

ANTIMIKROBNE OBLOGE ZA INFICIRANI VRIJED I KLINIČKE SPOZNAJE O BIOFILMU

SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ, JASNA LIPOZENČIĆ¹ i SUZANA TUNUKOVIĆ²

*Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za dermatologiju i venerologiju,
¹Akademija medicinskih znanosti Hrvatske i ²Stoma Medical d.o.o., Zagreb, Hrvatska*

Današnje spoznaje i dokazi o biofilmu, interakcije između različitih bakterijskih vrsta, te ukupna virulencija mikroba imaju utjecaj na odgođeno cijeljenje rane i razvoj infekcije. Kvalitetan opis kliničkih simptoma uz suvremena saznanja o mikrobima rane odličan su vodič za kreiranje strategije liječenja kroničnog vrijeda. Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma.

Cljučne riječi: antimikrobne obloge, srebro, infekcija, biofilm, kronični vrijed

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Sandra Marinović Kulišić, dr. med.
Klinički bolnički centar
Klinika za dermatovenerologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 4
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: sandra.marinovic@zg.htnet.hr

UVOD

Otkad postoje, lokalna antimikrobna sredstva uvelike se koriste u terapiji kroničnog vrijeda zbog činjenice da je infekcija rane jedna od najčešćih komplikacija. Lokalna antimikrobna terapija ima svoje prednosti, ali i velike nedostatke. Ključni kriterij za odabir vrste, načina i vremena djelovanja antimikrobnog sredstva je definiranje kriterija znakova infekcije kroničnog vrijeda. S obzirom na činjenicu da su mehanizmi cijeljenja i stanice koje u njemu sudjeluju iznimno osjetljivi na agresivnu primjenu antimikrobnih sredstava s jedne strane, te da je masovna, a nedovoljno ciljana antibiotska terapija s druge strane dovela do pojave masovne rezistencije bakterija, možemo reći da su klinički znakovi i kriteriji prepoznavanja infekcije ključni za pravilno tretiranje kroničnog vrijeda. Iz navedenih razloga u svijetu postoji značajna uloga suvremenih antimikrobnih sredstava s dodatkom srebra, koja istodobno nisu toksična za procese cijeljenja, a baktericidna su i ne stvaraju rezistenciju.

Moderne obloge kao suvremeni dio lokalne terapije imaju i komponentu kontrole infekcije u kroničnom vrijedu dodavanjem dezinficijensa ili srebra, a osim toga imaju i mehanički način uklanjanja bakterija inkapsuliranjem u vlastitu strukturu vlakna. Dosadašnja terapija nije bila potpuno učinkovita kod onog kroničnog vrijeda koji je kontinuirano razvijao biofilm na svojoj površini. Stoga je bilo ključno klinički identificirati znakove biofilma u kroničnom vrijedu i na taj način razvijati moderniju i učinkovitiju oblogu za rane, te odrediti adekvatnu i ciljanu terapiju.

ANTIMIKROBNE OBLOGE ZA INFICIRANI VRIJED

Infekcija kroničnog vrijeda isključivo se liječi sistemskom primjenom antibiotika.

Lokalna primjena antibiotske terapije striktno je kontraindicirana i davno napuštena klinička praksa, jer

dokazano razvija rezistenciju bakterija. Kronična rana uvijek ima prisutne bakterije i nemoguće ih je u potpunosti odstraniti, ni mehanički, npr. debridmanom, ispiranjem dezinficijensom, antibiotskom terapijom. Ono na što se isključivo može djelovati je broj prisutnih bakterija, čime direktno kontroliramo i sprječavamo da se njihovim razmnožavanjem razvije infekcija rane (1).

Kako je kronični vrijed izrazito osjetljiv u aspektu fizioloških procesa cijeljenja, primjena antimikrobnih sredstava mora biti suportivna za djelovanje, npr. fibroblasti koji izlučuju kolagen, makrofage koji izlučuju faktore rasta itd. Ako su antimikrobna sredstva citotoksična za navedene stanice i procese, imat ćemo prolongirano i odgođeno cijeljenje vrijeda. Primjena srebra u modernim oblogama značajan je iskorak u kontroli infekcija kroničnih rana općenito (2). Primjena srebra kao topičnog antibakterijskog sredstva u oblozi za rane, te njegova učinkovitost određuje se prema nekoliko kriterija. Prvi je fizikalna karakteristika i sastav obloge u kojoj se srebro nalazi. Tako imamo veliki spektar obloga čija je struktura, npr. gaza, vazelin, poliuretan, hidrokolid, alginat ili hidrofiber vlakno u kojima se nalazi ionsko srebro. Sama struktura obloge je iznimno važna jer direktno utječe na učinkovitost srebra iz obloge. Jedno od istraživanja, koje je provedeno kao usporedba djelovanja npr. poliuretana sa srebrom na neravnine kontaminirane bakterijama, prikazalo je da postoje značajna razlike u efikasnosti antibakterijskog djelovanja upravo zbog nesposobnosti prijanjanja na neravnine dna rane čime se nije spriječilo razmnožavanje bakterija (3,4).

Temeljno pitanje učinkovitosti obloge sa srebrom je u mehanizmu otpuštanja ionskog srebra, antibakterijskom spektru djelovanja s jedne strane i testiranja na eventualnu citotoksičnost za fibroblaste, pojavu hiperpigmentacije i sigurnosti primjene na velikim tjelesnim površinama u smislu moguće sistemske apsorpcije s druge strane. Ako obloga ne ostavlja tzv. mrtve prostore u dnu rane (npr. hidrofiber vlakno), učinkovitost srebra će biti daleko veća. Osim toga u strukturi obloge moraju postojati dokazani elementi kvalitetne apsorpcije eksudata, zadržavanja eksudata, npr. kompresija sprječava lateralno curenje te maceraciju okolne kože. Nije nevažan element smanjenje bolnosti koju pacijent osjeća pri nošenju obloge, kao i pri izmjeni obloge. Druga važna karakteristika moderne obloge sa srebrom su njezini kinetički procesi i mehanizmi otpuštanja srebra, pri čemu najčešće govorimo o ionskom srebru (5).

Kinetika otpuštanja i baktericidnog djelovanja ionskog srebra u vezi je s njegovom koncentracijom u strukturi vlakna obloge i količini eksudata koji se pri tome otpušta iz rane. Obloga mora imati kontinuirano djelo-

vanje srebra i to minimalno do 7 dana, kao i dokazani antibakterijski spektar *in vitro* i *in vivo*, a pri tome ne smije prouzročiti diskoloraciju kože ili biti citotoksična za fibroblaste. Za svaku indikaciju u kojoj se smije koristiti obloge sa srebrom moraju postojati kliničke studije i reference o učinkovitosti i neškodljivosti (6).

Percival i sur. su dokazali da obloge sa srebrom cjelovito ubijaju bakterije u biofilmu tijekom djelovanja od 48 sati. To novije istraživanje ukazalo je na vrijednost obloge s ionskim srebrom u primjeni na kronične rane (7). Osim toga, dokazano je da ionsko srebro reducira rast biofilma *P. aeruginosa* i *S. aureus*, dva najznačajnija uzročnika bolničkih infekcija. Srebro u kombinaciji s aminoglikozidom iskazalo je jako dobro djelovanje na biofilmove, nasuprot pojedinačnoj primjeni bilo antiseptika, bilo antibiotika (8).

Iz navedenih karakteristika idealna obloga sa srebrom trebala bi imati učinkovito i kontinuirano otpuštanje ionskog srebra tijekom cijelog vremena aplikacije na rani. Otpušteno srebro trebalo bi biti u koncentracijama koje su potrebne za kontrolu infekcije, a ne smije se ni u kojem slučaju sistemski apsorbirati. Osim toga, idealna obloga sa srebrom mora imati idealan omjer mogućnosti kontrole eksudata iz rane u kombinaciji s antimikrobnim djelovanjem. Morala bi biti jednostavna i ugodna za pacijenta s mogućnošću atraumatskog prevoza i jednostavna za primjenu. Posljednja karakteristika je isplativost i dokazani povoljni omjer troška i koristi (*cost benefit*) (9-11).

Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma (8,9).

ŠTO JE BIOFILM?

Biofilm je kompleksna, heterogena i integrirana zajednica na internoj površini prihvaćenih mikroorganizama, koja se sastoji od jedne ili više vrsti mikroba obavijenih ekstracelularnim polimernim matriksom koji proizvode.

Razlog stvaranja biofilma u domaćina je obrana od djelovanja imunskog sustava, učinkovita kolonizacija i zauzimanje okoline bogate hranjivim produktima. Perzistiranje mikroba unutar biofilma podržava kroničnu infekciju. Uloga biofilma je i biodegradacija tkiva, te onemogućavanje djelovanja antibiotika – kao ciljanog liječenja infekcije (12).

KAKO NASTAJE BIOFILM?

Fenotipske i biokemijske osobitosti mikroba u biofilmu razlikuju se od mikroba izvan njega. Bakterije unutar biofilma su sesilne, a da bi se ostvario biofilm iz planktonskih slobodnih oblika oni moraju proći kompleksan proces pretvorbe. Planktonske bakterije prilijepe se uz površinu poput podloge rane i počnu se množiti i izlučivati hidratiziranu matricu polisaharidaze. Dok se množe, bakterije se prilagođavaju okolini kako bi si olakšale preživljavanje. Kako se biofilm razvija i sazrijeva, sve čvršće prijanja uz površinu i može otpuštati planktonske bakterije i fragmente biofilma kako bi se biofilm stvorio i na drugom mjestu. Imunostni sustav pokušava napasti biofilm, izlučivanjem visokih razina proteinaze, antimikrobnih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), koji ne moraju biti učinkoviti. Ovi faktori stimuliraju stvaranje viška eksudata, što može potaknuti rast biofilma i posljedično povećati opasnost od infekcije (9-12).

OTPORNOST BIOFILMA NA BAKTERIJE

Stanice u biofilmu su 10-100 puta otpornije na antibiotike od planktonskih. Razlozi otpornosti su višeznačajni, te razlikujemo nekoliko procesa:

- antibiotici ne mogu proći kroz ekstracelularni matriks, te se ne mogu vezati za ciljna mjesta djelovanja na bakterijskoj stanici
- inaktivacija antibiotika enzimima, koji se nalaze unutar matriksa biofilma, a koje produciraju zaštićene bakterije unutar te transformacije
- usporeni i reducirani rast, kao vrsta metaboličkog procesa bakterija uvjetuje slabiju osjetljivost na antibiotike
- anaerobni uvjeti reduciraju aktivnost antibiotika
- izmijenjeni geni mikroba koji stvaraju biofilm istodobno modificiraju genotipska i fenotipska obilježja mikroba, što dovodi do rezistencije na antibiotike. Na taj se način aerobi transformiraju u anaerobe (12).

METODE DOKAZIVANJA BIOFILMA

Prepoznavanje biofilma je veliki izazov. Unatoč uspješnoj primjeni antimikrobnih obloga sa srebrom u kroničnom vrijedu uz nove spoznaje o prisustvu biofilma neophodno je napraviti njegovu detaljnu kliničku identifikaciju (12-14).

U ovom trenutku samo specijalizirana mikroskopija može zasigurno otkriti biofilm. Samo specijalizirani

mikrobiološki laboratoriji mogu imati opremu i stručnost potrebnu za efikasno ispitivanje biofilma u uzorcima rana. Dok se standardno bojanje po Gramu može koristiti za vizualizaciju mikrobioloških zajednica u uzorcima rana, tu je tehniku potrebno kombinirati s jačim tehnikama poput epifluorescencije, konfokalne i elektronske mikroskopije. Zbog toga je potreban razvoj testa na mjestu pružanja zdravstvene zaštite (12).

LABORATORIJSKE POMOĆI KOD POTVRĐIVANJA BIOFILMA

Bojenje po Gramu s laganom mikroskopijom

- Rutinski se primjenjuje u svim mikrobiološkim laboratorijima
- Može se primjenjivati kako bi se vizualizirale mikrobne agregacije/zajednice u uzorcima rana
- Mora se koristiti u konjunktiji sa sofisticiranijim tehnikama mikroskopije.

Epifluorescentna mikroskopija s fluorescentnom peptid nukleinskom kiselinom *in situ* hibridizacijom (PNA FISH):

- Koristi fluorescentno bojanje kako bi specifično označila bakterijske nukleinske kiseline, biofilm polisaharide i nukleinske kiseline u uzorcima rana

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (CLSM):

- Sofisticirana tehnika mikroskopije koja omogućuje vizualizaciju „mokrih“ uzoraka (bolje za biofilm) za razliku od „fiksiranih“ uzoraka
- bez potrebe za sekcioniranjem

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM):

- Koristi lasersku zraku za pretraživanje površine fiksiranog uzorka
- Brzu pripremu uzorka (dehidracija)
- SEM ne može biti primijenjen kao jedina tehnika potvrđivanja (pozitivni test) biofilma te se mora kombinirati s jednom od ovdje opisanih tehnika

Pretražna elektronska mikroskopija u uvjetima okoliša (ESEM):

- Omogućuje slikanje površine hidriranih uzoraka bez potrebe za velikom pripremom uzorka i presvlačenjem uzorka (15).

KLINIČKE SPOZNAJE O BIOFILMU

Kliničke studije pokazuju da je možda moguće razlikovati biofilm od nekrotičnog tkiva po izgledu i ponašanju (tablica 1).

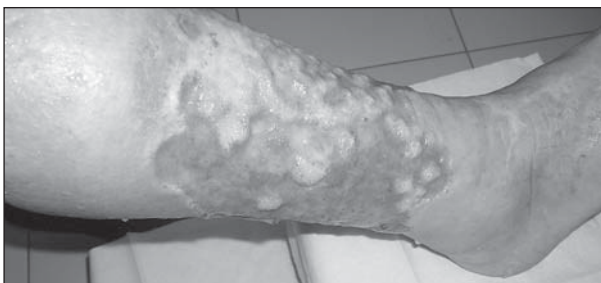
Tablica 1.
Kliničke pomoći kod potvrđivanja biofilma u venskom vriedu (14)

Pitanje	Prisutnost biofilma
Može li se površinski materijal lagano i bez traume odlijepiti od potkožne površine kože primjenom tehnika fizičkog odstranjivanja?	✓
Zadržava li se površinski materijal usprkos autolitičkom ili enzimatskom debridmanu?	✓
Reformira li se površinski materijal brzo (unutar dan, dva) bez čestih intervencija (primjerice čišćenje, debridman)?	✓
Reagira li vried slabio na topičke ili sistemske antibiotike?	✓
Reagira li vried slabio na obloge koje sadrže antiseptičke agense (primjerice srebro, jod, PHMB) uključujući i proizvode za koje je poznato iz studija da kontroliraju biofilm <i>in vitro</i> (primjerice <i>Hydrofiber</i> obloge koje sadrže srebro, kadeksomer jod ili nanokristalno srebro)	✓
Reagira li vried zadovoljavajuće na multi-modalne strategije kao što su debridman, čišćenje i antimikrobne obloge sa srebrom	✓

Nekrotično tkivo – sadržava mrtvo devitalizirano tkivo rane koje je spojeno s donjim živim tkivom (sl. 1).



Biofilm tvori sjajnu, prozirnu supstanciju sličnu gelu, ili sluzaste komadiće ili slojeve u podlozi rane, i često se stvara unutar nekoliko sati nakon odstranjivanja odumrlog tkiva (sl. 2).



Fizičkim uklanjanjem, tj. debridmanom nekrotičnog tkiva iz rane praćenim ogromnom populacijom mikroba, te stvorenim biofilmom omogućuje se revitalizacija tkiva uz mogućnost ciljanog antimikrobnog liječenja. Uklanjanje devitaliziranog tkiva koje je ujedno i strano tijelo u vriedu dovodi do redukcije ukupnog broja bakterija, smanjuje ukupnu koncentraciju egzogenih i endotoksina bakterije, te proteaza i neutrofila kao posljedica intenzivne obrane domaćina. Odstranjivanjem odumrlog tkiva se ne uklanja biofilm, ali se stimulira metabolička aktivnost biofilma, smanjuje tolerancija preostalog biofilma i povećava podložnost antimikrobnim oblogama i reakcija imunološkog sustava (12-15).

Otkriće da najmanje 60 % kroničnih rana sadrži biofilm ukazuje da je veliki indeks sumnje na biofilm opravdan u ranama koje nisu pravodobno liječene.

Iz kliničkih promatranja biofilm rane povezan je s temeljnim patofiziološkim faktorima poput bolesti perifernih arterija, infekcija rana, osteomijelitisa i neravnoteže vlažnosti zbog čega je izrazito važno da liječnici prate, ocjenjuju i pristupaju svim faktorima koji doprinose venskom vriedu (14-16) (tablica 2).

Tablica 2.

Protokol vrieda koji je u opasnosti od infekcije (13)

1. Procjena i status rane

- Vrsta rane
- Vrsta tkiva (nekroza, fibrinske naslage, granulacija)
- Veličina rane (dužina, širina, dubina)
- Eksudat (boja, konzistentnost, razina)
- Okolna koža (eritem, oticanje, diskoloracija, maceracija)
- Znakovi i simptomi infekcije (bol, miris, vrućica, oticanje)

2. Odstranjivanje odumrlog tkiva

3. Tretman rane

- Primjena antimikrobnih obloga

4. Procjena i dokumentacija vrieda

- Potencijalni klinički indikatori za suspektan biofilm (znakovi lokalne ili sistemske infekcije odmah nakon prekida antibiotske terapije iako je bila ciljana terapija, vlažnost, površina vrieda - viskozna, mliječna)

ZAKLJUČAK

Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili antimikrobne obloge - Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma. Liječenje inficiranog vrieda mora sadržavati procjenu inficiranog vrieda, upravljanje aktivnom infekcijom i sprječavanje ponovnog nastanka infekcije. Debridman vrieda

treba primijeniti kako bi se spriječio nastanak otpornog biofilma te uklonilo mrtvo tkivo. Nakon uklanjanja biofilma treba primjenjivati antimikrobne obloge sa srebrom kao dio sustavnog pristupa liječenja kroničnog vrieda radi sprječavanja ponovnog nastanka biofilma i suzbijanja bakterija koje uzrokuju infekciju.

LITERATURA

1. Kirketerp-Møller K, Jenson PO, Fazli M i sur. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2717-22.
2. Mooney EK, Lippitt C, Friedman J. Safety and efficacy report – silver dressings. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 666-9.
3. Cutting KF, White RJ, Hoekstra H. Topical silver-impregnated dressings and the importance of the dressing technology. *International Wound J* 2009; 6: 396-402.
4. White RJ. An historical overview of the use of silver in wound management. Chapter 7. pp 59-68 In: *The Silver Book* Dinton Wiltshire, UK: 2003. Quay Books.
5. Newman GR, Walker M, Hobot J, Bowler P. Visualisation of bacterial sequestration and bactericidal activity within hydrating hydrofibre dressings. *Biomaterials* 2005; 27: 1129-39.
6. Walker M, Parsons D. Hydrofiber technology: its role in exudate management. *Wounds-UK* 2010; 6: 31-8.
7. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilm. *Wound Repair* 2008; 16: 52-7.
8. Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agent Chemother* 2008; 52: 1446-5.
9. Bowler PG, Jones SA, Walker M, Parsons D. Microbicidal properties of a silver-containing hydrofiber dressing. *J Burn Care Rehabil* 2004; 25: 192-96.
10. Walker M, Cochrane CA, Bowler PG, Parsons D, Bradshaw P. Silver deposition and tissue staining associated with wound dressings containing silver. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52: 42-50.
11. Waring MJ, Parsons D. Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres. *Biomaterials* 2001; 22: 903-12.
12. Kučičec Tepeš N. Značenje infekcije kronične rane. *Acta Med Croatica*, 2011; 65 (Supl.2): 87-94.
13. Parson D, Metcalf D. Understanding local barriers to wound healing. *Wound International* 2014; (Suppl): 1-5.
14. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A i sur. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 2008; 182: 6482-9.
15. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME i sur. Chronic wounds and the biofil paradigm, *J Wound Care* 2010; 19: 45-53.
16. Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential in wound healing. *Wounds* 2004; 16: 234-40.

SUMMARY

ANTIMICROBIAL DRESSINGS FOR INFECTED ULCER AND CLINICAL COMPREHENSION OF BIOFILM

S. MARINOVIĆ KULIŠIĆ, J. LIPOZENČIĆ¹ AND S. TUNUKOVIĆ²

*Zagreb University Hospital Center, Clinical Department of Dermatovenereology,
¹Croatian Academy of Medical Sciences and ²Stoma Medical, Zagreb, Croatia*

Current knowledge and proofs of biofilm, interactions between various bacterial species and overall virulence of microbes play a role in delayed healing of wound and development of infection. High quality description of clinical symptoms and current knowledge of microbes provide an excellent guideline for creating the strategy of wound treatment. Owing to better understanding of the role of biofilm in prolongation of healing time and facts about biofilm system and structure, scientists have developed the Ag+ technology. This technology has strong synergistic effects of the general and antimicrobial activity of ionic silver and specific compounds, which have proved efficient in biofilm obstruction and removal.

Key words: antimicrobial dressings, silver, infection, biofilm, chronic ulcers