Kronik Yarada Antimikrobiyal Tedavi Yönetimi: Biyofilmin Önemi ve Yönetimi

DR. SERKAN SÜRME

ENFEKSIYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

DAVİVA AVCILAR HASTANESİ

Kronik Yara

- Kronik yaralar, genellikle 3 aydan uzun süren iyileşme süresi ile tanımlanır.
- En sık
  - diyabetik,
  - bası yarası ve
  - venöz ülserlerde görülür.

Biyofilm

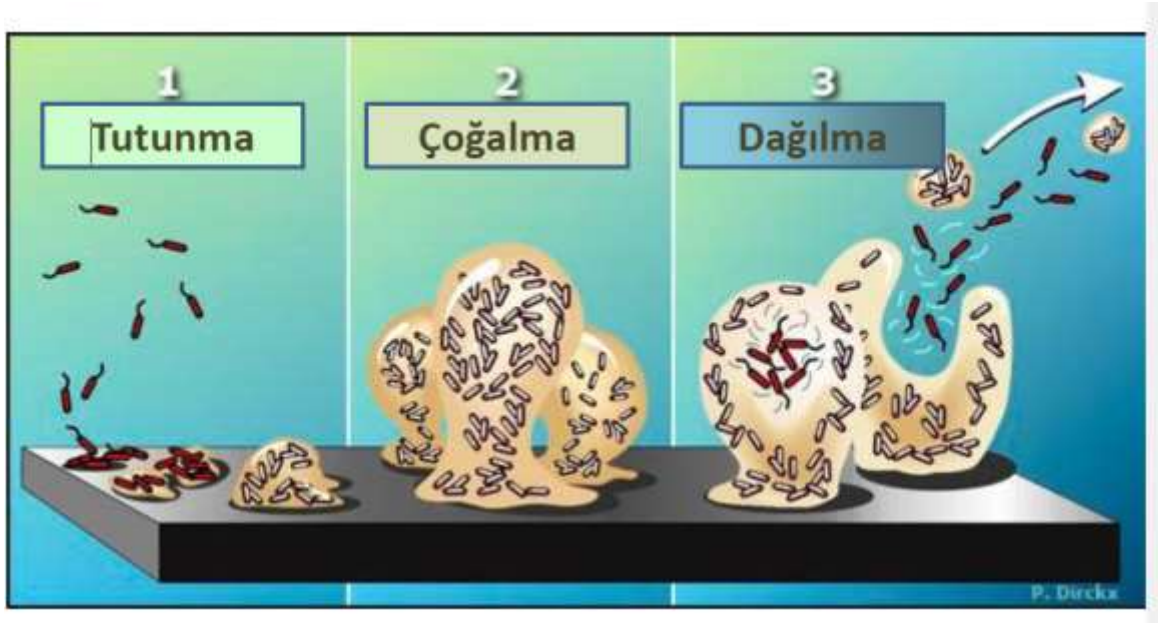
Mikroorganizmalarca oluşturulan; herhangi bir yüzeye/ ara yüzeye tutunan, farklı fenotip gösterebilen, ekstrasellüler polimerik matriks içerisinde bulunan mikrobiyal yapı kümeleridir

Biyofilmlerin en belirgin özelliği

- polisakkaritler,
- ekstraselüler DNA (eDNA) ve
- proteinlerden oluşan hücre dışı polimerik maddenin (EPS) varlığıdır

Biyofilm Oluşum Aşamaları

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



Kronik Yaralarda Biyofilmin Önemi

- Biyofilm, kronik yaralarda iyileşmeyi geciktiren temel faktörlerden biridir
  - antibiyotiklere direnç,
  - fagositozdan kaçış ve
  - kronik inflamasyona neden olur.

Biyofilmin Mikrobiyal Özellikleri

- Polimikrobiyal yapı
- EPS matriksi, mikroorganizmaları koruyan bariyer oluşturur
- Quorum sensing ile gen ekspresyonu düzenlenir
- Metabolik inaktivite, antibiyotik etkinliğini azaltır
- Antimikrobiyallerin biyofilm içine düşük penetrasyonu (özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi)

Biyofilm içine düşük penetrasyon

- *P. aeruginosa*'nın serbest formuna siprofloksasinin penetrasyonu normalde **40 saniye**

- Biyofilm oluşturmuş formunda penetrasyon **21 dakika**

Bakterilerin çoğalma oranlarında değişiklikler

- Biyofilm üreten bakterilerin çoğalma hızı serbest yaşayan formlara göre çok daha yavaş
- Antimikrobiyaller ise hızlı üreyen bakterilere daha etkili
- Biyofilm içindeki osmotik çevre değişikleri 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

- Antimikrobiyal ajanların öncelikli olarak metabolik olarak aktif hücreleri hedef almaları nedeniyle biyofilm içerisindeki heterojen yapı **antibiyotik direncinde artışa** yol açar (aminoglikozid, tetrasiklin ve makrolidler)
- Ayrıca, biyofilm mikroçevresinde oluşan **pH ve osmotik değişiklikler** de antimikrobiyal ilaç etkinliğini değiştirmekte
- **Oksijenin** biyofilmin yüzey katmanlarında **tüketilmesi** ve dip kısımlarda **anaerob ortamın** oluşması özellikle aminoglikozidlerin etkinliğini azaltır ve direnç gelişebilir.

Diyabetik ayak biyofilm ilişkisi

- Ayak yaralarında mikroorganizmalar **% 60 – 80 oranında biyofilm** üretmekte

- Biyofilm içerisinde **tek** bir mikroorganizma türü ya da **birden fazla tür** olabilir.

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

Diyabetin kronik yarada biyofilme etkisi

- 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

Antibiyotik 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 dirençli**

Biyofilmin Tanısı

Klinik olarak: Granülasyon dokusunun zayıf olması, iyileşmeyen yara

Laboratuvar: Konfokal mikroskopi, FISH, PCR teknikleri…

Rutin pratikte biyofilm tanısı zordur.

Biyofilmin Tanısı

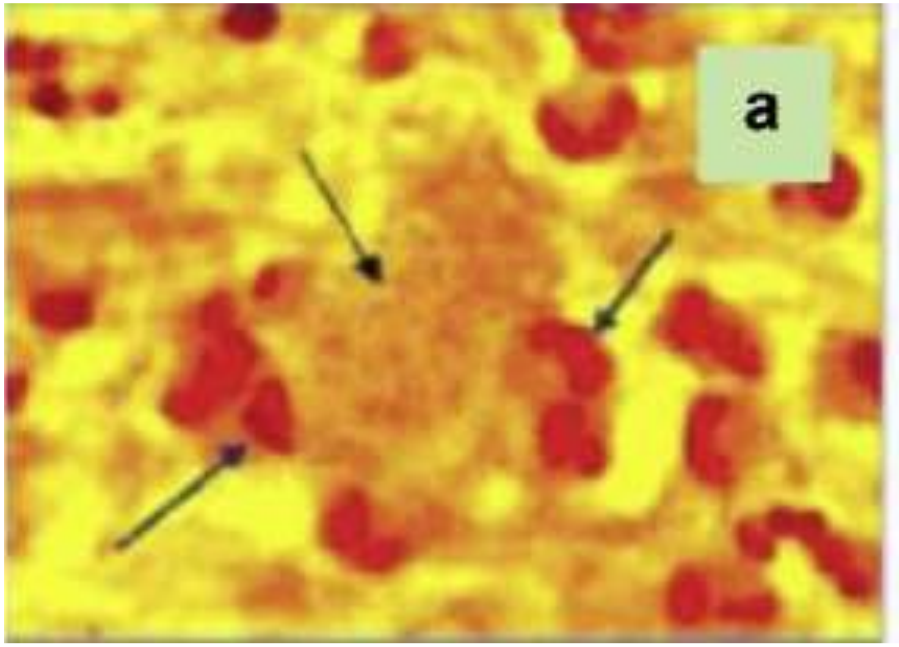
- Yaralarda biyofilmi göstermek için en güvenilir yöntem **doku biyopsisi**
- Alınan **doku örneğinin ezilmesi ve doku homojenizasyonu sağlanması** biyofilm saptanma olasılığını artırır.
- Biyofilm formasyonu canlı ve küçük dokularda 4 - 200 µm, cansız yüzeylerde 5 - 1200 µm boyutlarında
- Antibiyotik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

Biyofilmin Tanısı

- Konfokal lazer tarama mikroskopu,
- Elektron mikroskopisi ve
- PNA FISH (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) doku örneklerinde biyofilmi göstermek için en uygun yöntemler
- Biyofilm tespiti için örnekleri **sonikasyon uygulaması** vorteksleme ve mekanik kazıma işlemlerine göre çok daha etkili

Biyofilmin Tanısı

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



Biyofilmin Tanısı

- Rutin antibiyotik duyarlılık metotlarıyla serbest büyüyen mikroorganizmaların duyarlılık sonuçları belirlenebilir bu sonuçlar tedavi başarısını öngörmede yetersiz

- Biyofilm üreten mikroorganizmalar antibiyotiklere daha dirençlidir ve duyarlılık/direnç sınır değerleri belirlenmemiş

- Biyofilm odağı ortadan kaldırılmadığı sürece rekürrens ve tedavi başarısızlığı!

Received: 1 August 2017 | Accepted: 22 December 2017

DOI: 10.1111/ijcp.13060

ORIGINAL PAPER

WILEY THE INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PRACTICE

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

Aslı Vatan[1] | Nese Saltoglu[1] | Mucahit Yemisen[1] | Ilker Inanc Balkan[1] | Serkan Surme[1] | Tayfur Demiray[3] | Birgul Mete[1] | Fehmi Tabak[1] | Study Group, Cerrahpasa Diabetic Foot[2]

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

[2]Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey

[3]Sakarya 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-

Received: 1 August 2017 | Accepted: 22 December 2017

DOI: 10.1111/ijcp.13060

ORIGINAL PAPER

WILEY THE INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PRACTICE

Association between biofilm and multi/extensive drug resistance

Aslı Vatan[1] | [illegible]

Tayfur Demira[illegible]

[1]Cerrahpasa Medical Faci[illegible] Diseases and Clinical Mic[illegible] University, Istanbul, Turke[illegible]

[2]Cerrahpasa Medical Faci[illegible] University, Istanbul, Turke[illegible]

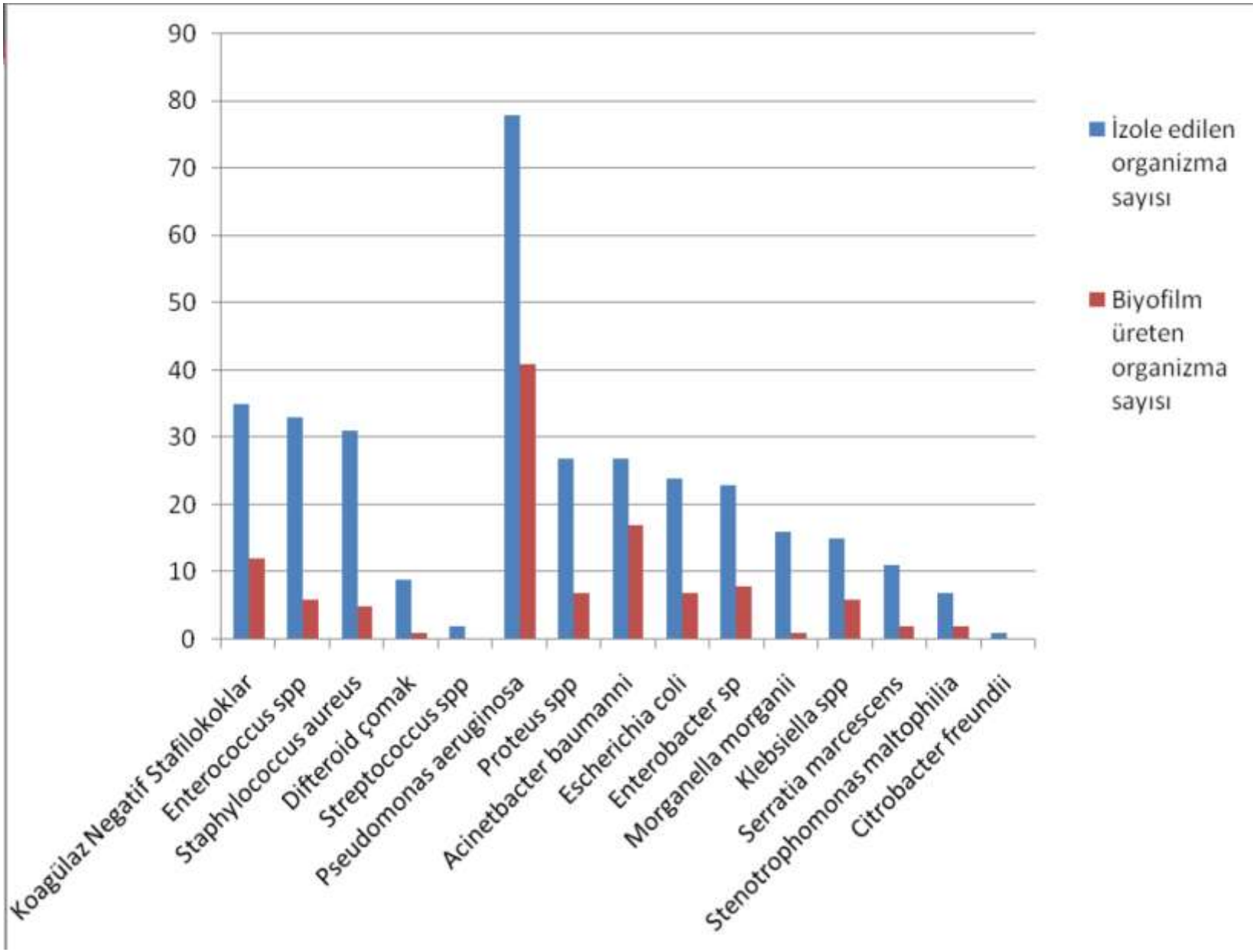
[3]Sakarya University Medi[illegible] Faculty, Microbiology, Sal[illegible]

Correspondence
Nese Saltoglu, Istanbul U[illegible] Medical Faculty, Infectiou[illegible] Clinical Microbiology, Ista[illegible] Istanbul, Turkey.
Email: saltoglu.nese@gma[illegible]

Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler

	Univariate analiz			Multivariate analiz		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Ekstremite ampütasyon 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**

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-


90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
İzole edilen organizma sayısı
Biyofilm üreten organizma sayısı
Koagülaz Negatif Stafilokoklar
Enterococcus spp
Staphylococcus aureus
Difteroid çomak
Streptococcus spp
Pseudomonas aeruginosa
Proteus spp
Acinetbacter baumanni
Escherichia coli
Enterobacter sp
Morganella morganii
Klebsiella spp
Serratia marcescens
Stenotrophomonas maltophilia
Citrobacter freundii

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

Biyofilm önleme ve tedavi stratejileri

- Enzimatik debritman
- 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 veya ortadan kaldırmak 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 fermantum*

Doğrudan biyofilme etkili ajanlar

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

Sonuç

- Biyofilm varlığı kronik yaralarda önemli bir sorun!

- Yalnızca **antibiyotik** tedavisi **yeterli değildir**!

- **Standart bakım** ve **debridman** tedavinin temelidir.

- Bakteri topluluğuna karşı klinisyenler arası iletişimin tam sağlandığı interdisipliner yaklaşım şart.

TEŞEKKÜRLER