obtained from patients with diabetic foot infection (DFI).

Methods: Demographic, clinical, laboratory and outcome data of 165 patients, prospectively recorded and followed between January 2008 and December 2015 by a multidisciplinary committee, were analysed. Standard microbiological methods were adopted. Risk factors associated with biofilm were determined by univariate and multivariate analyses.

Results: The overall rate of biofilm production among 339 wound isolates was 34%. The biofilm production rate was significantly higher in Gram-negative micro-organisms (39%) in comparison with Gram positives (21%) ($P = .01$). *A. baumannii* presented the highest biofilm production (62%), followed by *P. aeruginosa* (52%) and *Klebsiella spp.* (40%). On univariate analysis, significant factors associated with biofilm were antibiotic use within last 3 months (OR:2.94, CI: 1.5-5.75, $P = .002$), recurrent DFI within last 6 months (OR:2.35, CI: 1.23-4.53, $P = .01$), hospitalisation within last 3 months due to ipsilateral recurrent DFI (OR:2.44, CI: 1.06-5.58, $P = .03$), presence of amputation history (OR: 2.20, CI: 1.14-4.24, $P = .01$), multidrug-resistant (MDR) micro-

Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection

Aslı Vatan¹ | Nese Saltoglu¹  | Mucahit Yemisen¹ | Ilker Inanc Balkan¹ | Serkan Surme¹ | Tayfur Demiray³ | Birgul Mete¹ | Fehmi Tabak¹ | Study Group, Cerrahpasa Diabetic Foot²

¹Cerrahpasa Medical Faculty, Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul University, Istanbul, Turkey

²Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey

³Sakarya University Medical Faculty, Microbiology, Sakarya, Turkey

Correspondence

Nese Saltoglu, Istanbul University Cerrahpasa Medical Faculty, Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul University, Istanbul, Turkey.

Email: saltoglu.nese@gmail.com

Summary

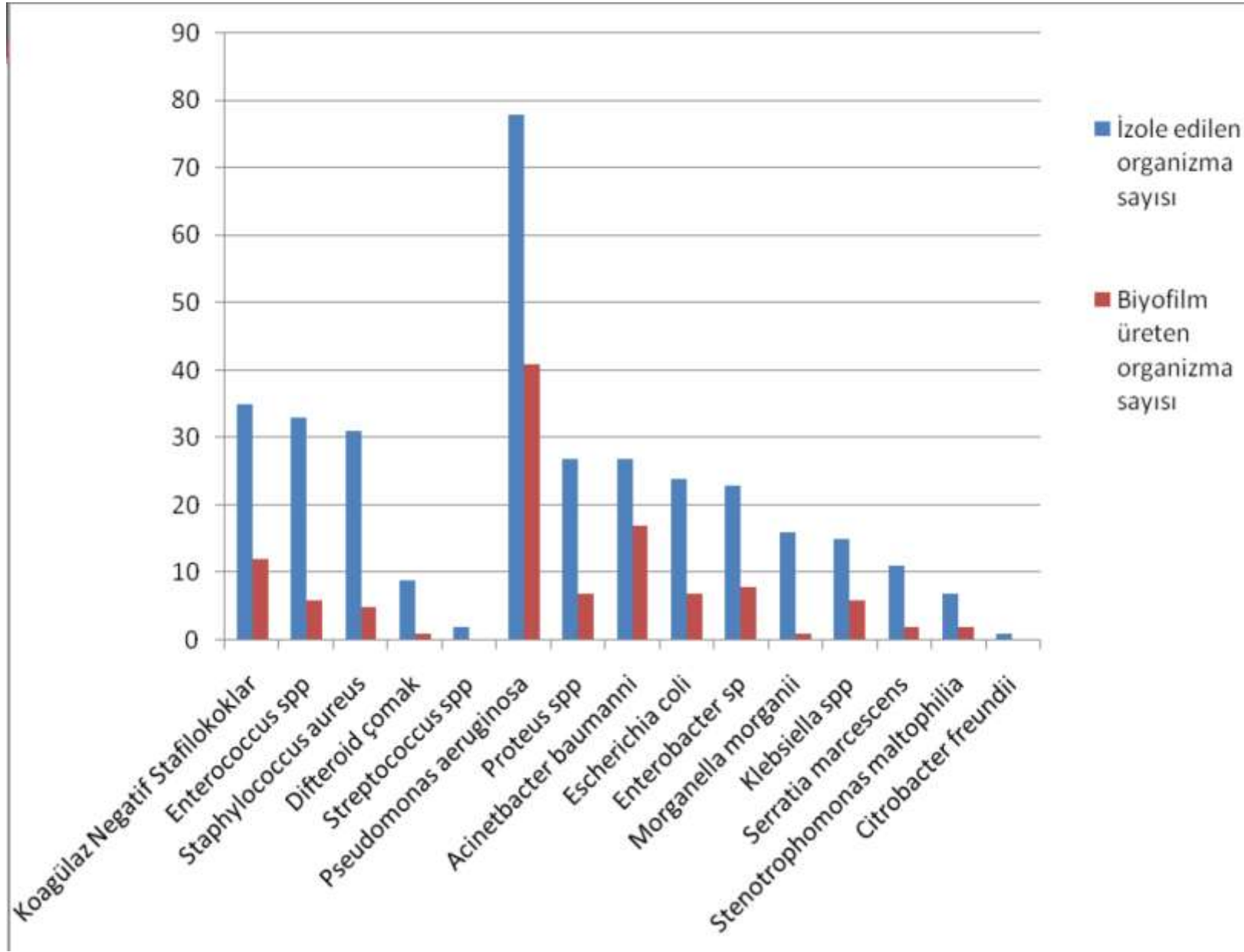
Purpose: We aimed to determine significant risk factors for biofilm production and to investigate the association between antimicrobial resistance profile and biofilm formation in the bacterial isolates obtained from patients with diabetic foot infection (DFI).

Methods: Demographic, clinical, laboratory and outcome data of 165 patients, prospectively recorded and followed between January 2008 and December 2015 by a multidisciplinary committee, were analysed. Standard microbiological methods were adopted. Risk factors associated with biofilm were determined by univariate and multivariate analyses.

Results: The overall rate of biofilm production among 339 wound isolates was 34%. The biofilm production rate was significantly higher in Gram-negative micro-organisms (39%) in comparison with Gram positives (21%) ($P = .01$). *A. baumannii* presented the highest biofilm production (62%), followed by *P. aeruginosa* (52%) and *Klebsiella spp.* (40%). On univariate analysis, significant factors associated with biofilm were antibiotic use within last 3 months (OR:2.94, CI: 1.5-5.75, $P = .002$), recurrent DFI within last 6 months (OR:2.35, CI: 1.23-4.53, $P = .01$), hospitalisation within last 3 months due to ipsilateral recurrent DFI (OR:2.44, CI: 1.06-5.58, $P = .03$), presence of amputation history (OR: 2.20, CI: 1.14-4.24, $P = .01$), multidrug-resistant (MDR) micro-

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



Bu çalışmada...TR...

Biyofilm oluşturma oranı en fazla olan bakteriler

- ***A. baumannii* (% 62),**
- ***P. aeruginosa* (% 52),**
- ***Klebsiella* spp. (% 40)**
- **KNS (% 43)**

Biyofilm tedavi ve önleme ve stratejileri

•Debridman

Veya diğerleri...

- Selektif debridman özelliği olan larvaların antimikrobiyallerle kombine kullanımı çalışmaları
- Biyofilm oluşumunu önlemeye yönelik aşı,
- Biyofilm etkili antibiyotik kombinasyonları,
- Topikal antimikrobiyal tedavi rejimleri,
- Antimikrobiyal örtüler (gümüş, iyot)
- Lökosit yamaları
- Otolog plateletten zengin fibrinlerin lokal uygulamaları,
- Bakteriyofaj tedavileri,
- Bal**, dispersin-B, laktoferrin, galyum, bizmut, iyodin
- QS inhibitörleri
- Hiperbarik oksijen

Bakteriyofaj tedavisi

- Patojenik bakterileri azaltmak/ öldürmek için litik bakteriyofajların kullanılması
- Bakteriyofaj polimerik matrikse yayılmakta ve biyofilmi yok etmekte
- Diyabetik ayakta bakteriyofajlar topikal olarak kullanılabilir
- 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
 - *Lactobacillus plantarum*
 - *Lactobacillus reuteri*,
 - *Lactobacillus rhamnosus*,
 - *Lactobacillus casei*,
 - *Lactobacillus acidophilus*
 - *Lactococcus lactis*
 - *Lactobacillus fermentum*

Doğrudan biyofilme etkili ajanlar

- Matriks çözücü enzimler,
- Lökosit yamaları
- Otolog trombositten zengin fibrinlerin lokal uygulamaları?
- Antimikrobiyaller, antiseptikler...
- ESWT
- Soğuk plazma
- Elektrik stimulus
- UV

Sonuç

- Biyofilm varlığı kronik yaralarda en önemli bir sorun!
- Tanısal problemler vardır...Bu neden ile tüm yaralarda varılığı veya olasılığı peşin ön kabul olmalıdır...
- Yalnızca **antibiyotik** tedavisi **yeterli değildir!**
- **Standart bakım** yara bakımı ve **debridman** tedavinin temelidir,
- Biyofilm yönetimi tedavi başarısını belirler...