



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LARVA DEBRİDMAN TEDAVİSİ UYGULANAN HASTALARDAN ALINAN
BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN
RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ**

EMRAH GÜREL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal POLAT**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Program Adı
Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

Kasım, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

.....

Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Emrah GÜREL

(İmza)



Eşim Zeyneb GÜREL ve Oğlum Onat GÜREL'e ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

LARVA DEBRİDMAN TEDAVİSİ UYGULANAN HASTALARDAN ALINAN BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışma için destek talep edilmemiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Sayın Prof. Dr.Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimime başladığım günden itibaren bilgisi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren, ilerlememde büyük emeği olan ve her zaman beni destekleyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Erdal POLAT'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen, eğitimim süresince teşvik edici tutumuyla beni yüreklendiren Sayın Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan hocalarım, Sayın Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, rahmetli hocam Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Fatma Köksal ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr.Suat SARIBAŞ'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, sevgi ve saygıyla beni destekleyen çok sevgili eşim Zeyneb GÜREL'e ve biricik oğlum Onat GÜREL'e, sevgili anne ve babama çok teşekkür ederim.

Kasım 2023

Emrah GÜREL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	2
2.1. TARİHÇE	2
2.2. LARVA DEBRIDMAN TEDAVİSİ UYGULANABİLEN HASTALIKLAR.....	5
2.3. LARVA DEBRIDMAN TEDAVİSİNİN YARA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	6
2.3.1. Yara Debridmanı Veya Nekrotik Dokunun Ortadan Kaldırılması.....	6
2.3.2. Yara Dezenfeksiyonu	7
2.3.3. Yara İyileşmesinin Uyarılması.....	8
2.4. STERİL LARVALARIN ÜRETİMİ	9
2.5. LDT’NİN UYGULANMASI	9
2.6. YARA SINIFLAMASI.....	11
2.6.1. Oluş Zamanına Göre Yaralar	11
2.6.2. Deri Bütünlüğünün Durumuna Göre Yaralar:.....	12
2.6.3. Etkenin Deride Yarattığı Değişikliğe Göre Yaralar:	13
2.6.4. Bulaş Durumuna Göre Yaralar:.....	13
2.7. YARA ENFEKSİYONU	13
2.8. YARANIN İYİLEŞMESİ.....	15
2.8.1. İnflamatuvar Faz (Eksudasyon Fazı, Hazırlık Fazı).....	15
2.8.2 Proliferasyon Fazı (Kollajen Yapım Fazı)	16
2.8.3. Matürasyon Fazı (Olgunlaşma fazı).....	16
2.9. KRONİK YARALARDA ENFEKSİYON ETKENİ OLABİLEN BAKTERİLER	16

2.10.BAKTERİ TANIMLAMASI.....	18
2.10.1. Konvansiyonel Yöntemlerle Tanı	19
2.10.2. Yarı -Otomatize Sistemlerle Tanı	20
2.10.3.Otomatize Sistemlerle Tanı	20
2.10.4 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF MS) ile Tanı.....	20
2.11. BAKTERİ MİKTARININ BELİRLENMESİ	21
3. YÖNTEM	22
3.1. GEREÇLER.....	22
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Besiyerleri	22
3.1.2. Bakteri Tanımlamasında Kullanılan Ayıraçlar ve Kitler	27
3.1.3. Bakteri Tanımlamasında Kullanılan Diskler	28
3.1.4 Bakteri Tanımlamasında MALDI-TOF	28
3.2.YÖNTEM	28
3.2.1. Hastalara Ait Bilgilerin Toplanması	28
3.2.2.Biyopsilerin Alınması.	28
3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Yapılması.....	28
3.2.4. Üretilen Bakterilerin Konvansiyonel Yöntemle Tanımlanması.....	29
3.2.4.1. <i>Gram Negatif Çomakların Tanımlanması:</i>	30
3.2.4.2. <i>Gram Pozitif Diplokokların Tanımlanması:</i>	32
3.2.4.3. <i>Gram Negatif Diplokokların Tanımlanması:</i>	33
3.2.4.4. <i>Gram Pozitif Çomakların Tanımlanması</i>	33
3.2.5. Üretilen Bakterilerin MALDI-TOF MS ile Tanımlanması	33
3.2.6. Yarı - Kantitatif Sayım Ile Koloni Sayımı	34
3.2.7.İstatiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR.....	61
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ETİK KURUL İZİN YAZISI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KURUM İZNİ YAZILARI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: Ülserli yara örneklerinin alındığı hasta dokulara ait bazı görüntüler.....	29
Şekil 4.1: Ülserli yara örneklerinin dağılımı.....	35
Şekil 4.2: LDT öncesi diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	41
Şekil 4.3: 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	41
Şekil 4.4: LDT öncesi diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar.....	43
Şekil 4.5: 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar.....	43
Şekil 4.6: LDT öncei bası ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	46
Şekil 4.7: 3.LDT sonrası bası ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	46
Şekil 4.8: LDT öncesi bası ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar.....	48
Şekil 4.9: LDT sonrası bası ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar.....	48
Şekil 4.10: LDT öncei venöz ülserlerde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	51
Şekil 4.11: 3.LDT sonrası venöz ülserlerde üreyen Gram pozitif bakteriler.....	51
Şekil 4.12: LDT öncesi venöz ülserlerde üreyen Gram negatif bakteriler.....	52
Şekil 4.13: 3.LDT sonrası venöz ülserlerde üreyen Gram negatif çomaklar.....	52

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Besiyerinde üreyen bakteri yoğunluğunun yarı – kantitatif yöntemle derecelendirmesinde kullanılan skorlar	34
Tablo 4.1: Biyopsilerin alındığı hastalara ait bazı demografik ve klinik özellikler.....	36
Tablo 4.2: Biyopsilerde LDT öncesi ve 3.LDT sonrası semi-kantitatif yöntemle saptanan bakteri yoğunlukları.....	38
Tablo 4.3 : LDT öncesi ve 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde Gram pozitif bakterilerin dağılımı.....	40
Tablo 4.4: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde Gram negatif çomakların dağılımı.....	42
Tablo 4.5: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası bası ülserlerinde Gram pozitif bakterilerin dağılımı.....	45
Tablo 4.6: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası bası ülserlerinde Gram negatif çomakların dağılımı.....	47
Tablo 4.7: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası venöz ülserlerde Gram pozitif bakterilerin dağılımı.....	50
Tablo 4.8: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası Venöz ülserlerde Gram negatif çomakların dağılımı.....	50
Tablo 4.9 LDT öncesi ve 3.LDT sonrası örneklerde Gram pozitif bakterilerin dağılımı.....	53
Tablo 4.10: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası örneklerde Gram negatif çomakların dağılımı.....	54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
°C	: Santigrat Derece
g	: gram
pH	: Hidrojen Potansiyeli
mL	: Mililitre
cm ²	: Santimetrekare
Kisaltmalar	Açıklama
API	: Analitik Profil Index
BD	: Becton, Dickinson
CFU	: Koloni oluşturan birim (Colony forming unit)
CTF	: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
EGF	: Epidermal büyüme (Growth) faktörü
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
LDT	: Larva Debridman Tedavisi
LDTÖ	: Larva Debridman Tedavisi öncesi
LDTS	: Larva Debridman Tedavisi sonrası
MALDI-TOF MS	: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MDT	: Magot Debridman Tedavisi
MHA	: Mueller Hinton agar
MIO	: Hareket İndol Ornitin (Motility İndol Ornitin) besiyeri
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PYR	: Pyrolidonyl-beta naphilamide
TSI	: Üç Şekerli Demirli Agar (Triple Sugar Iron)

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[LARVA DEBRİDMAN TEDAVİSİ UYGULANAN HASTALARDAN ALINAN BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ]

[Emrah GÜREL]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

[Danışman: Prof. Dr. Erdal POLAT]

Larva debridman tedavisi (LDT) *Lucilia sericata* I. ve II. dönem larvaları tarafından üretilen enzimlerin, nekrotik dokuları debride etmeleri amacıyla uygulanan bir tedavidir. Larvaların kronik yaralardaki nekrozlu dokuları eriterek ve sindirerek ortadan kaldırabildikleri, mikroorganizmaları öldürerek yarayı dezenfekte ettikleri ve dokuyu granülasyon oluşumu yönünde uyardıkları gösterilmiştir. Bu çalışmada, LDT ile izlenen hastaların nekrozlu ülser veya pürülan yaralarına ait biyopsilerde üretilen bakterilerin retrospektif olarak değerlendirilerek LDT süresince en sık mücadele edilen etkenlerin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmamız, LDT isteği ile TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'na gönderilen hastaların kronik yarasından alınan ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na bakteriyolojik inceleme için gönderilen 100 hastaya ait biyopsi örneği ile gerçekleştirilmiştir. Bu hastaların ilk 1. LDT uygulamasından önce alınmış olan ve 3. LDT uygulamasından 72 saat sonra aynı bölgeden alınmış olan yara biyopsilerine ait bakteriyolojik kültürler yapılmış ve üreyen bakteriler konvansiyonel yöntemler yanı sıra tür düzeyinde Matriks-Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI TOF-MS) ile tanımlanmıştır. Biyopsi örneklerinde üreyen bakterilerin yoğunluğu yarı-kantitatif sayım ile 1+, 2+, 3+ ve 4+ şeklinde skorlanarak saptanmıştır. Sonuçlar istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yara biyopsileri incelendiğinde 51'inin diyabetik ayak ülseri, 38'inin bası (dekübitüs) ülseri 11'inin venöz ülser olduğu görülmüştür. 3. LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde 4+ üreme görülen, bası ülserlerinde 3+ üreme görülen biyopsi sayısının anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), 1+ üreme görülen biyopsi sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$) saptanmıştır. Venöz ülserlerde 3. LDT sonrası 1+, 2+, 3+ ve 4+ üreme gösteren biyopsi sayısında, anlamlı

bir farklılık saptanmamıştır. ($p>0.05$). 3. LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *E.cloacae* ve *M.morgani* oranları, bası ülserlerinde *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *C.striatum*, *P.vulgaris* ve *M. morgani* oranları LDT öncesi oranlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Venöz ülserlerde ise anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır.

LDT ile ülserlerde üreyen mikroorganizmaların bir bölümü ortadan kaybolmakta veya azalmaktadır ancak sürekli varlığını koruyan bakterilerle yara iyileşmesini sağlamak uzun süreli tedavilerin gereğine işaret etmektedir.

Kasım 2023 , 86 | sayfa.

Anahtar kelimeler: Larva debridman tedavisi, bakteriler, diyabetik yara, bası ülseri, venöz ülser, |

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

**RETROSPECTIVE EVALUATION OF BACTERIA ISOLATED FROM BIOPSY
SPECIMENS COLLECTED FROM PATIENTS UNDERGOING LARVAL
DEBRIDEMENT THERAPY**

Emrah GÜREL

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Microbiology

Microbiology

Medical Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Erdal POLAT

Larva debridement therapy (LDT) debride the necrotic tissues by the enzymes of *Lucilia sericata* I. and II. larvae. Larva can dissolve necrotic tissues in chronic wounds by dissolving and digesting them, disinfect the wound, and stimulate the tissue to form granulation. In this study, the aim was to evaluate retrospectively the bacteria existing in biopsies of necrotic ulcerated or purulent wounds of patients undergoing LDT and to determine the most common bacteria to be combated during LDT.

Chronic wound biopsies of 100 patients who were sent to TÜBİTAK Biotherapy Research and Development Laboratory with the request of LDT, were analysed bacteriologically in the Medical Microbiology Laboratory of Cerrahpasa Medical Faculty Hospital. Biopsies cultures collected from the same area before the first LDT and after the 3rd LDT were made, bacteria were identified using conventional methods and MALDI TOF- MS. The density of bacteria grown in culture media was determined by semi-quantitative counting and scoring as 1+, 2+, 3+ and 4+. The results were evaluated statistically.

From wound biopsies, 51 were diabetic foot ulcers, 38 were pressure ulcers, and 11 were venous ulcers. After 3rd LDT, the number of biopsies with 4+ growths in diabetic foot ulcers and 3+ growths in pressure ulcers were significantly decreased ($p < 0.05$), the number of biopsies with 1+ growth was significantly increased ($p < 0.05$). After the 3rd LDT a statistically significant decrease was found in the rates of *S.pyogenes*, *S.galactiae*, *E. cloacae* and *M.morgani* in diabetic foot ulcers, and in the rates of *S.pyogenes*, *S.galactiae*, *C.striatum*, *P.vulgaris* and *M. morgani* in pressure ulcers compared with their rates obtained before LDT ($p < 0.05$). A significant difference was not found in venous ulcers.

With LDT, some of the microorganisms that reproduce in the ulcers disappear or decrease, but ensuring wound healing with bacteria that persist indicates the need for long-term treatments. |

November 2023, 86 pages.

Keywords: | Larval debridement therapy, bacteria, diabetic wound, pressure ulcer, venous ulcer. |



1. GİRİŞ

Larva debridman tedavisi (LDT) ya da Maggot Debridman Tedavisi (MDT), sinek larvalarının, nekrotik dokuları debride etmeleri amacıyla uygulanan bir tedavidir (1-3). Tedavide özellikle Diptera'da bir *Calliphoridae* türü olan *Lucilia sericata* larvaları kullanılmaktadır (1-45).

Yara, canlı dokunun sürekliliğinin bozulması, olarak tanımlanır. Açık bir yarada mikroorganizma bulunmaması mümkün olamayacağından subakut, akut veya kronik bir enfeksiyonun bulunma olasılığı çok yüksektir (1). Kronikleşen yaralar, iyileşmeyen veya normal fizyolojik iyileşme sürecini göstermeyen yaralardır. Bu yaralarda eksilen dokuların geç onarımı nedeniyle oluşan su kaybı sonucu canlı kalan dokular kurur. Kuruluk canlı dokuda nekrozların oluşmasına neden olur ve oluşan nekroz bakteriler için bir üreme ortamı oluşturur. Nekrozlu dokuda kan akışının sınırlı olmasına bağlı olarak antibiyotiklerin bölgeye yeterince ulaşması mümkün olmaz. Nekroz enfeksiyonu arttıran enfeksiyon da yeni nekrozlara yol açan bir döngü içinde devam eder (1,2).

Yarada enfeksiyonun başlamasıyla birlikte bakteri toksinlerinin dokudaki fibrin ve büyüme faktörünü parçalarına ayırdığı, kollajen yapımını engellediği bilinmektedir (1). Yara enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etkenler *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* türleri, *Escherichia coli* ve *Proteus* türleridir. Bunları başta enterokoklar ve beta hemolitik streptokoklar olmak üzere diğer Gram pozitif bakteriler izler (1-3).

Larva debridman tedavisi (LDT) sürecinde, *Lucilia sericata* 'nın I. ve II. dönem larvaları tarafından üretilen enzimlerin kronik yaralardaki nekrozlu dokuları eriterek ve sindirerek ortadan kaldırabildikleri, mikroorganizmaları öldürerek yarayı dezenfekte ettikleri ve dokuyu granülasyon oluşumu yönünde uyardıkları bir çok araştırma ile gösterilmiştir (1-45).

Bu çalışmada, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF), Tübitak Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'na müracaat eden ve LDT ile izlenen hastaların nekrozlu ülsere veya pürülan yaralarından alınmış biyopsi örneklerinde üretilen bakterilerin retrospektif olarak değerlendirilmesi sonucunda, LDT süresince en sık mücadele edilen etkenlerin saptanması amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. TARİHÇE

Larva debridman tedavisi (LDT) ya da Maggot Debridman Tedavisi (MDT), yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla, nekrotik dokuları debride eden *Lucilia sericata* larvalarının yaralı dokuya uygulanmasıdır (1-3).

Yaraların larvalarla tedavisi konusunda yapılan uygulamaların tarihsel gelişimi her zaman merak konusu olmuştur. Avustralya'daki yerli kabile üyelerinin uzun yıllardan beri larvaları tedavi amacıyla kullandıklarını belirten kaynaklara ulaşılmıştır. Yine kadim dönemlerden beri büyük bir medeniyet olarak bilinen Mayaların sığır kanı ile ıslattıkları bez parçalarını belirli bir süre açık havada bırakarak larvaların çoğalmasını sağladıkları sonra da bu bezleri yaralara tedavi amaçlı tatbik ettikleri belirtilmektedir (4-7).

Larvaların yaralardaki olumlu etkilerini gözlemleyen ilk hekimin, 1557 yılında, St.Quentin Savaşı'nda bulunan Fransız bilim insanı cerrah Ambroise Pare olduğu belirtilmiştir (5-6). Pare, başlangıçta larvaların olumsuz etkilerini farketmiş, bu yüzden hastalarının enfekte olmasını engellemeye çalışmıştır. Çalışmasının ilerleyen aşamalarında hastalarından birinin kafatasındaki doku kaybının bir avuç büyüklüğünde olmasına rağmen hala yaşadığını ve bu derin yaradan larvaların çıktığını gözlemlemiştir (4-7).

Hieronymus Fabricius D'nin 1634 yılında, larvaların yaralardaki etkilerini fark ettiği, 1704 yılında Zachmann'ın yaralarda oluşan larval kökenlerini tanımlamaya çalıştığı anlatılmıştır (5-6). Yapılan araştırmalarda, Napolyon kuvvetlerinin Mısır seferi sırasında Fransız askeri cerrah, Baron Dominique Jean Larrey'e ait (1766-1842) birtakım larvaların yaralarda enfeksiyon oluşumuna engel teşkil ettiği, sadece ölü dokuyu debride ettikleri, sağlam doku üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı; aksine olumlu etkilerinin bulunduğunu belirten notlara ulaşılmıştır (4-6).

Robert Koch ile Louis Pasteur'ün, 19. Yüzyılın son çeyreğinde ortaya attıkları germ teorisi, hekimlerin açık yaralara enfekte olan materyalleri koymaktan çekinmesine neden olmuştur. Bundan dolayı 19. Yüzyılın sonunda sterilize edilmeyen larvaları kullanan çok az sayıda bilim insanı kalmıştır (6). Johns Hopkins Üniversitesi'nde ortopedik cerrahi profesörü olan William Stevenson Baer 1929 yılında yer aldığı muharebe alanlarındaki tecrübelerini aktarırken, muharebe sahasında edindiği tecrübelerden yararlanma zamanının artık geldiğini düşünerek, ilk olarak larvaları nereden temin edebileceğini araştırdığını, sonra bunları

çevresindeki sineklerden [Baltimor'da] temin edebileceğine kanaat getirdiğini, topladıkları larvaları ve sinekleri kontamine halde yaraların derin oyuklarına doldurduklarını ve sonuçları gözlemlemeye başladıklarını, ortalama altı hafta kadar geçtikten sonra yaraların tamamının iyileşmiş olduğunu belirtmektedir. Osteomyelit teşhisi konan ve tedavisi olumsuz sonuç veren 21 hastaya bu larvaları uygulamış ve yaklaşık iki ay kadar sonra hastaların hepsinin iyileştiğini raporlamıştır. Ortalama 89 hastalık dizisinin de neredeyse tamamında başarılı sonuçlar almıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda, Baer modern larva tedavisinin kurucusu olmuştur (4-8). Bunun yanı sıra Baer'in aktarımlarından ilk larva tedavi denemesinin Amerikan İç Savaşı (1861-1865) zamanında Marylandli bir hekim olan John Forney Zacharias (1837-1901) tarafından yapıldığı anlaşılmaktadır. Zacharias'ın, ilk defa gangrendeki çürümüş dokuyu temizlemek için larvaları Danville'deki Virjinya hastanesindeki görevi sırasında denediği ve çok güzel netice aldığı belirtilmektedir (5-8). Bu larvaların bir gün gibi kısa bir sürede ellerindeki bütün ajanlardan çok daha iyi yarayı temizleyebildikleri, sonraki süre içerisinde bu larvaları çeşitli yerlerde yine yaralara tatbik ettiklerini, çabuk adaptasyon özellikleri sayesinde ve septisemiye engelleyerek pek çok hayatı kurtardıklarını ve hızlı bir iyileşme sağlandığını, larvaların yara debridmanındaki ciddi katkısı üzerinde durduklarını not etmişlerdir (8).

Eli Chernin, 1986 yılında savaş alanındaki yaralılarda larvaların yara üzerindeki olumlu etkilerini gözlemlediğini, yoğun olarak bakımsız, larvalarla dolu yaraları izlerken edindiği deneyimlere göre bu kurtların sadece cansız dokuyu yıkıma uğrattığı ve spesifik olarak sağlam dokudan oluşan bölümlere yıkıcı etki göstermediğini belirtmiştir (7).

Kronik osteomyelitin tedavisinde larval tedavi çabuk ve başarılı bir yöntem olmuştur. Çalışanların ve hastanın rahatsızlıklarını minimize etmek maksadıyla larvaları örten ağ kafesler tasarlanmıştır. Sağlam deri tabakasındaki kaşıntıyı yok etmek maksadıyla Baer yara kenarlarını özel bir bandajla kaplamıştır (7-8). Baer'in bu çalışmaları sırasında hastalarda bazı beklenmeyen semptomlar ortaya çıkmıştır. Bir takım yaraların *Clostridium perfringens* ve *Clostridium tetani* ile kontaminasyonları sonucu 8 hastasına tetanoz tanısı konulmuş ve tanı konulan bir hasta ise bu sebeple yaşamını kaybetmiştir. Bu durum ne olursa olsun steril larvaların uygulanması şartını ortaya çıkarmıştır (7-8). Baer, *Calliphoridae* ailesinden olan üç türü (*Lucilia caesar*, *Phormia regina* ve *Lucilia sericata*) belirleyerek koloniler oluşturmuş, spesifik sinekleri tedavide kullanma konusunda çalışmalar yapmıştır. Larvaları sterilize etmek için civa klorür, alkol, formaldehit ve farklı dezenfektanları kullanmış ve çeşitli değişik yöntemler geliştirmiştir (7-8). Baer, larvalar için "canlı antiseptikler" tanımını kullanmış ve

iyileşmenin larvaların ölü dokuyu temizlemeleri ile ilgili olmadığına, ilave olarak da “biyolojik reaksiyon” ismini verdiği durumun da etkisi olduğuna kanaat getirmiştir (8).

Baer'in öğrencisi olan Stanton Knowlton Livingston, Baer öldükten sonra bu işin en önemli destekçisi durumuna gelmiş ve LDT üzerinde otorite sağlamıştır. Hastası üzerinde aşı olarak kullandığı sıvının hastada sistemik bir reaksiyonu tetiklediğini notlarında belirtmiştir. Larvalardan elde edilen ve Livingston tarafından "Larva Aktif Özütü" olarak adlandırılan bu sıvının ilk aşamada yara debridmanı ve dezenfeksiyon amacıyla kullanılması önerilmiştir (9-12).

20. Yüzyılın ikinci çeyreğinde LDT gündemde oldukça yer almış ve Amerika sınırları içerisinde üç yüzden fazla hastanede yara tedavisi programına dahil edilmiştir. Bu konuyla ilgili o dönemde yüz ile iki yüz arası yayın yapılmıştır (6). Her ne kadar başarılı sonuçlar elde edilse de, yüksek maliyeti sebebiyle çoğu hastanede steril larva yetiştirmek için laboratuvar imkânı tesis edilememiştir. Piyasadaki bu açığı değerlendirmek ve bu hizmeti sunmak amacıyla bir yatırımcı tarafından Lederle Şirketi kurulmuştur. ABD'de "Surgical Maggots-Lederle" markasıyla steril olan larvalar piyasaya sürülmüştür (5-7).

Hayati tehlike durumlarında larva tedavisinin faydalı bir seçenek olduğu ve bu tedavi imkanının bazı yaralarda son çare tedavi yolu olarak uygulanabileceği Craig Amerikan Ordusu Özel Kuvvetler Tıbbi Kitapçığı'nda vurgulandıktan sonra, larva tedavisinin klinik tarafından uygulanması artarak devam etmiştir. Amerika içerisinde Ronald Sherman ve Edward Pechter bu yöntemin o dönemdeki en önemli destekçileri konumundadırlar (4-5). 20. Yüzyılın sonlarına doğru Sherman oluşturduğu küçük sinek kolonisiyle steril bir şekilde larva üretimini amaçlamış, bası ülserlerinin klasik tedavi yöntemleri ile larva yöntemini karşılaştırmış ve larva ile yaraya müdahalenin diğer tedavi çeşitlerine göre daha çabuk etki ettiğini ve kısa sürede yaraların tedavi edilmesine sebep olduğunu gözlemlemiş ve bildirmiştir (13). Sonraki süreçte çeşitli sargı yöntemleri uygulayarak klinik gözetimi altında tedavide olumlu geri dönüşler ile karşılaşmıştır (14).

20. Yüzyılın ikinci çeyreğinin sonlarına doğru sulfonamidlerin yaygınlaşması ve 1944'te penisilinin bulunması ve diğer antiseptik ilaçların geliştirilmesi LDT'nin önemini kaybetmesine neden olmuştur (6). MDT, 20. Yüzyıl ikinci yarısında, 1980 yılına kadar modern tedavi yöntemlerine yanıt vermeyen deri ve yumuşak doku yaralarının iyileştirilmesinin son safhalarında tercih edilmiştir (13).

20. Yüzyılın sonlarında ilk olarak İsrail ve sonraki yıllarda İsveç, Almanya, İsviçre, Avusturya, Ukrayna, Tayland ve Kanada bu tedavi yöntemini kullanan ülkeler arasına

girmişlerdir (13). 1998 yılından sonra Almanya ve Belçika'da ticari amaç doğrultusunda kurulan şirketler Avrupa'ya larva satmaya başlamıştır (6). 1991 yılından 2001 yılına kadar geçen on yıllık zamanda dünya genelinde on bin hasta bu şekilde sağlığına kavuşturulmuştur (12). Uluslararası Biyoterapi Topluluğu ilk olarak 1996 yılında Uluslararası Biyoterapi Konferansı'nı düzenlemiştir. Faydası tüm dünyaca bilinen ve uygulanan bu yöntem 2004 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve kabul görmüştür (6).

İngiltere'de larva tedavisinin tekrardan önem kazanmasında, emekli bir doktor olan John Church'un Stephan Thomas ile Biyocerrahi Araştırma Ünitesi'ni kurması etkili olmuştur. Biyocerrahi Araştırma Ünitesi 1995'ten günümüze kadar ticari amaç doğrultusunda steril larva satışını sürdürmektedir (2). Bu ünite faaliyete girdikten sonra İngiltere'de altı yüz ellinin üzerindeki merkezde yaklaşık 5 yıl boyunca on beş bini aşan LDT uygulanmıştır.

Türkiye'de LDT'yi uygulayan ilk kişi, 2002 yılında GATA Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı başkanı Prof.Dr. Mehmet TANYÜREK olmuştur. TANYÜREK ve arkadaşları; diyabetik ayak, ateşli silah yaralanması, kronik osteomyelit, venöz staz ülseri, Buerger hastalığı olan ve yaralarında *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* üremiş olan 11 hastaya yaptıkları LDT sonucunda 10 hastada tam debridman, 1 hastada ise kısmi debridman sağlandığını bildirmişlerdir (14). Sonraki dönemde Prof.Dr. Erdal POLAT ve ekibi LDT'yi uygulamaya başlamıştır.

2.2. LARVA DEBRIDMAN TEDAVISI UYGULANABİLEN HASTALIKLAR

Kronik yaralar ve çeşitli tedavi yöntemlerinin olumlu sonuç vermemesi üzerine, ameliyat fikrinin bir risk olarak görüldüğü akut olmayan yaralar için, *Lucilia sericata* larvalarının yaralı dokuya uygulanması ile yara iyileşmesinin hızlandırılması iyi bir seçenek olarak kabul edilmektedir (2). Hayati tehlike arzeden ve risk oluşturan nekrozitan fasiitte cerrahi operasyonlarda asistan görevi gören LDT başarılı bir biçimde uygulanmış olsa da hastaların hayatını tehdit eden enfeksiyonlarda cerrahi debridmanın, LDTden daha fazla önem arzettiği bilinmektedir (15). LDT için antibiyotik kullanımı, yaş, gebelik, immobilité ve değişik zihni durumlar engel teşkil etmemektedir (5).

Nekrotik deri tümörlerinin larvalarla rastlantı sonucu infestasyonlarında kokunun daha az olduğu ve malign dokunun bir bölümünün daha temiz olduğu gözlemlenip raporlanmıştır.

Ancak LDT tümöre dayalı belirli sorunların tedavisinde bir yol olarak görülmesine rağmen kanser hastalarının tedavisinde uygulanamamaktadır (5).

Günümüzde, LDT apse, selülit, kangren ve çeşitli ülserler (bası, venoz staz, arteriyel hastalık, lenfostaz, diyabetik ayak, travmatik ve postoperatif yaralar), Buerger hastalığı, osteomyelit, mastoidit ve yanıklar gibi deri ve yumuşak doku yaralarının tedavilerinde kullanılmaktadır (5-12). Diyabetik ayak ve bası ülserleri olan hastalara, ayakta tedavi uygulanan ya da yatan hastalara bu tedavi yöntemi uygulanabilmektedir (12).

2.3. LARVA DEBRIDMAN TEDAVİSİNİN YARA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Sinek larvalarının yara tedavisi için üç faydalı etkisinin olduğu açıklanmaktadır (5, 9, 10, 16-37). Bunlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Yara debridmanı veya nekrotik dokunun ortadan kaldırılması,
2. Yaranın dezenfeksiyonu,
3. Yara iyileşmesinin uyarılmasıdır.

2.3.1. Yara Debridmanı Veya Nekrotik Dokunun Ortadan Kaldırılması

Bakterilerin, ölü dokunun ve yabancı cisimlerin yaradan ayrıştırılmasına yaranın debridmanı denir. Bu üç etken vücuttaki açık dokunun kapanmasına faydalı olan metallaproteazların üretilmesini engeller. Bakteriler yara üzerinde inhibe edici maddeler salgıladıkları gibi yara çevresindeki oksijen ve besini de tüketirler. Üreyebilmek ve kendilerini zararlı etkilere uzak tutmak için biyofilm oluştururlar (16). Yara enfeksiyonları sırasında, makrofajların, granülasyon dokusu oluşumu ve tekrardan damarlanma evresini kapsayan onarım yoluna katılmaları gecikir. Bu durum, dokunun kapanmasına ve inflamatuvar fazın ertelenmesine neden olur (16).

Kronik yara genellikle inflamatuvar evrede sabit olarak kalan ve iyileşmeyen yara iken; akut yara, taze olup iyileşme sürecini hızla kateden yaradır. Bütün skar doku tedavilerinin amacı skar dokuda normal ve belirli bir aşamada iyileşen bir ortam oluşturmaktadır (16).

L. sericata larvalarının besin kaynağı ölü doku, eksuda ve hücrel atıklardır. Bu sebepten dolayı vücuttan dışarıya kollajenaz, tripsin benzeri ve kimotripsin benzeri proteolitik enzimler salgıladıkları ve bu enzimler sayesinde sıvı hale gelen dokuları sindirim sistemlerine aldıkları bildirilmektedir (5). Kas liflerinin parçalanmasını engelleyen fakat bağ dokuyu parçalarına ayıran kollajenazın işlevi için en doğru pH 8-9 aralığındadır ki, bu aralık

skar dokuda larvalar tarafından salgılanan amonyak ve amonyak tuzları tarafından sağlanmaktadır (9-10).

Akut yarada, yabancı cisimlerin ve bakterilerin bölgeden temizlenmesi yaranın normal şekilde iyileşme sürecini başlatırken, kronik olan yarada, yara debridmanı yarayı akut yara durumuna getirmeyi ve bu şekilde yaranın normal şekilde iyileşme sürecine başlamasını sağlar (16). Ayrıca larvaların yara üzerinde sürünerek hareket etmeleri esnasında nekrotik dokuyu ağız kancaları ile mekanik olarak parçalamaları yara iyileşme sürecini hızlandırmaktadır (5).

2.3.2. Yara Dezenfeksiyonu

Larvaların, hastanın kontamine yarası üzerinde filtre görevi gören sterilize edici bir görevi olduğu düşüncesi bazı araştırmacılar tarafından desteklenmiştir (17). Bexfield ve arkadaşları (18). *L.sericata* ekskresyon/sekresyonlarından in vitro olarak potent, termostabil, proteinaza dirençli ve metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'a antibakteriyel etki gösteren iki antibakteriyel molekül tanımlamışlardır. Bunlardan birisi <500 Da büyüklüğünde ve MRSA'ya etkili olarak diğeri 0,5-0,3 kDa büyüklüğünde ve metisilin duyarlı *S.aureus* (MSSA)'a etkili olarak bulunmuştur (18). Bunlara yakın bir çalışmada ise steril *L.sericata* larvalarından elde edilen sekresyon içerisinde <1 kDa büyüklüğünde bir molekülün, MRSA, MSSA, *Streptococcus pyogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir (18). Bu çalışmalara ek olarak, Huberman ve arkadaşları (19) kromatografik yollarla üç değişik (138 Da, 152 Da, 194 Da) molekül tanımlamışlardır. Bunların üçünün de *Micrococcus luteus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel olarak gözlemlendiği ve bu antibakteriyel etkinin düzenli kullanılması halinde artarak devam ettiğini tespit etmişlerdir (19).

Çoğunlukla sinek larvalarının besin ihtiyaçlarını karşıladığı bir bölge olan ölü dokular ya da yaralar, normal olarak birçok bakteri türünü barındırmaktadır. Larvaların bu gibi yerlerde hayatlarını devam ettirebilmeleri için ya bu bakterileri sindirmeleri ya da görmezden gelmeleri gerekmektedir (2). Larvaların sindirim sisteminde yer alan bakterilerin yaşantısı farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Robinson ve Norwood (17) steril olan larvaları enfekte bir yara üzerinde gözlemlemişler ve bakterilerin çoğunluğunun orta bağırsaktan geçtikleri sırada, geri kalan bakterilerin ise son bağırsaktan geçtikleri sırada parçalandıklarını gözlemlemişlerdir (17). Mumcuoğlu K. ve çalışma arkadaşları (20) bakterilerin canlılığını incelerken steril larvaların sindirim sisteminde, değişik bölgelerde bulunan yeşil floresan protein üreten *E.coli* bakterisinin floresan yoğunluğunu temel alarak, bakterilerin bağırsaktaki

hareketleri süresince çoğunun orta bağırsakta parçalandığı, geri kalan kısmının ise son bağırsakta parçalanarak canlılıklarını yitirdiklerini gözlemlemiştir.

Skar dokunun iyileşme sürecinde, hareket halindeki larvalar, irritasyonunları ile ve salgılarına bağlı olarak artan seroz eksuda ile yarayı temizlemekte ve bakterileri yaradan uzak tutmaktadırlar (17). Bunlara ek olarak, larva tedavisinin uygulandığı yaraların larva salgıları ile alkali hale gelmesi ile de dezenfekte oldukları dikkat çekmiştir (17). Cerovsky ve arkadaşları (21), *L. sericata* larvalarının farklı kısımlarında (bağırsak, salgı bezleri, yağ dokusu, hemolenf) ve ekskresyon/sekresyonlarında "*lucifensin*" (*Lucilia defensin*) adını koydukları maddeyi açıklamışlar ve bu maddenin antibakteriyel cevaptan sorumlu olduğu fikrini ortaya atmışlardır (21). Diğer araştırmacılar ise larval sekresyonların *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmlerini değişik dozlarda etkisiz hale getirdiğini tespit etmişlerdir (22-24).

2.3.3. Yara İyileşmesinin Uyarılması

Bulunduğu çevrede epidermal büyüme faktörü (EGF) bulunması halinde *L. sericata* larval sekresyonlarının ve hemolenfinin insan fibroblastının artmasını uyardığı ortaya konmuştur (25). Başka mekanizmaların da olması gerektiği ancak fibroblast proliferasyonunun granülasyon dokusunun meydana gelmesinde tek yol olduğu diğer araştırmacı ve bilim insanları tarafından da gözlemlenmiştir. Chambers ve arkadaşları (26) larvalar tarafından yara üzerinde salgılanan ekskresyon ve sekresyonların ihtiva ettikleri proteinazların, hücre dışı matriksin tekrardan şekillenmesinde önemli bir faktör olduğunu savunmuşlardır (26). Farklı çalışmalarda, larva ekskresyonlarının, ekstraselüler matriks proteinlerinin yayılımlarını etkilediği ve insan dermal fibroblastlarının kollajen başta olmak üzere fibronektin ve benzeri gibi ekstraselüler matriksin belli başlı bileşimlerinin hareketlendirdiği belirtilmiştir. Bu hareketlerin *L. sericata*'nın sekrese durumda olduğu dönemlerde gerçekleştiği sonucu ortaya çıkmıştır (27).

Skar dokuda spesifik sitokinlerin hızlı şekilde granulasyonu ortaya çıkardığı ve *L. sericata* larva ekstraktlarında yüksek dozda interferon-y (20-35 pg/ml) ve interlekin-10 (7-27 pg/ml) olduğu Mumcuoğlu ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (20,28). Tüm bunlara ek olarak diğer araştırmalarda LDT'nin anjiyogenezi de stimule edeceği fikri bir adım önde görülmüş ve larval ekskresyon ve sekresyonlarının histidin, vlinol ve 3-guanidinopropionik asitin kapsadığı, endotelial hücrelerin üstünde proliferatif etkisi olduğu ortaya sunulmuş, bu maddelerin fibroblastlar üstündeki etkisinin ise aksi iddia edilmiştir (28). Larvaların yara üzerinde hareket halinde olmasının, yaranın tedavi sürecini hızlandıran fiziksel bir uyarı sağladığına inanılırken, Wollina ve arkadaşları (29) LDT'den sonra yarada doku

oksijenizasyonunun ilerlediğini ve eş zamanlı olarak yara ödeminin minimize edildiğini açıklamışlardır (2,29-37).

Larva debridman tedavisi için öncelikle steril magotların üretimi gerekmektedir. Üretilen steril magotlarla tedavi uygulanmaktadır.

2.4. STERİL LARVALARIN ÜRETİMİ

L.sericata larvaları LDT de yeşil şişe camı sineği olarak isimlendirilir. Dezenfekte edilmiş larvalar beş gün boyunca 5-8°C'lik sıcaklıkta hayatta kalabilmektedir. Kâr amacı olarak üretilen ve piyasaya sürülen steril larvalar günümüzde İngiltere, Almanya ve Amerika'da bir çok özel firma tarafından üretilmektedir. Çoğunlukla sineklere besin olarak %20 şeker solüsyonu ve üremeyi hızlandırmak amacıyla et ya da ciğer parçaları verilse de steril larva eldesinde çeşitli yöntemler de uygulanmaktadır (5-7, 12). Ciğerin üstünden alınan yumurtalar ayrıştırıldıktan ve dezenfekte edildikten sonra steril besi yerlerine yerleştirmekte, 2-36 saat sonra yumurtadan çıkan larvalar besiyerlerinden alınarak dezenfekte edilmiş olan kaplara yerleştirilmektedir (12).

2.5. LDT'NİN UYGULANMASI

Öncelikli olarak, LDT doktorun denetiminde yapılmalıdır. Tedavi bekleyen hastaların çoğunluğu geriatri, ortopedi ve dermatoloji kliniğinden olsa da LDT hastanenin herhangi bir polikliniğinde de uygulanabilir (12-15).

Dezenfekte edilmiş olan bir parça dakron ya da naylon ince tül hidrokolloid çerçeveden biraz küçük fakat yaradanda biraz geniş olacak şekilde kesilir. Bu metot kafes şeklinde pansuman uygulanmasıdır. LDT'de genellikle izlenen bir yoldur. Bu amaçla yaranın üstü kapanmayacak şekilde sadece kenarlarını çevreleyen yapışkan hidrokolloid kullanılır. Bu tül yapışkan bant yardımıyla hidrokolloid çerçeveye bir ucu hava alacak biçimde tutturulur. Dezenfekte edilen tamponlar drenajı sağlamak üzere tülün üstüne yerleştirilir. Tül, eriyen nekroze dokunun drenajını kolaylaştırdığı gibi larvaların oksijen ile buluşmasına da imkan sağlar (12-16, 38).

”Biobag®” LDT uygulamalarında yakın zamanda kullanılan bir yöntem olmuştur. 0.5 mm. kalınlığında bu iş için üretilen özel bir maddeden (polyvinylalcohol-hydro-sponge) oluşturulmuş iki tül parçası arasına maggotlar, çay poşetinde olduğu gibi yerleştirilir ve poşetin

ağızı yapıştırılır. Enfeksiyon kontrolü ve yaranın hızlı şekilde tedavi edilmesi, poşetlerin geçirgen özelliği olmasından dolayı larvaların basit bir şekilde beslenip, salgılarında yaraya nüfuz etmesiyle gerçekleşmektedir (39). Kafes olarak adlandırılan pansuman çeşidine bu yöntemde ihtiyaç duyulmaz. Gazlı bez ya da sargı yardımıyla poşetlerin doğrudan yaraya temas etmesi ve sabit kalması sağlanır. Bu yöntemin farklı avantajları vardır (40).

a) Maggotlar, bu yöntemle, yara yüzeyinde direkt olarak hareket edemediklerinden yara kenarlarındaki mekanik irritasyon önlenmiş ve ağrı minimize edilmiş olur.

b) Hastaların tedavi yöntemini hızlı şekilde onaylaması yanı sıra maggotların poşet içerisindeki hareket kabiliyetinin kısıtlanmasından dolayı daha temiz bir ortam sağlanmış olur.

Yaranın tedavi aşamasında uygulanacak maggotların miktarı ve süresi LDT'nin önemli sorunlarından. Büyük olmayan yaralarda en fazla iki yüz larva kullanılması; geniş olan yaralarda ise kullanılan larva sayısı bine çıkabileceği belirtilmektedir (12). Bazı yaraların genişliğini ve derinliğini hesaplamak zor olsa da, çoğunlukla nekroze bölgeler için 10 maggot/cm² tavsiye edilmektedir. İhtiyaç duyulduğunda forseps yardımıyla maggotlar yara üzerinden uzaklaştırılsa da, bütün tedavi periyotlarının ardından, maggotların steril serum fizyolojik sıkılarak skar dokudan toplanması önerilmektedir. Büyük maggotlar ıslak yaradan uzaklaşıp kuru olan alanda pupa olmaya çalıştıkları için basit bir şekilde toplanabilmektedirler. Ancak yaranın iç kısmında maggot kalma olasılığı olduğundan bir gün sonra yaraya bir kez daha bakılması ve eğer varsa kalan maggotlar toplanması gerekmektedir (12).

Tedavide kullanılacak maggotlar, yumurtadan çıkıp hava ile tenefüs ettikten sonra çabuk bir şekilde 16. ile 40. saatler aralığındaki gelişim dönemine ulaşmaları beklenir ve bu periyotta tahminen 20-25 mg. besin alma gereksinimleri olacağından, maggotlar, kendi substratları içerisinde 14-16 saat bekletilerek üretilir. 10-15 gr nekroze dokuyu, 16 saatlik 400-600 maggotun bir tam günde tüketebildiği belirtilmiştir. Yaraların hızlı ve daha kesin tedavisi günlük olarak konulan büyük maggotlarla mümkün olduğu gibi genç maggotların yara yüzeyinde 2-3 gün kalması da pratik bir çözüm olarak önerilmektedir. Bu süre boyunca emici pansuman katmanının, larvalar yarada bir günden fazla kalacaksa sürekli olarak değiştirilmesi gerekmektedir. Maggotlar yara üstünde 2-3 gün kalacaksa “Biobag®” yönteminin tercih edilmesi gerektiği belirtilmektedir (13,16,41).

Yaranın iyileşme sürecini arttırmak için canlı dokuların yüzeyinde var olan kalın olmayan pürülan maddenin debridmanı maggotlar tarafından sağlanmalı, büyük ölü dokular ise cerrahi debridman ile sık sık temizlenmelidir. Her kontrolde dokunun durumu, nekroz, drenaj, pürülen akıntı, kötü koku gibi izlenimler kayıt altına alınmalı, tedavi sürecindeki kişinin

herhangi bir ağrısı olup olmadığı not alınmalıdır. Ayrıca, larvaların ölü dokuyu canlı dokudan ayırıştırarak cerrahi operasyonu kolaylaştırması ve maggotların kütlesindeki 37°C'de yumurtadan çıktıktan sonraki değişim LDT'nin en büyük avantajlarından birisidir. Tedavi süreci boyunca, tedavinin her basamağında ya da en azından haftada bir defa fotoğraf çekilmesi tavsiye edilir (12,30-45).

2.6. YARA SINIFLAMASI

Yara, doku sürekliliğinin bozulması, dokuların zarar görmesi ya da kesintiye uğraması sonucunda anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulması şeklinde açıklanabilir.

Doku ve hücreler, açık yaralarda meydana gelen deri eksikliklerinin geç tedavi edilmesi ve bu süre içinde deri örtüsünün iç kısmında hayatlarını devam ettiren dokuların açıkta kalarak atmosferle temas halinde olmasından zarar görür. Zaman kaybetmeden deri ile kapatılmadığı takdirde birden fazla negatif etken skar dokunun onarımını bozar ve yavaşlatır (1,46,47).

Açık yaraların iyileşmesini ve tedavi sürecini aksatan pek çok olumsuzluklar bildirilmiştir. Bunlar; sıcaklık kaybı, kan hücrelerinden eritrosit ve lökositlerin kaybı ayrıca protein ve immün maddelerde azalma, doku kuruluğu, bazı dokuların korumasız kalması, lökositlerin derine göçü ve yara enfeksiyonu olarak bilinir (1,46,47).

Yaralar, oluş zamanına göre, deri bütünlüğünün durumuna göre, etkenin deride yarattığı değişikliğe göre ve bulaş durumuna göre sınıflandırılmaktadır (46,47).

2.6.1. Oluş Zamanına Göre Yaralar

Bunlar akut gelişen yaralar ve kronik yaralar olmak üzere sınıflandırılmıştır (46,47).

Akut yaralar: Akut yaralar çoğunlukla travma sonrası ani gelişen yaralardır. Bu yaralarda yara iyileşmesini engelleyen ya da geciktiren faktörler az olduğundan yara süreklilik göstererek iyileşir ve kısa sürede 2 ila 6 hafta içinde doku iyileşerek bütünlüğünü kazanır.

Akut yaralar ezilme ile (kontüzyon) , sıyrılma ile (abrazyon), yırtılma ile (laserasyon) , batma, böcek sokması, kurşun ile (penetran), kimyasal veya fizikler nedenlere bağlı yanma ile (yanık), hayvan ya da insan ısırması ile (ısırıklar) ve cerrahi kesiklerle (insizyon) oluşabilen yaralardır.

Kronik Yaralar: Normal yara iyileşmesinin hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelizasyon aşamalarının bozulmuş olmasına bağlı olarak veya yara iyileşmesini engelleyen lokal ve sistemik çok sayıda diğer faktörler nedeniyle, normal fizyolojik iyileşme sürecini göstermeyen (6 hafta üzeri) ya da yavaş iyileşen (3 ay üzerinde) yaralardır. Bu tip

yaralarda yara iyileşmesi yavaş olduğundan skar dokusu oluşumu düzensizdir ve yaraya neden olan faktör devam ettiği sürece yara sıklıkla tekrarlar.

Bası yaraları, arteriyel ülserler, venöz ülserler ve diyabetik yaralar kronik yaralara örnek teşkil eder.

Bası yaraları (Bası ülserleri): Vücutta kemik dokunun yoğun olduğu bölgelerin basıya maruz kalması sonucu bu bölgelerde oluşabilen, farklı evre, farklı boyut, farklı şekil ve derinlikteki kronik yaralardır. Kuyruk sokumu ve topuklar bası yaralarının en sık görüldüğü yerlerdir.

Arteriyel ülserler: Ekstremit distalinde görülen, sığ, düzgün kenarlı, nekrotik olabilen, yara tabanı kuru ve soluk yaralardır. Bu tip yaralarda cilt soluk ve soğuktur. Hastalarda yürümekle artan istirahatte azalan ancak devam eden ekstremitte ağrıları görülür. Distal nabızlar zayıftır veya alınmazlar.

Venöz ülserler: Alt ekstremitelerde ve ödem zemininde görülen, venöz staz ve basınç artışına bağlı olarak gelişen ülserlerdir. Ülser tabanı nemli, sığ, yara kenarları düzensizdir, çevre dokular pigmentasyon artışına bağlı olarak koyu renklidir. Bu tip ülserler ekstremitelerde pretibial bölge ve malleol çevresinde lokalize olurlar. Ülser çevresi dokular pigmentasyon artışına bağlı olarak koyu renklidir.

Diyabetik Yaralar: Uzun süreli ve kontrol altına alınmamış diyabet hastalarında alt ekstremitelerin uçlarında, mikrovasküler (küçük damar) komplikasyonları olarak oluşan kuru ve nekrotik yaralardır. İskemi ve duyu kaybı (nöropati) bu durumun oluşmasından sorumlu tutulmaktadır. Bu tip yaralarda diyabete bağlı sinir hasarı nedeniyle ayak ve parmaklarda şekil bozulmuştur.

2.6.2. Deri Bütünlüğünün Durumuna Göre Yaralar:

Bunlar açık yaralar ve kapalı yaralar olarak sınıflandırılmıştır (46,47).

Açık Yaralar: Açık yaralarda cilt ve/veya cilt altı dokunun bütünlüğü bozulmuştur. Bu yaralar genellikle zedelenme, yırtılma, kesilme, delinme veya ısırılma sonucu oluşur. Hava ile temas halinde olduğundan açık yara olarak adlandırılan bu yaralara özenli bir yara bakımı sağlanmadığı takdirde dokunun kapanması gecikir ve bu süre içinde yaranın enfekte olması kaçınılmazdır. Bu durum yara iyileşmesini uzatır.

Kapalı yaralar: Bu yaralar cilt bütünlüğü bozulmamış yaralardır. Ezilme, burkulma, eklem veya kas içi hematoma oluşması gibi nedenlerle gelişirler. Sık enfekte olmazlar.

2.6.3. Etkenin Deride Yarattığı Değişikliğe Göre Yaralar:

Sıyrık yara, kesik yara, ezik yara, delici yara, parçalı yara şeklinde sınıflandırılmışlardır (46, 47).

Sıyrık yara: Travma neticesinde deri dış yüzeyinin bir bölümünün sıyrılması ile oluşur. Kılcal damarlara bağlı kanama görülür.

Kesik yara: Sivri uçlu ya da keskin bir cisimle derinin zarar görmesi sonucu gelişir. Yüzeyel olabileceği gibi sinirler kaslar damarların da zarar görmesi halinde yara derin olabilir.

Ezik yara: Yara kenarlarının ezik olduğu ve kanama riskinin az olduğu yaralardır. Ağırılık altında kalma, darbeye maruz kalma (taş, sopa, yumruk), kaza geçirme (trafik kazaları, düşmeler, çarpmalar) bu tip yaraların oluşmasına neden teşkil eder.

Delici yara: Bu yaralar derin yaralardır ve delinme organlara kadar gidebilir. Delici özellik taşıyan etkenlerle oluşurlar (bıçak, çakı, şiş, kırık cam, kurşun).

Parçalı yara: Bu tip yaralarda doku ile anatomik bölgesi arasındaki bağlantı sonlanmışır. Dokunun ölümü ya da kopması ile oluşan bu yaralar oldukça kanamalıdır.

2.6.4. Bulaş Durumuna Göre Yaralar:

Bu yaralar temiz yaralar, temiz kontamine yaralar, kontamine yaralar, kirli ve enfekte yaralar olarak sınıflandırılmıştır (46, 47).

Temiz yaralar: Vücuda has microbiota alanlarından uzak bölgelerde yer alan enfekte olmamış yaralardır.

Temiz kontamine yaralar: Bu yaralar vücuda has microbiota alanlarına çok yakın yaralardır. Gastrointestinal sistem, solunum sistemi, ürogenital sistem ve derinin açılması ile olur.

Kontamine yaralar: Açık yaralanmalarla; gastrointestinal sistem, ürogenital sistem, safra yollarına direkt açılma ile olan yaralardır. Bu yaralar mikroorganizmalarla kolonize olmuş yaralardır.

Kirli ve enfekte yaralar: Bu tip yaralar, hastalık yapıcı mikroorganizmaların çoğaldığı ve enfeksiyona neden olduğu yaralardır.

2.7. YARA ENFEKSİYONU

Yarada hastalık yapıcı patojen mikroorganizmaların çoğalması sonucu yara enfeksiyonu gelişir. Enfekte yarada, patojenlerin toksinleri fibrin ve büyüme faktörünü

parçalarına ayırır, kollajen yapımını zorlaştırır ve daha birçok mekanizma neticesinde dokunun onarımını engellenir. Bu nedenle enfeksiyon yarayı negatif yönde etkileyen, tedavisini aksatan olumsuz bir durumdur.

Kronik yaralarda çoğunlukla enfeksiyona neden olan aerop patojen bakteriler *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*; *Enterobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Klebsiella* spp. ve *Serratia* spp.'dir (3, 48, 49).

Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa*, esas olarak, konağın deri savunmasının tahrip olduğu geniş yanıklı hastalar; normal temizleme mekanizmalarının bozulmuş olduğu kistik fibroz gibi kronik solunum hastalığı bulunan kişiler; bağışıklığı bastırılmış kişiler; nötrofil sayısının 500/mL'nin altına indiği kişiler ve kateter konmuş olgular gibi hastanede yatan kişilerde enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Hastane enfeksiyonlarının %10 ila 20'sinden sorumludur ve birçok hastanede, nozokomiyal pnömoninin en sık rastlanan etkenidir.

P. aeruginosa insan vücudunun hemen her yerinde enfeksiyonlara neden olabilse de idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni (özellikle kistik fibrozlu olgular) ve yara enfeksiyonları tabloya hakimdir (48, 49). Bu durumlarda bu bakteri kana karışıp sepsise neden olabilir.

Proteus vulgaris, *Proteus mirabilis* ve *Morganella morganii* gibi bakteriler esas olarak idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilseler de pnömoni, yara enfeksiyonları ve septisemiye de neden olabilmektedirler (48, 49).

E. coli, en sık idrar yolu enfeksiyonu, neonatal menejit, sepsis ve turist diyaresi oluşturmaktadır. Yara yeri enfeksiyonları, immünsuprese hastalarda hastane kökenli pnömoniler ve peritonitler diğer sık karşılaşılan enfeksiyonları arasındadır (48, 49).

Klebsiella spp., *Enterobacter cloacae* ve *Serratia marcescens* insanda enfeksiyona en çok neden olan türler arasında yer almaktadır. Bu organizmalar birbirlerine çok benzeyen özelliklere sahiptirler. *Klebsiella* spp. enfeksiyonu bulunan olgularda sıklıkla diyabet, ileri yaş, kronik solunum hastalığı veya alkolizm gibi yatıklaştırıcı etmenler vardır. *Enterobacter* ve *Serratia* türleri ile gelişen enfeksiyonlar özellikle intravenöz kateterizasyon, solunum entübasyonu ve idrar yolu girişimleri gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır (48, 49).

Enterokoklar normal gastrointestinal ve bilier sistemde ve az sayıda da vajina ve erkek üretra florasında bulunurlar. Bu nedenle hastanın kendi barsak florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlara yol açarlar. *Diabetes mellitus*, immünsüpresyon, prematürite, maligniteler, genitoüriner veya solunum sistemi girişimleri, uzun süreli hospitalizasyon ve özellikle de sefalosporinler gibi enterotoksik etkinliği bulunmayan geniş spektrumlu antibiyotiklerin

kullanımı gibi hazırlayıcı faktörlerin varlığında üriner sistem infeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, intraabdominal infeksiyonlar, yara infeksiyonları gibi çok sayıda klinik tablonun sorumlusudurlar (48, 49).

Gram pozitif bakterilerden koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) deride, orofarinkste ve gastrointestinal kanalda kalıcı flora üyesi bakterileridir. Bu nedenle bir süre öncesine kadar bu bakterilerin klinik örneklerden izolasyonları genellikle kontaminasyon olarak değerlendirilmekte iken, günümüzde insan infeksiyonlarına neden olan önemli patojenler arasında bulunmaktadır. KNS'ler genel olarak yabancı cisim, kateter, protez ve şant infeksiyonlarına neden olur. Bunun dışında hastane ve toplumsal kaynaklı üriner sistem infeksiyonları, intravenöz kateter infeksiyonları, bakteriyemi, osteomyelit ve cerrahi sonrası endoftalmitte etken olabilirler. KNS'lerin yabancı cisim infeksiyonları ile ilgili polimer yüzeylere kolonize olabilme ve biyofilm oluşturabilme yetenekleri vardır. Bu nedenle, vücudun savunma hücreleri ve antibiyotikler gibi dış etkilere kaçabilirler. Böylece tedavi güçlüğü yaratan kronik, persistan infeksiyonlara neden olabilirler (48, 49).

2.8. YARANIN İYİLEŞMESİ

Yara iyileşme fazlarının düzenli ve sıralı olarak tamamlanarak dokunun anatomik ve fonksiyonel özelliklerini tekrar kazanma sürecidir. Yaranın iyileşme sürecinde, inflamatuvar faz, proliferasyon fazı ve matürasyon fazı olmak üzere birbiri içine geçmiş üç temel faz görülür.

2.8.1. İnflamatuvar Faz (Eksudasyon Fazı, Hazırlık Fazı)

Dokunun kesildiği durumlarda kanın yara alanında birikmesi sonucu, kesik doku üzerinde fibrinojenin fibrine dönüşmesiyle birlikte, koruyucu fonksiyona sahip pıhtı oluşur. Yara kabuğunun oluşması, pıhtının retrakte olarak yara dudaklarını birbirine yaklaştırırken zamanla kuruması sonucu meydana gelir. Bu süreçte kapiller damarların geçirgenliğinde artış gözlenir ve bunu inflamasyon süreci izler. Dokunun kesilmesinden sonra lökositler yara yatağında kümelenmeye başlar. Lenfosit ve makroglar da yara yatağına doğru hareket ederler. Fibroblast ve endotel hücrelerinin çoğalmasına neden olurlar. Böylece zarar görmüş olan hücreler onarılarak hasarlı dokular temizlenir. Yaranın en önemli noktasındaki hipoksik çevrede tekrar damar oluşumunun uyarılması makrofajlar tarafından sağlanır. İnflamasyon süreci sona ereceği zaman kapiller damarlar tomurcuklanarak yara yatağında yeni damarlanma

meydana getiriler böylece yaraya yüksek oranda oksijen ve besin maddesinin ulaşması mümkün olur (50, 51).

2.8.2 Proliferasyon Fazı (Kollajen Yapım Fazı)

Proliferasyon Fazı, kesik dokunun iyileşmesinin ana evresidir. Dokunun onarımında elastin, glikozaminoglikanlar, kollajen, proteazlar ve fibronektin büyük katkı sağlar. Genç fibroblastlar bu ortamda hakim durumdadır. Doku kaybı oluştuktan sonraki süreçte cilt fibroblastları ve damar ortamı mezenkimal hücreler değişerek miyofibroblastlara çevrilirler. Miyofibroblastlara dönüşen hücrelerin aktif bir şekilde kasılarak yara kontraksiyonuna neden olmaları sonucunda yara küçülmeye başlar. Dokunun eski haline gelmesinin ikinci fazındaki temel olay kollajen fazıdır. Fibroblastlar mobilize olarak yeni kollajeni oluştururlar. Tropokollajen sentezinin ardından olgunlaşmış kollajen oluşur ve çapraz bağlarla liflerin birbirine tutunması sonucu doku eski haline döner (50, 51).

2.8.3. Matürasyon Fazı (Olgunlaşma fazı)

Bu evre olgunlaşma ve tekrardan şekillenme evresidir. Vasküler kanalların kapanması, daha sağlam bir kollajen yapının oluşması ile karakterizedir. Kısa sürede (6-12 ay) maturasyon gelişir. Bu süreç sonrasında dokuda ödem, sertlik ve kızarıklığın kaybolduğu, bir önceki dokudan daha sağlam bir doku oluştuğu gözlemlenir (50, 51).

2.9. KRONİK YARALARDA ENFEKSİYON ETKENİ OLABİLEN BAKTERİLER

Normal fizyolojik iyileşme sürecini göstermeyen ya da yavaş iyileşen kronik yaralarda enfeksiyon etkeni bakterilerin büyük bir bölümü yarada biyofilm oluşturarak bu bölgede uzun süre tutunan bakterilerdir. Biyofilm oluşturan bakteri popülasyonlarına antibiyotiklerin etkisi daha yavaş olabildiğinden bu yaraların yalnızca antibiyotiklerle tedavisi yara iyileşmesini hızlandıracak yegane faktör değildir. Enfekte kronik yaralarda LDT antibiyotik tedavisi ile birlikte iyileşmeyi hızlandıran önemli bir yöntemdir. Bu tip yaralarda sıklıkla rastlanan bakteriler aşağıda belirtilmiştir (46-53).

Staphylococcus cinsi: *Micrococcaceae* familyasında bulunan bu cins kümeler veya diplokoklar şeklinde görülür. Bunlar, Gram pozitif boyanan, sporsuz, hareketsiz, kapsülü bulunmayan, katalaz pozitif koklardır (46-53). Sınıflandırmalarında koagülaz enzimi önem taşır. (46-53). Koagülaz enzimi üreten koagülaz pozitif stafilokoklardan en önemlisi *Staphylococcus*

aureus'tur. Koagülaz enzimi üretmeyenler ise koagülaz negatif stafilokoklar olarak adlandırılırlar. Karbonhidratları fermentatif olarak parçalayan bu bakteriler laktik asit oluşumunu sağlarlar. Mannitole etkileri tür düzeyinde farklılık gösterir ancak *S. aureus* mannitole etkili olması ile tanınır. Stafilokoklar insan vücudunun birçok anatomik bölgesinde mikrobiyota bakterisi olarak yer alırlar. Başta *S.aureus* olmak üzere bu cins yara enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmiştir (46-53).

***Streptococcus* cinsi:** Bu cins *Streptococcaceae* familyası üyesidir. Yuvarlak veya oval şekilli, diplokok şeklinde duran veya zincirler oluşturan, Gram pozitif, katalaz enzimi bulunmayan koklardır. Streptokokların sınıflandırılmasında kanlı agardaki hemolizleri büyük önem taşır (46-53). İnsan vücudunun farklı mikrobiyotalarında bulunabilen streptokoklar insanlarda önemli enfeksiyon etkenleri arasında yer alırlar. Enterokoklar, Grup B streptokoklar, *S. pyogenes* ve *S.pneumoniae* insan sağlığını etkileyen ve şiddetli enfeksiyonlara neden olan en önemli streptokoklardır. Streptokoklar genelde aerob veya fakültatif anaeropturlar. Ancak zorunlu anaerop olan çok sayıda tür de bulunmaktadır. Streptokoklar yara enfeksiyonlarından sıklıkla etken olarak izole edilmişlerdir (46-53).

***Corynebacterium* cinsi:** Korinebakteriler katalaz pozitif aerob Gram pozitif çomaklardır. Çin harfleri görünümünde dizilimleri ile tanınırlar. Korinebakterilerdeki temel cinsler *Corynebacterium* ve *Arthrobacter*'dir. *Corynebacterium* cinsi çoğunlukla mikrobiyota bakterisi olarak tanınmaktadır. Ancak; *C. diptheriae*, *C.ulcerans*, *C. equi*, *C. ovis*, *C. haemolyticum*, *C.striatum* gibi önemli türler patojendir (46-53). Deri mikrobiyotasının önemli etkenleri arasında yer alan bu bakteriler yara enfeksiyonlarında sıklıkla karşımıza çıkarlar.

***Klebsiella* cinsi:** Kapsüllü yapıları ile tanınan Gram negative çomaklardır. Kapsül yapıları nedeniyle mükoid koloniler oluştururlar. O ve K antijenleri bu bakterilerin ayırımında önem taşır. Önceleri Enterobacteriaceae ailesinde yer alan *E.aerogenes*'in son yıllarda *Klebsiella* ailesine alınması ile *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. granulomatis* gibi patojen türler insanda hastane enfeksiyonları yanı sıra pek çok ölümcül enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (46-53).

***Escherichia* cinsi:** Bu cinste en önemli patojen bir Gram negatif çomak olan *E.coli*'dir. Bu bakteri barsak mikrobiyotası üyesi olarak tanınır. Hareketli olup, karbonhidratları fermente eder ve tritofan amino asidini parçalayarak indol açığa çıkmasına neden olur. K vitamini de sentezleyebilen bu bakteriler başta idrar yolu enfeksiyonu olmak üzere yumuşak doku

enfeksiyonları, yeni doğanda menenjit ve sepsise, bebeklerde ishale neden olmaktadır (46-53). *Escherichia coli*, yaşlılarda ve cerrahi operasyon geçirdiği ya da iyonizan radyasyona maruz kaldığı için bağışıklığı baskılanmış bireylerde idrar yolu enfeksiyonlarına da neden olabilir. Bunun dışında sık olmamakla beraber kronik yaralardan da izole edilmiştir (46-53).

Proteus cinsi: *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan bu bakteriler pleomorfik, Gram negatif çomaklardır. Spor ve kapsülleri yoktur. Hareketli bakterilerdir. İnsan barsak mikrobiyotasında, lağım sularında, ölü ya da bozulmuş organik maddelerde bulunurlar (46-53). *Proteus cinsi* özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında, abs e ve yaralarda, pnömoni, septisemi olgularında etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastane enfeksiyonlarına da neden olabilen bu bakterilerde antimikrobiyal direnç hızla artmaktadır (46-53).

Pseudomonas cinsi: Bu bakteriler Gram negatif çomaklardır. Bu grupta bulunan *P. mallei* insan ve hayvanlarda Ruam adı ile bilinen Malleus'un etkenidir. Diğer *Pseudomonas* cinsleri ve özellikle *P.aeruginosa* savunma sistemi zayıflamış, kistik fibrozis gibi altta yatan hastalığı olan hastalarda lokalize yara yeri enfeksiyonundan bakteriyemi ve menenjite kadar uzanan hastalık tablolarına yol açmaktadırlar (46-53). Ayrıca hastane enfeksiyonlarının % 10-25'inden sorumlu tutulmaktadırlar (46-53). *Pseudomonas aeruginosa* 'nın 17 somatik (O) ve 6 flagella (H) antijeni vardır. O antijeni ısıya dayanıklı, flagella ve fimbria antijenleri ısıya dayanıksızdır. Fosfatazlar, proteazlar ve fosfolipazlar da antijen olarak rol oynarlar. Çoğu *Pseudomonas* suşları kültür ortamında pigment üretirler. Bunlar fluoresan pigmentlerdir. Bu pigmentler *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*'in karakteristiğidir. Bu pigmentler sideroforlardır ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler (46-53). *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmler içinde sıklıkla rastlanan ve kronik yaralarda karşımıza çıkabilen en önemli patojenlerdendir (46-53).

2.10.BAKTERİ TANIMLAMASI

Teknolojik ilerlemeler bakteri tanımlama yöntemlerinin de gelişmesine yol açmıştır. Konvansiyonel yöntemlerin zaman isteyen ve çalışanın emek vermesi gereken yöntemler olması nedeniyle yarı otomatize sistemlerle ya da günümüzde bir çok hastanede kullanımda olan otomatize sistemlerle bakteri tanımlaması tercih edilmektedir. Daha ileri gidilerek moleküler yöntemlerle de tanımlama görülmektedir.

2.10.1. Konvansiyonel Yöntemlerle Tanı

Yöntem, bakterinin fenotipik özellikleri yanı sıra biyokimyasal özelliklerine göre de tanımlamayı amaçlamaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan mikroskopi, bakterinin biyokimyasal özelliklerini ortaya çıkaran yöntemler ve serolojik yöntemler bunlara örnek teşkil etmektedir (52-53).

Mikroskopi: Örneklerin klinik değerlendirilmesinde mikroskopi başta gelen temel yöntemlerdendir. Farklı boyama yöntemleri kullanılarak boyanmış olan bir preparatta bakterinin morfolojisini, Gram pozitif veya Gram negative boyanma özelliğini hızlıca görmemizi sağlar. Ayrıca kullanılan mikroskobun özelliğine göre mikroskopi daha kapsamlı veriler de sunar. Mikroskopi, klinik örnekte bulunan ve /veya üreyen bakteri hakkında ön bilgi sahibi olmamızı sağlayan ve tanımlama için seçeceğimiz yöntemleri daha hızlı saptamamıza yarayan temel bir tanı yöntemidir (52-53).

Kültür: Aerop ve anaerob bakterilere ait özelliklerin incelenebilmesi, metabolik aktiviteleri sonucu oluşan ürünlerin belirlenebilmesi ve bu ürünlere göre tanımlanabilmeleri için üretilmeleri gerekmektedir. Invitro koşullarda saf kültür şeklinde bakterilerin üretimi besiyerlerinde mümkün olabilmektedir. Aerop bakterilerin üretilmesi için genelde %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş genel üretim besiyerlerinden olan, koyun kanlı agar, çikolatamsı agar, seçerek üretici bir besiyeri olan MacConkey agar ve tiyoglikolatli sıvı besiyeri tercih edilmektedir. Bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlamasında tanıtıcı besiyeri olarak başta üç şekerli demirli agar (TSI) besiyeri olmak üzere hareket besiyeri, üre besiyeri, sitrat besiyeri, glükoz besiyeri gibi aranan özelliğe spesifik olan pek çok besiyeri kullanılabilmektedir (52-53).

Seroloji: Serolojik testler; bir mikroorganizmaya ait antijenleri kullanarak hasta serumundaki antikorları belirlemeye ya da belli antikorları taşıyan serumlarla hasta örneğindeki antijenleri belirlemeye, ayrıca insanın bağışıklık durumunu anlamaya yarayan ve mikroorganizmaların serotiplendirilmesinde kullanılan testlerdir. Antijen-antikor reaksiyonları bu testlerin başında gelmektedir. Bunun dışında monoklonal antikorlar kullanarak, immünoassey yöntemleri kullanarak veya immünfloresan teknikleri ile de serolojik tanımlamaya gidilebilmektedir (52-53). Mikrobiyoloji laboratuvarında kültür ve sıkça kullanılan mikroskopi dışında antikorlu polivalan serumlar da bazı bakterilerin tanısında kullanılan önemli bir tanı yöntemidir.

2.10.2. Yarı -Otomatize Sistemlerle Tanı

Mikrobiyoloji laboratuvarında biyokimyasal testlerle bakteri tanımlaması yoğun emek ve yoğun sarf malzeme tüketimine yol açmaktadır. Bunu daha aza indirmek için küçük minyatür biyokimyasal yöntemler kullanıma girmiştir. Analitik profil index (API) olarak adlandırılan tanı kitleri bakterilerin tanımlanmasında sıkça kullanılmaktadır. Bu kitler (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) test için gereken maddeleri dehydrate şekilde içeren 20 mikrokuyucuklu uzun bir stripten oluşmuştur. Bakteri süspansiyonu kit talimatına göre bu mikrokuyucuklara ekilir. İnkübasyon sırasında, enzim substratı ile reaksiyona girer ve oluşan değişiklikler, birtakım reaktiflerin ilavesi ile oluşan renk değişikliği ile görülür duruma gelir. Bu reaksiyonlar API veya bilgisayar programı ile tanımlanır (52-55).

2.10.3.Otomatize Sistemlerle Tanı

Otomatize yöntemler iş gücünü ve test süresini azaltmak yoğun ayıraç ve besiyeri kullanımını düşürmek için geliştirilmiştir. Bu sistemler için özel hazır besiyerleri kullanımı önerilmektedir. Enzim-substrat etkileşimi doğrultusunda ya da gaz oluşumuyla bakterilerin belirlenmesini esas teşkil eder. VITEK (bioMerieux) ve PHOENIX (BD) yöntemi aerop ve anaerob bakterilerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (55).

2.10.4 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF MS) ile Tanı

Bu yöntem, mikroorganizmadaki biyomoleküllerin iyonize olduktan sonra manyetik alandan geçirilmesi neticesinde protein profillerinin görüntülenmesine dayanmaktadır. Bu profillerin grafik şeklinde görünümüleri, cihazın veri tabanındaki mikroorganizmalar ile olan uyumuna göre tür düzeyinde tanımlanır (56). Bu Kütle spektrometri yöntemi 1900'lerde keşfedildiği halde uzun süre çok sınırlı kullanılmıştır. 1970'li yıllarda mikrobiyoloji alanında kullanılmaya başlanmıştır.

MALDI, 1980'lerin sonunda soft iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi sonucu proteinler için uygulanabilir duruma geldi. Bu teknikte protonların eklenmesi ya da çıkarılması ile peptit zincirleri iyonize olmaktadır. MALDI-MS cihazı ilk kez 1990'ların başında ticari kullanıma sunuldu (254). Günümüzde Vitek MS (BioMerieux, Etoile France) ve MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc, Fremont, CA) olarak satılan MALDI -TOF sistemleri bulunmaktadır. Bakteri izolatları için MALDITOF MS'in türleri %84,1 ile %95,2 oranlarında doğru tanımladığı bildirilmiştir (56, 57).

2.11. BAKTERİ MİKTARININ BELİRLENMESİ

Kronik yaralarda bulunan bakterilerin cins ve türü büyük önem taşımaktadır ancak bunların sayısı da önemlidir. Mikroorganizmaların sayımı için geliştirilen sayım yöntemlerinin hiçbirisi, tam ve kesin sayıyı belirlemeye imkân sağlayamamasının yanısıra her yöntemin birbirleri arasında avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Numunede bulunan canlı bakteri sayısı bu gün pek çok moleküler yöntemle saptanmakla beraber cansız mikroorganizmaları da kapsaması bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

İnfekte bir dokunun kantitatif tanımı dokunun 1 cm² sinde ya da 1 gramında 10⁵ CFU /g bakteri varlığı olarak ifade edilmiştir (58). Bakteri miktarının 10⁶CFU /g'a ulaşması durumunda ülserin iyileşmesinde gecikme olduğu bildirilmiştir. Kritik kolonizasyon konseptine göre ise $\geq 10^4$ CFU/g'a eşit veya daha fazla bakteri varlığı infeksiyon için kritik bir değer olarak her an dokunun infekte olabileceği, biyofilm gelişmesinin arttığı şeklinde ifade edilmiştir (59, 60, 61).

Mikrobiyolojide kültüre dayanan yöntemlerle bakteri miktarının belirlenmesi kantitatif veya yarıkantitatif kültür yöntemleriyle yapılmaktadır. Kantitatif kültür örnekten yapılan seri dilüsyonlarda üreyen bakteri miktarını belirleyerek sonuca ulaşan bir yöntemdir. Yarı-kantitatif kültür ise dilüsyonlar yapılmadan azaltma yöntemiyle örneğin Petrideki besiyerine ekilmesi ve 4 kadrandan her birinde üreyen bakteri yoğunluğuna göre bakteri sayısının belirlenmesidir (60, 62). Bakteri yoğunluğu 1+ (seyrek üreme), 2+ (hafif üreme), 3+ (orta derece üreme), 4+ (yoğun üreme) ya da +, ++, +++, ++++ şeklinde ifade edilmektedir. 1+ üremenin 10²-10³ CFU/g, 2+ üremenin 10³-10⁴ CFU/g, 3 + üremenin 10⁴-10⁶ CFU/g ve 4+ üremenin 10⁷CFU/g'a eş değer olduğu bildirilmiştir (63, 64).

Bir çok çalışmada kronik yaralarda bakteri miktarının belirlenmesinde yarı-kantitatif kültür kullanılmıştır (63-66).

3. YÖNTEM

Eylül 2018-Ekim 2019 tarihleri arasında, değişik hastanelerden ve kliniklerden ‘larva debridman tedavisi’ isteği ile TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı’na gönderilen hastaların kronik yarasından alınan ve CTF Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına bakteriyolojik inceleme için gönderilen biyopsi örneklerinde üretilen bakteriler retrospektif olarak değerlendirildi.

Çalışmamız, İ.Ü.C, CTF Etik kurulunca 02.10.2019 tarih ve 150312 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

Larva Debridman Tedavisi almak üzere TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı’na başvuran, son 72 saat içinde antibiyotik kullanmamış erişkin hastalara ait yara biyopsi örnekleri çalışmaya dahil edildi.

Çalışma grubu ardarda en az 3 kere larva debridman tedavisi uygulaması gören 100 hastadan oluştu. Bu hastaların 1. LDT uygulamasından önce alınmış olan yara biyopsilerine ve 3. LDT uygulamasından 72 saat sonra aynı bölgeden alınmış olan yara biyopsilerine ait bakteriyolojik analiz sonuçları değerlendirildi. Bu örneklerde total bakteri yoğunluğu yarı-kantitatif sayımla belirlendi ve üreyen bakteriler tanımlandı.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Besiyerleri

Koyun Kanlı Agar Besiyeri

Agar (oxoid)	40 g
Koyun kanı (Defibrine)	50 mL
Distile Su	1000 mL

Toz besiyeri, hazır olarak 500 g.'lık kutuda temin edildi. Distile suda 40 g toz besiyeri [(Trypton (14 g), nötralize pepton (4,5 g), maya özütü (4,5 g), sodyum klorit (5 g), agar (12 g)] eritildi. Ph'ın $7,3 \pm 0,2$ olması sağlandı ve otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri ısısı 45°C'ye kadar düşürüldükten sonra içine 50 mL defibrine koyun kanı ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

Katılaşmadan Petri kutularına döküldü. Bu besiyerinde infeksiyon etkeni bakterilerin hemoliz yapabilme özellikleri araştırıldı (52, 53).

Çikolatamsı Agar Besiyeri

Agar base (oxoid)	40 g
Defibrine koyun kanı	50 mL
Distile Su	1000 mL

Üretici firmadan (Oxoid) toz besiyeri 500 g.'lık kutuda hazır olarak alındı. 1000 mL distile suda 40 g toz besiyeri [(Trypton (14 g), nötralize pepton (4,5 g), maya özütü (4,5 g), sodyum klorit (5 g), agar (12 g)] eritildi . pH $7,3 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 45°C'ye kadar soğutuldu. 50 mL defibrine koyun kanı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 2 dakika boyunca kaynayan suda tutuldu. İyice karıştırıldıktan sonra Petri kutularına döküldü. Bu besiyeri genel üretim amaçlı ve ayrıca bakteri yoğunluğunun yarı kantitatif sayımında kullanılmıştır (52, 53).

MacConkey Agar Besiyeri (Oxoid)

Pepton	20 g
Laktoz	10 g
NaCl	5 g
Safra tuzları	1,5 g
Nötral kırmızısı	0,03 g
Kristal viyole	0,001 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Toz besiyeri 500 g olarak (oxoid) temin edildi. 51,5 g toz besiyeri, distile suda eritildi ve pH'ın $7,1 \pm 0,2$ olması sağlandı. Otoklavlandıktan sonra (121 °C'de 15 dakika) besiyeri ısısı 45°C'ye inince Petri kutularına döküldü. Hazırlanan besiyeri hasta örneklerinden Gram negatif çomakların izolasyonunda kullanılmıştır (52, 53).

Tiyoglikolatlı Sıvı Besiyeri (BD)

Maya özütü	5 g
Trypton	15 g
Glikoz	5,5 g
Sodyum tiyoglikolat	0,5 g

Sodyum klorit	2,5 g
L-sistein	0,5 g
Resazurin	0,001 g
Agar	0,75 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri (Oxoid) 1000 mL distile suda ısıtılarak eritildikten sonra pH $7,1 \pm 0,2$ 'e ayarlandı ve tüplere 10 mL dağıtıldı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 45°C 'ye gelinceye kadar soğutuldu. Bu besiyeri parafilm ile kapatılıp 4°C'de saklandı (52, 53).

Safraı Eskülin Agar (Oxoid)

Pepton	14 g
Safra tuzları	15 g
Ferrik sitrat	0.5 g
Eskülin	1 g
Agar	14 g

Toz besiyeri 500 g'lık kutuda hazır olarak alındı. 44,5 g toz besiyeri 1000 mL distile suda eritildi. $7,1 \pm 0,2$ pH olması sağlandı. Otoklavlandıktan sonra (121 °C'de 15 dakika) besiyeri ısısı 45°C'ye inince Petri kutularına döküldü. Bu besiyeri enterokokların/Grup D streptokokların ayırımında kullanılmıştır (52, 53).

DNaz Besiyeri (Oxoid)

Deoksiribonukleik asit	2 g
Triptoz	20 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Toz besiyeri üretici firmadan (oxoid) 500 g'lık kutuda hazır olarak alındı. 42 g toz besiyeri 1000 ml distile suda eritildi, pH $7,3 \pm 0,2$ 'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kutularına dökülerek donduruldu. Bu besiyeri bakterinin DNaz aktivitesini göstermek için kullanılmıştır (52, 53).

Üç Şekerli Demirli Agar Besiyeri (TSI) (Oxoid)

'Lab- Lemco' tozu	3 g
Maya özü	3 g
Pepton	20 g

Sodyum klorit	5 g
Laktoz	10 g
Sükroz	10 g
Glikoz	1 g
Ferrik sitrat	0,3 g
Sodyum tiyosülfat	0,3 g
Fenol kırmızısı	0,024 g
Agar	12 g
Distile su	1000 mL

Üretici firmadan 2,5 kg'lık kutuda hazır olarak alındı. 64,52 g toz besiyeri 1000 mL distile suda eritildi ve tüplere 2,5 mL dağıtıldı. pH $7,3 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. Besiyeri içeren tüpler, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra yatık konumda soğutuldu. Bu besiyeri, Gram negatif çomakların dekstroze, laktoz ve sükroz fermentasyonu ile hidrojen sülfid üretimi özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (52,53).

Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri (Difco)

Pepton	10 g
Maya özü	3 g
Tripton	10 g
Dekstroze	1 g
L-ornitin HCl	5 g
Brom krezol moru	0,02 g
Agar	2 g
Distile su	1000 mL

Hazır olarak 500 g'lık kutuda alındı. Üretici firma direktifleri doğrultusunda 31 g toz besiyeri 1000 mL distile suya ilave edildi hafifçe ısıtılarak erimesi sağlandı ve tüplere dağıtıldı. pH'sı 6,5'e ayarlandı ve tüpler, otoklavda steril edildi. Bu besiyeri *Enterobacteriaceae* üyelerinin ornitin dekarboksilaz aktivitesi gösterip göstermediğinin, indol üretiminin ve hareket özelliklerinin gösterilmesinde kullanıldı (52,53).

Christensen Besiyeri (Üre Besiyeri)(Sigma)

Pepton	1 g
Glikoz	1 g
Sodyum klorit	5 g

Disodyum fosfat	1,2 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,8 g
Fenol kırmızısı	0,012 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Glikoz ve üre ilave edilmeden önce diğer maddeler suda eritildi. pH'ın $6,8 \pm 0,2$ olması sağlandı. Besiyeri 121°C 'de 15 dakika tutularak steril edildi. Besiyeri sıcaklığı 45°C 'ye kadar düşünce, önceden süzölmüş olan steril glikoz ve üre eriyikleri katıldı, iyice karıştırıldı ve steril şartlarda tüplere 1'er ml dağıtıldı. Dik olarak katılaşmaya burakılan besiyeri bakterilerde üreaz enzimi varlığının saptanmasında kullanıldı (52, 53).

Sitrat Besiyeri (Sigma)

Sodyum klorit	5 g
Amonyum dihidrojen fosfat	1 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Sodyum sitrat	3 g
Bromtimol mavisi eriyiği	0,08 g
Agar	20 g
Distile su	1000 mL

Maddeler karıştırıldı ve 1000 mL distile suda eritildi. Her bir tüpe 5'er mL dağıtıldı. pH'ın $6,8 \pm 0,2$ olması sağlandı, 100°C 'de 1 saat steril edildi. Tüpler yatık konumda tutularak soğutuldu. Hazırlanan besiyeri Gram negatif bakterilerin sitratı karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadıklarını anlamak amacıyla deneylere eklendi (52, 53).

Dekstroz (D) Besiyeri (Merck)

Bromtimol mavisi eriyiği	0.04 g
Kazeinin pankreatik dijesti	10 g
Glikoz	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Hazır besiyeri üretici firma (BD Diagnostic Systems) direktifleri doğrultusunda distile suda (1000 mL) eritildi. 100°C 'de, 1 saat tutularak steril edildi ve pH'ın $6,9 \pm 0,2$ olması sağlandı.

Her bir tüpe 5'er ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler, otoklavda 121°C'de 15 dakika tutuldu. Bu besiyeri Gram negatif çomakların dekstroza etkisinin araştırılmasında kullanıldı (52, 53).

Clark-Lubs Besiyeri (Merck)

Pepton	7,0 g
D (+) Glucose	5,0 g
Fosfat bafır	5,0 g
Distile su	1000 mL

Üretici firmadan alınan hazır besiyeri 1000 mL distile su içerisinde eritildi. Standart deney tüplerine 5'er mL olarak dağıtıldı ve otoklavda 121 ° C 'da 15 dakika sterilize edildi. Bu besiyeri bakterilerin asetoin ve metil kırmızısı oluşturma özelliklerini araştırmak için kullanılmıştır (52, 53).

Mueller Hinton Agar Besiyeri (BD)

Sığır Eti Ekstraktı	2, 0 g
Kazein Asit Hidrolizatı	17, 5 g
Nişasta	1, 5 g
Agar	17g
Distile su	1000 mL

Hazır besiyerinden 38 g, 1000 mL distile suda eritildi. 7,1 ± 0,2 pH olması sağlandı. Otoklavlandıktan sonra (121 °C'de 15 dakika) besiyeri ısı 45°C'ye inince petri kutularına döküldü. Kanlı Mueller Hinton Agar (KMHA) besiyeri ise petri kutularına dağıtılmadan önce besiyerine %5 koyun kanı eklenerek hazırlandı. Bu besiyeri bakterilerin optokin, basitrasin ve novobiosin disklerine duyarlılıklarını saptamak için kullanılmıştır (52, 53).

3.1.2. Bakteri Tanımlamasında Kullanılan Ayıraçlar ve Kitler

- Oksidaz ayırıcı (Sigma)
- Kovaks ayırıcı (Sigma)
- Metil kırmızısı ayırıcı (Gül Biyoloji)
- Hidrojen peroksit (%3 lük)
- HCl (%1 lik)
- BBL DrySlide PYR Kit (BD)

3.1.3. Bakteri Tanımlamasında Kullanılan Diskler

- Basitrasin Diski (oxoid)
- Novobiosin Diski (oxoid)
- Optokin Diski (oxoid)

3.1.4 Bakteri Tanımlamasında MALDI-TOF

- Sisteme spesifik hedef slaytlar ve reaktifler kullanıldı.

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Hastalara Ait Bilgilerin Toplanması

TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'na LDT için müracaat eden 100 hastanın ülserli veya pürülan kronik yaralarından biyopsi örnekleri alınmadan önce, bireylerin, yaşları, cinsiyetleri, meslekleri, daha önce LDT alıp almadıkları, LDT uygulanma sayısı, tanımlanmış kronik bir hastalıklarının olup olmadığı, antibakteriyel bir tedavi alıp almadıkları, daha önce tanı aldıkları önemli hastalıkları olup olmadığı hakkındaki bilgilerin yer aldığı dosya kayıtlarına ulaşıldı ve bilgiler not edildi.

3.2.2.Biyopsilerin Alınması.

Lucilia sericata sinek türüne ait II. dönem larvalar konmadan önce enfeksiyonun aktif olduğu sağlam dokuya en yakın yerden steril şartlarda biyopsi örnekleri alınmış ve daha sonra bu yaralara larvalar konulmuştur. 48 saat bekletilerek LDT gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda larvalar yaralardan uzaklaştırılmış ve yara yerinden tekrar biyopsi örnekleri alınmıştır. Bu işlem hastalara haftada 2 ila 3 defa, olmak üzere bütün tedavi süresince tekrarlanmıştır (2, 44, 45).

3.2.3. Bakteri Kültürlerinin Yapılması

Biyopsi örnekleri güvenlik kabini içinde steril bistüri yardımı ile küçük parçacıklara ayrıldıktan sonra, aerob kültür için %5 koyun kanlı agar, çikolatamsı agar, MacConkey agar ve tiyoglikolatlı sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen bakteriler Gram boyanma özellikleri ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmıştır (52, 53).

3.2.4. Üretilen Bakterilerin Konvansiyonel Yöntemle Tanımlanması

Gram Boyama: Boyanacak olan preparatı hazırlamak için önce lam üzerine bir damla tuzlu su kondu ve besiyerlerindeki bakteri kolonisinden alınarak lam üzerindeki tuzlu suyla karıştırıldı. Lam üzerine yayıldı, kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar Gram boyama ile boyandı. Bunun için sırası ile aşağıdaki işlemler uygulandı.



Şekil 3.1: Ülserli yara örneklerinin alındığı hasta dokulara ait bazı görüntüler

Preparatlar havada kuruduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildiler ve aşağıdaki sıra izlenerek boyandılar.

1. Kristal viyole. Boya lam üzerine döküldü ve lam üzerinde 2 dakika bekletildi. Sudan geçirildi.
2. Lugol: Mordan görevi gören bu boya lam üzerine döküldü. 2 dakikalık bir süre bekletildi. Sudan geçirildi.
3. Alkol renk gidermek için kullanıldı. Preparat üzerine damlatılarak renk giderildi. Sudan geçirildi.
4. Sulu fuksin: Boya lam üzerine döküldü ve lam üzerinde 30 saniye bekletildi. Sudan geçirildi.

Preparatlar bir süre havada kurutuldu. Üstlerine immersiye yağı damlatıldı. Işık mikroskopunda yüzölçümü büyütmeli objektif kullanılarak incelendi (52, 53).

3.2.4.1. Gram Negatif Çomakların Tanımlanması:

Yirmi dört saatlik kültürlerden hazırlanan Gram preparasyonların incelenmesi sonucu, kültürlerde Gram negatif çomak olduğu saptanan ve MacConkey agarda üreyen farklı morfolojideki kolonilerden; üç şekerli demirli agar (TSI), hareket-indol-ornitin (MIO), Christensen, Clark-Lubs, sitrat ve dekstroze besiyerlerine ekim yapıldı. Oksidaz ve Voges Proksidaz özellikleri incelendi (52, 53).

Oksidaz Özelliğinin İncelenmesi: Petri kutusu içine süzgeç kağıdı konup ortasına 2-3 damla Oksidaz ayırıcı damlatıldı. Gram negatif bakterilerin 18-24 saatlik saf kültürlerinden, tek kullanımlık plastik steril öze ile alınarak ayırıcının damlatıldığı yere sürüldü. Koyu mor rengin oluşumu oksitlenmenin varlığını ifade ettiğinden pozitif sonuç olarak değerlendirildi (52, 53).

TSI Besiyerinde Üremenin Değerlendirilmesi: D-Glikoz ve süktroz fermantasyonunun varlığı, 18-24 saatlik inkübasyondan sonra, besiyerinin kırmızımsı renginin, tüpün dip kısmından başlayarak sarıya dönüşmesi ile değerlendirildi. Sarı renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi (24). Laktoz fermantasyonunun varlığı, 18-24 saatlik inkübasyondan sonra, besiyerinin eğik yüzeyinin kırmızıdan sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (52, 53).

H₂S oluşumu, 18-24 saatlik inkübasyondan sonra, besiyerinde yüzeyden başlayıp derine doğru ilerleyen siyahlaşma ile tanımlandı (52, 53).

Hareket, İndol, Ornitin Özelliklerinin Değerlendirilmesi: Bakterilerde hareket özelliğinin incelenmesi, Gram negatif bakterilerin MIO besiyerinde 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra bakterilerin besiyerinin tam ortasında inokulasyon hattı boyunca sınırlı bir üreme gösteren ve

besiyerine dağılmayan kökenler hareketsiz, besiyerinde dağılarak homojen bir bulanıklığın oluşmasına neden olan kökenler ise hareketli bakteriler olarak değerlendirildi (52, 53).

İndol Oluşumunun Belirlenmesi: Gram negatif bakterilerin MİO besiyerinde 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerine 0,2-0,3 ml Kovacs indol ayırıcı eklendi. Kırmızı renk oluşumu indol varlığını gösterdi (52, 53).

Ornitin Varlığının Belirlenmesi: Gram negatif bakterilerin MİO besiyerinde 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra oluşan sarı rengin, mora dönüşümü ornitin dekarboksilaz varlığında putresin oluşumunu gösterdi. Ornitin dekarboksilaz oluşmazsa ortam sarı kalır (52, 53).

Asetoin Oluşumunun Gösterilmesi: Asetoin oluşumu Voges Proskauer Testi ile gösterildi. Test edilecek bakterinin saf kültüründen Clark-Lubs besiyerine ekim yapıldı ve 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Voges çözeltilerinden, A çözeltilisinden 0,6 ml, B çözeltilisinden 0,2 ml alınarak Clark-Lubs besiyerine ilave edildi. VP testi, butilen glikol üretimine aracılık eden asetoin veya asetil metil karbinol varlığını tespit eder. Besiyerinde asetoin varsa açık havada oksitlenir ve KOH ile diasetillenir. Daha sonra, besiyerinde alfa-naftol varken, diasetil ile peptonda bulunan guanidine komponentleri reaksiyona girer. Böylece kırmızı renk oluşur. Kırmızı renk gelişmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirildi ve butilen glikol oluştuğunu gösterdi (52, 53).

Metil Kırmızısı Testi: Bu test, glikozun fermentatif metobolize olması sonu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Metil kırmızısı solusyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir. Üremiş kültürlerden, Clark-Lubs besiyerlerine ekimler yapıldı ve tüpler uzun bir süre inkübe edildi (37°C de 2-7 gün). Ardından tüplerin üzerine metil kırmızısı olarak bilinen solusyondan damlatıldı (4-5 damla). Tüpler hafifçe çalkalandı. Deney sonunda tüpteki besiyerinin kırmızı renge dönüşmesi metil kırmızısı testinin pozitif olduğunu gösterdi (52, 53).

Üreaz Aktivitesinin İncelenmesi: Besiyerinde üreyen Gram negatif çomaklar Christensen besiyerine ekildi ve inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra besiyerinin pembe renge dönüşmesi bakteride üreaz enziminin bulunduğunu belirtti. Bu enzim varlığında üre, amonyak ve karbondioksit ayrışır ve ortam alkalileşir (52, 53).

Sitrat Özelliğinin İncelenmesi: Besiyerinde üreyen Gram negatif çomaklar sitrat besiyerine ekildi ve inkübe edildi. 24 saat sonra besiyerinin alkali renk olan maviye dönüşmesi sitrat pozitif olarak kabul edildi. Besiyeri alkalileşmesi, sitratı kullanımından sonra nitrojen oluşmasına bağlıdır (52, 53).

Glikoz Fermantasyonunun İncelenmesi: Gram negatif bakterilerin dekstroz besiyerinde 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra bakterilerin glikoza etkisi nedeniyle ayıraç asit reaksiyon vererek yeşilden sarıya döner. Besiyerinin parçalanmış olması, gaz oluşumu olarak değerlendirildi (52, 53).

3.2.4.2. Gram Pozitif Diplokokların Tanımlanması:

Besiyerlerinde üreyen kolonilerden mikroskopik incelemede Gr (+) küme şeklinde görülenlere katalaz, koagülaz, basitrasin ve novobiosin duyarlılığı, DNaz testleri yapıldı (52, 53).

Katalaz Enziminin Belirlenmesi: Mikroskopik incelemede Gram pozitif küme yapan diplokoklar şeklinde görülen bakterilere ait koloniler besiyerinden öze ile toplandı ve lama sürüldü. %3'lük H_2O_2 (1 damla) bunun üzerine damlatıldı. Katalaz enzimi varlığında, H_2O_2 su ve oksijene parçalandığından açığa çıkan oksijen neticesinde kabarcıkların görülmesi bakterinin katalaz pozitif olduğunu gösterdi. Kabarcıkların bulunmaması katalaz negatif kabul edildi (52, 53).

Basitrasin Direncinin Araştırılması: Test, mikroskopik incelemede Gram pozitif küme yapan diplokoklar şeklinde görülen bakterilere ait kolonilerle hazırlanan süspansiyonun Mueller Hinton Agar (MHA) yüzeyine yayılması ve üzerine Basitrasin diski (Thermofisher Sci) konması ile yapıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından basitrasine dirençli olan kökenler *Staphylococcus* spp. olarak tanımlandı (52, 53).

Novobiosin Duyarlılığının Araştırılması: Stafilokok kolonilerinden hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyondan MHA besiyerine ekildi ve üzerine Novobiosin diski (Thermofisher Sci) yerleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda novobiosine dirençli olan stafilokoklar *Staphylococcus saprophiticus* olarak tanımlandı (52, 53).

DNaz Testi: Stafilokok kolonilerinden alınarak DNaz besiyerine çizgi şeklinde ekimi yapıldı. İnkübasyondan sonra besiyerinin yüzeyi %1'lik H kaplandı. Üreme çizgisinin etrafında bir saydam hale oluşumu bakterinin DNaz pozitif olduğuna işaret etti (52, 53).

Koagülaz Deneyi: *Staphylococcus aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanıldı. Koagülaz deneyi lam deneyi ile yapıldı.

Lam Deneyi: Bu deneyin amacı stafilokoklarda bulunabilen “kümeleştirici faktörü” (clumping factor) belirlemektir. Bu faktör bakteri yüzeyinde bulunur. Fibrinojeni pıhtılaştırır ve stafilokokların kümelenmesine neden olur. Lamin bir ucuna tuzlu su (1 damla), diğer ucuna

plazma (1 damla) kondu. Stafilokok kolonilerinden öze yardımı ile alındı ve lam üzerine konmuş olan damlalarla karıştırılıp homojen olması sağlandı. Lam hafifçe aşağı ve yukarı çevrilerek kümeleşme olup olmayacağı gözlenmeye başlandı. 1,0-3,0 saniye içinde gözle görülebilen kümeleri oluşturan koloniler pozitif kabul edildi (52, 53).

Optokin Duyarlılık Testi: Alfa hemoliz yapan streptokok morfolojisine sahip kolonilerden %5 koyun kanlı agara öze ile ekildi. Agar üzerine 5 µg lık optokin diski (oxoid) kondu ve 35 °C’de 18-24 saat süresince, %5 CO₂ gazı içeren etüvde inkübe edildi. Diskin etrafındaki ürememe zonu ölçüldü ve ≥ 14 mm inhibisyon zonu oluşturan bakteri, *S. pneumoniae* olarak tanımlandı (52, 53).

PYRTesti: Bu test bakteride L-pyrrolidonyl arylamidase varlığını araştırmak için kullanıldı. Hızlı test (BBL DrySlide PYR Kit) kiti ile yapılan testte PYR nin emdirilmiş olduğu filtre kağıdına Enterokok olabileceği düşünülen koloni öze ile sürüldü, bir damla ayıraç (solvent) damlatıldı ve 5 dakika beklendi, sonra bir damla PYR ayırıcı kondu ve süre olarak 30-60 saniye beklenerek reaksiyon izlendi. L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hidrolizi neticesinde beta-naphthylamine açığa çıktığında görülen kırmızı renk testin pozitif olduğunu belirtti. Şüpheli koloniler kırmızı renk oluşturuyorsa bunlar *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı. Kolonilerden sarı veya portakal rengi oluşturanlar PYR negatif olarak kabul edildi (52, 53).

3.2.4.3. Gram Negatif Diplokokların Tanımlanması

Gram preparasyonda pembe renkli diplokoklar şeklinde görülen bakterilere ait kolonilerden katalaz, oksidaz ve DNaz gibi önemli testler yapıldı. Bakterilerin ön tanısı için yapılan bu testler neticesinde, DNaz testi sonucu pozitif çıkan Gram (-) diplokoklar *Moraxella* spp. olarak tanımlandı (52, 53).

3.2.4.4. Gram Pozitif Çomakların Tanımlanması

Besiyerlerinde üreyen bakterilerden hazırlanan Gram preparasyonda mor renkte boyanan Gram pozitif çomak şeklinde olan bakterilerin ön tanısı bu bakterilerin, spor oluşturma, difteroid dizilim oluşturma özelliklerine göre yapıldı (52, 53).

3.2.5. Üretilen Bakterilerin MALDI-TOF MS ile Tanımlanması

Derin dondurucuda saklanan bakteriler çözündürüldü. Triptik soy agar besiyerlerine pasajları alındı. Üreyen kolonilerden tekrar saf pasajlar alındı ve her bir bakterinin 18-24 saatlik kültüründen koloni alınarak “hedef slayt” olarak adlandırılan tek kullanımlık BRUKER maldi slaytları üzerindeki işaretli bölgelere yayıldı ve kuruması beklendi. 1’er µL matriks solüsyonu

kuruyan örnekler üzerine eklendi ve yine havada kurutmaya bırakıldı. Örnekler hazırlandıktan sonra slayt “MALDI TOF MS (Bruker, Beckman Coulter) cihazına yüklendi ve çalışma başlatıldı. Sonuçlar 1 saat sonra elde edildi. Bu cihazda lazer ışığına maruz kalan metal slayt üzerindeki bakteri ışınları emer ve peptitler iyonize hale dönüşerek vakum borusu içinde dedektöre doğru hareket ederler. Dedektör proteinlerin kütesine bağlı olarak varış hızlarını ölçüp, bakterinin bilgisini oluşturur. Bu bilgi veri tabanındaki bilgi ile karşılaştırılarak tür düzeyinde tanımlama yapılır.

3.2.6. Yarı - Kantitatif Sayım İle Koloni Sayımı

Hastalardan alınan biyopsi örnekleri steril bistüri yardımı ile steril bir Petri kutusu içinde parçalandı. Daha sonara hassas terazide steril edilmiş folyolar içinde her bir örnek 1 g doku olacak şekilde tartıldı. Doku steril çikolatamsı petrilerin 1.ci kadrana steril bir öze yardımı ile iyice yayıldı ve bu bölgeden itibaren azaltma yöntemi uygulanarak 4. kadrana kadar ekildi. 37 °C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda Tablo 1 de belirtilen skorlamaya göre bakteri yoğunluğu saptandı (60-64).

Tablo3.1:Besiyerinde üreyen bakteri yoğunluğunun yarı-kantitatif yöntemle derecelendirmesinde kullanılan skorlar (60-64)

SKOR	Kadranlarda üreyen koloni sayısı			
	1. kadran	2. kadran	3. kadran	4. kadran
1+ (Seyrek üreme, 10^2 - 10^3 CFU/g)	<10	-	-	-
2+ (Hafif üreme, 10^3 - 10^4 CFU/g)	<10	<10	-	-
3+ (Orta derecede üreme, 10^4 - 10^6 CFU/g)	>10	>10	>10	-
4+ (Yoğun üreme, 10^7 CFU/g)	>10	>10	>10	>5

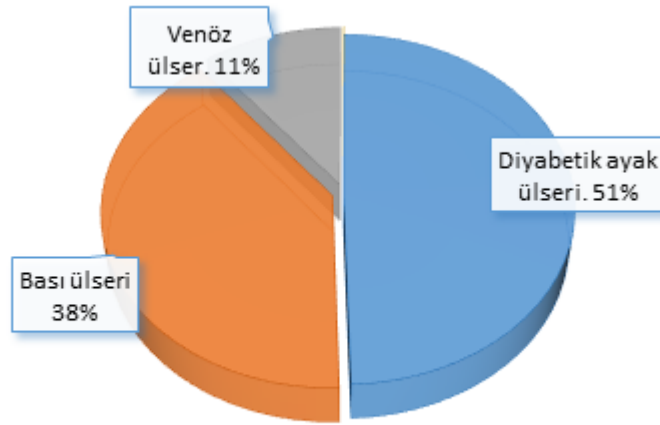
3.2.7.İstatiksel Analiz

Çalışmamızda istatistik programı olarak IBM SPSS versiyon 21 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Analytics, Armonk, New York, USA) kullanıldı. Kategorik veriler sıklık ve yüzdelere sürekli veriler ise ortalama ve standart hata değerleriyle tanımlandı. Kategorik verilerin birbirleri ile karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı. $P < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait demografik bilgiler retrospektif olarak incelendiğinde hastaların 57'sinin erkek 43'ünün kadın olduğu erkeklerin yaş ortalamasının 57 ± 3 , kadınların yaş ortalamasının ise 49 ± 2 olduğu belirlenmiştir. Tablo 1

Biyopsilerin alındığı ülserli yaralar incelendiğinde 51'inin diyabetik ayak ülseri, 38'inin bası (dekübitüs) ülseri 11'inin venöz ülser olduğu saptanmıştır. Şekil.4.1



Şekil 4.1. Ülserli yara örneklerinin dağılımı

Hastalarda başta diyabet (85/100) olmak üzere venöz yetmezlik (11/100), hipertansiyon (55/100) ve osteomyelit (4/100) şeklinde kronik hastalıklar olduğu belirlendi. Diyabetik ayak ülserlerinin ayak parmaklarında ve bacaklarda, bası ülserlerinin sakral bölgede ve topuklarda, venöz ülserlerin ise bacaklarda olduğu gözlemlendi. Tablo 4.1

Bu hastalardan larva debridman tedavisi uygulanmadan önce alınan biyopsi örneklerinde üreyen bakteri yoğunluğu yarı kantitatif sayımla değerlendirildiğinde toplam 100 adet biyopsinin 59'unda (%59) (4+) üreme 27'sinde (%27) (3+) üreme 14'ünde (%14) ise (2+) üreme olduğu gözlemlendi. Tablo 4.2

Bu üreme yoğunlukları diyabetik ayak yarasına ait 51 biyopsi örneğinin 31'inde (4+) 13'ünde (3+) 7'sinde (2+) yoğunlukta, bası ülserine ait 38 biyopsi örneğinin 22'sinde (4+) 11'inde (3+) 5'inde (2+) yoğunlukta, venöz ülserine ait 11 biyopsi örneğinin 6'sında (4+) 3'ünde (3+) 2'sinde (2+) yoğunlukta idi. Tablo 4.2

Tablo 4.1: Biyopsilerin alındığı hastalara ait bazı demografik ve klinik özellikler

Parametreler	s
Cinsiyet ve Yaş	
Kadın/Erkek, n	43/57
Yaş ortalaması	
Erkek	57 $\pm$ 3
Kadın	49 $\pm$ 2
Altta yatan hastalık	
Diyabet	85
Venöz yetmezlik	11
Hipertansiyon	55
Yara Tipi	
Diyabetik yara	51
Bası ülseri	38
Venöz ülser	11
Yara yeri	
Ayak parmağı	43
Topuk	20
Sakral bölge	18
Bacak	19

Üçüncü kez uygulanan LDT sonrası yaralardan alınan biyopsiler tekrar değerlendirildiğinde üreme yoğunluğu 51 diyabetik ayak yarasına ait biyopsi örneklerinin 18'inde (4+) 8'inde (3+) 3'ünde (2+) 22 sinde (1+) yoğunlukta idi. Tablo 3

Üreme yoğunluğu 38 bası ülserine ait biyopsi örneğinin 15'inde (4+) 5'inde (3+) 5'inde (2+), 13'ünde (1+) yoğunlukta, venöz ülserine ait 11 biyopsi örneğinin 6'sında (4+) 1'inde (3+) 4'ünde (2+) yoğunlukta idi. Tablo 3

Biyopsi örneklerinden elde edilen veriler üreme yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Diyabetik ayak ülserlerinde 3. LDT sonrası 4+ üreme görülen biyopsi sayısının anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), 1+ üreme görülen biyopsi sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$), 3+ ve 2+ üreme görülen biyopsi sayısının gruplar arasında anlamlı düzeyde fark göstermediği ($p > 0.05$) saptanmıştır. Tablo 3

Bası ülserlerinde 3. LDT sonrası 3+ üreme gösteren biyopsi sayısının anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), 1+ üreme gösteren biyopsi sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$) 4+ ve 2+ üreme gösteren biyopsi sayısının gruplar arasında anlamlı düzeyde fark göstermediği ($p > 0.05$) saptanmıştır. Tablo 3

Venöz ülserlerde LDT öncesi ve 3. LDT sonrası 1+, 2+, 3+ ve 4+ üreme gösteren biyopsi sayısında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Tablo 3

Tüm biyopsi örnekleri bir arada değerlendirildiğinde 3. LDT sonrası 4+ üreyen biyopsi sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), 1+ üreyen biyopsi sayısının ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$), 3+ ve 2+ üreme gösteren biyopsi sayısının gruplar arasında anlamlı düzeyde fark göstermediği ($p > 0.05$) saptanmıştır. Tablo 3

Çalışmamızda örneklerin alındığı bölgeden LDT uygulama öncesi ve 3 LDT uygulaması sonrası üretilen bakteriler belirlenmiş ön tanıları konvansiyonel yöntemlerle yapılmış ve kesin tanı MALDI-TOF ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 3

Biyopsi örneklerinden elde edilen veriler üreme yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Diyabetik ayak ülserlerinde 3. LDT sonrası 4+ üreme görülen biyopsi sayısının anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$), 1+ üreme görülen biyopsi sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı ($p <$

0.05), 3+ ve 2 + üreme görülen biyopsi sayısının gruplar arasında anlamlı düzeyde fark göstermediği ($p>0.05$) saptanmıştır. Tablo 3

Bası ülserlerinde 3. LDT sonrası 3+ üreme gösteren biyopsi sayısının anlamlı düzeyde azaldığı ($p< 0.05$), 1+ üreme gösteren biyopsi sayısının ise anlamlı düzeyde arttığı ($p< 0.05$) 4+ ve 2+ üreme gösteren biyopsi sayısının gruplar arasında anlamlı düzeyde fark göstermediği ($p>0.05$) saptanmıştır. Tablo 4.2

Tablo 4.2: Biyopsilerde LDT öncesi ve 3.LDT sonrası semi-kantitatif yöntemle saptanan bakteri yoğunlukları

Biyopsi örnekleri	LDT öncesi bakteri yoğunluğu				3.LDT sonrası bakteri yoğunluğu				P			
	4+	3+	2+	1+	4+	3+	2+	1+	4+	3+	2+	1+
Diyabetik ayak ülseri LDTÖ n:51 LDTS n:51	31	13	7	0	18	8	3	22	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05
Bası ülseri LDTÖ n:38 LDTS n:38	22	11	5	0	15	5	5	13	> 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05
Venöz ülser LDTÖ n:11 LDTS n:11	6	3	2	0	6	1	4	0	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Toplam	59	27	14	0	39	14	12	35	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

Venöz ülserlerde LDT öncesi ve 3. LDT sonrası 1+, 2+, 3+ ve 4 + üreme gösteren biyopsi sayısında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Tablo 4.2

Tüm biyopsi örnekleri bir arada değerlendirildiğinde 3. LDT sonrası 4+ üreyen biyopsi sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p< 0.05$), 1+ üreyen biyopsi sayısının ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p< 0.05$), 3+ ve 2 + üreme gösteren biyopsi sayısının LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Tablo 4.2

Çalışmamızda örneklerin alındığı bölgeden LDT uygulama öncesi ve 3 LDT uygulaması sonrası üretilen bakteriler belirlenmiş ön tanıları konvansiyonel yöntemlerle yapılmış ve kesin tanı MALDI-TOF ile gerçekleştirilmiştir.

Diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler değerlendirildiğinde;

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin sırasıyla *S. epidermidis* (%74,5), *S. agalactiae* (%56,9) ve *C. striatum* (%54,9) olduğu gözlenmiştir. Bunları *S. pyogenes* (%25,5), *S. haemolyticus* (%21,6), *E. faecalis* (%19,6) *S. hominis* (%15,7), MRSA (%15,7) ve *Arcanobacter haemolyticum* (%13,7) izlemiştir. Tablo 4.3, Şekil 4.2

3. LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin sırasıyla *S. epidermidis* (%98), *C. striatum* (% 45,1), *S. agalactiae* (%31,4) ve *S. virridans* (%23,5) olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.3 ,Şekil 4.3

Diyabetik ayak ülserlerinde LDT öncesi üreyen bakterilerin oranları 3. LDT sonrası üreyenlerin oranları ile karşılaştırıldığında LDT öncesi üreyen *S. pyogenes* ve *S. agalactiae* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu ($p<0.05$), buna karşın 3. LDT sonrası üreyen *S. epidermidis* ve *S. virridans* oranlarında ise LDT öncesi üreme oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı dercede artma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Diğer Gram pozitif bakterilerin LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır.

Diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram negatif bakteriler değerlendirildiğinde, yalnız Gram negatif çomakların ürettiği Gram negatif diplokokların üremediği görülmüştür.

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların sırasıyla *P. aeruginosa* (%54,9), *P. mirabilis* (%43,1), *E. coli* (%35,3), *P. vulgaris* (%31,4) ve *M. morganii* (%23,5) olduğu görülmüştür. Tablo 4.4 Şekil 4.4,

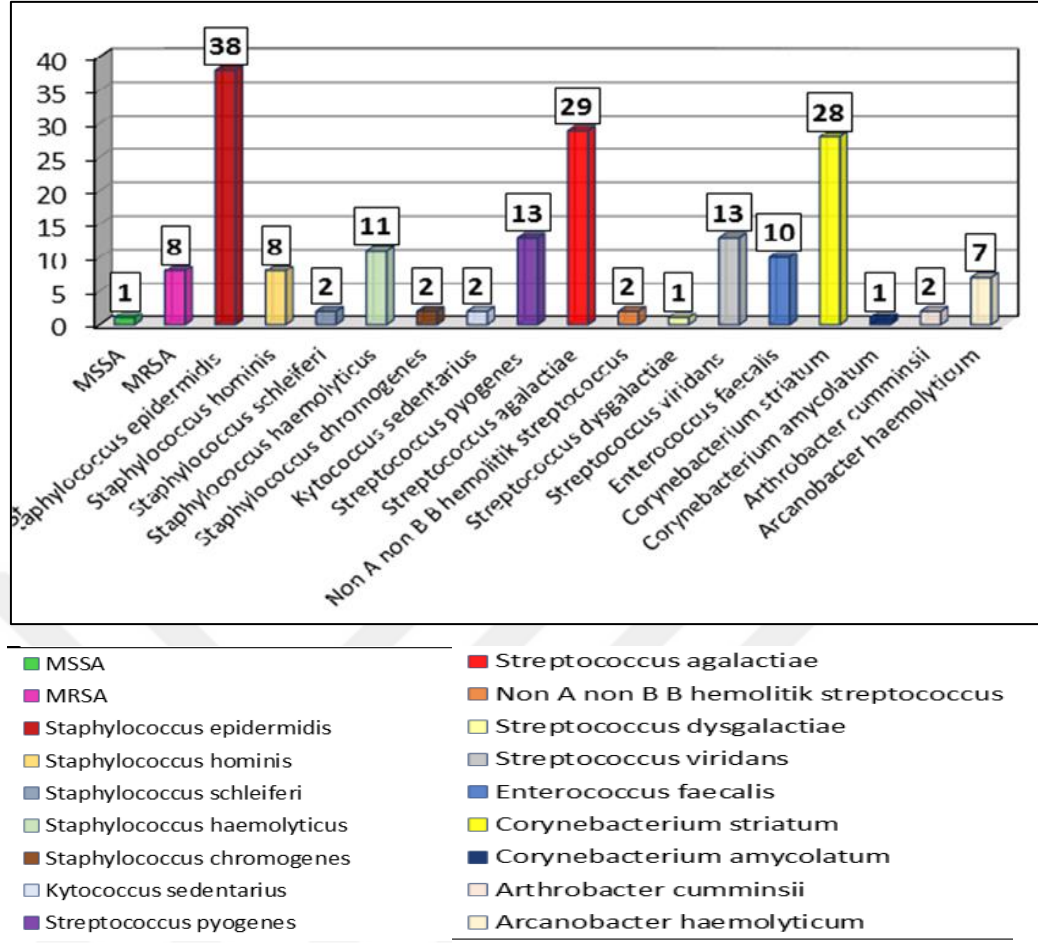
3.LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların sırasıyla, *P. aeruginosa* (%43,1), *P. mirabilis* (%31,4), *E. coli* (%21,6) ve *P. vulgaris* (%21,6) olduğu saptanmıştır . Tablo 4.4 Şekil 4.5

LDT öncesi üreyen *Enterobacter cloacae* ve *Morganella morganii* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Diğer Gram negatif bakterilerin LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Tablo 4.4

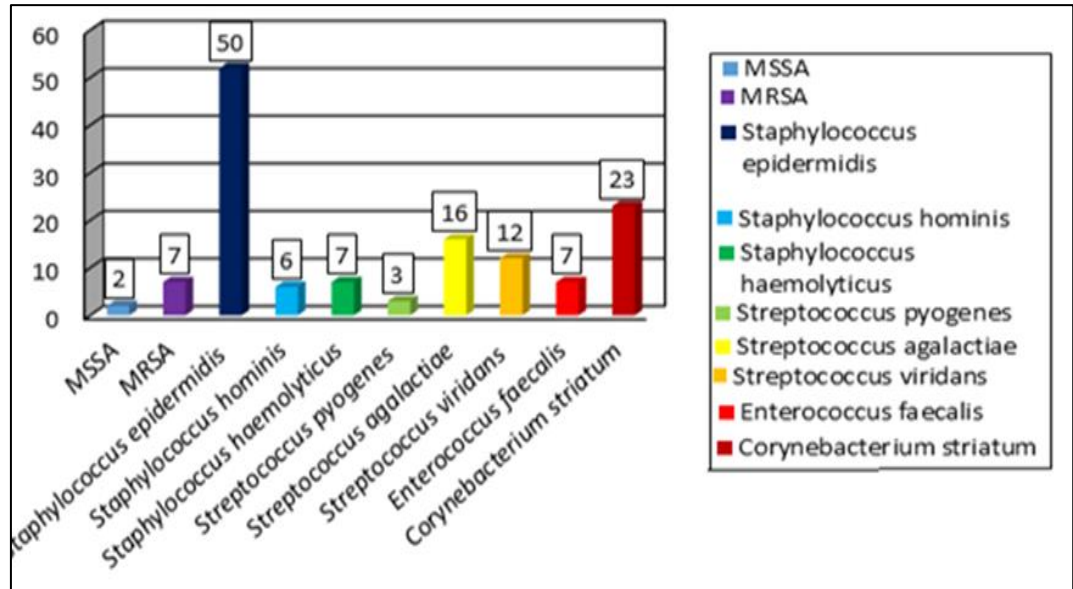
Tablo 4.3: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde Gram pozitif bakterilerin dağılımı

Gram pozitif bakteriler	Diyabetik ayak ülseri. LDTÖ n:51 LDTS n:51		
Gram pozitif diplokoklar			
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	P
MSSA	1(2)	2(3,92)	>0.05
MRSA	8(15,7)	7(13,7)	>0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	38(74.5)	50(98)	<0.05
<i>Staphylococcus hominis</i>	8(15,7)	6(11,8)	>0.05
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	2(3,92)	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	11(21,6)	7(13,7)	>0.05
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2(3,92)	-	-
<i>Kytococcus sedentarius</i>	2(3,92)	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	13(25,5)	3(5,9)	<0.05
<i>Streptococcus agalactiae</i> .(B grubu streptokoklar)	29(57)	16(31,4)	<0.05
Non A non B Beta hemolitik streptococcus	2(3,92)	-	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1(2)	-	-
<i>Streptococcus viridans</i>	3(5,9)	12(23,5)	<0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	10(19,6)	7(13,7)	>0.05
Gram pozitif çomaklar			
<i>Corynebacterium striatum</i>	28(55)	23(45,1)	>0.05
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1(2)	-	-
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	2(4)	-	--
<i>Arcanobacter haemolyticum</i>	7(13,7)	-	-

MSSA: Metisilin duyarlı S.aureus, MRSA: Metisilin dirençli S.aureus, KNS: Koagülaz negatif stafilokok.
LDT: Larva Debridman Tedavisi



Şekil 4.2: LDT öncesi diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler

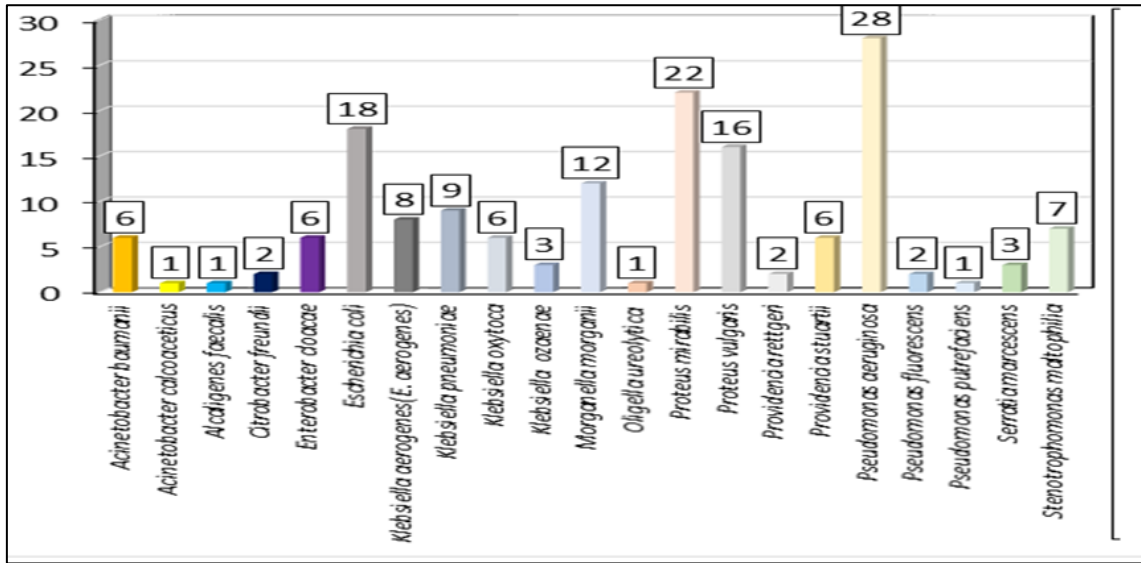


Şekil.4.3: 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler

Tablo 4.4: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde Gram negatif çomakların dağılımı

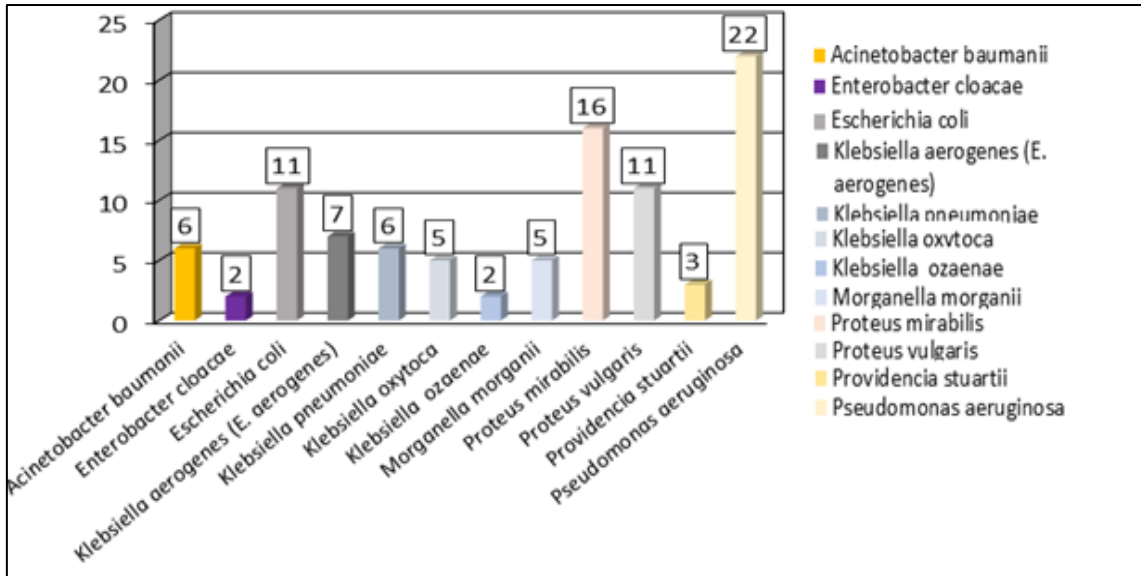
Gram negatif çomaklar	Diyabetik ayak ülseri. LDTÖ n:51 LDTS n:51		
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	P
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6(11,8)	6(11,8)	>0.05
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1(2)	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1(2)	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2(3,92)	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	6(11,8)	2(3,92)	<0.05
<i>Escherichia coli</i>	18(35,3)	11(21,6)	>0.05
<i>Klebsiella aerogenes</i> (Eski: <i>E.aerogenes</i>)	8(15,7)	7(13,7)	>0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9(17,6)	6(11,8)	>0.05
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6(11,8)	5(9,8)	>0.05
<i>Klebsiella ozaenae</i>	3(5,9)	2(3,92)	>0.05
<i>Morganella morganii</i>	12(23,5)	5(9,8)	<0.05
<i>Oligella ureolytica</i>	1(2)	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	22(43,1)	16(31,4)	>0.05
<i>Proteus vulgaris</i>	16(31,4)	11(21,6)	>0.05
<i>Providencia rettgeri</i>	2(3,92)	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	6(11,8)	3(5,9)	>0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28(54,9)	22(43,1)	>0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2(3,92)	-	-
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	1(2)	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	3(5,9)	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	7(13,7)	-	-

LDT:Larva Debridman Tedavisi



- Acinetobacter baumannii
- Acinetobacter calcoaceticus
- Alcaligenes faecalis
- Citrobacter freundii
- Enterobacter cloacae
- Escherichia coli
- Klebsiella aerogenes (E. aerogenes)
- Klebsiella pneumoniae
- Klebsiella oxytoca
- Klebsiella ozaenae
- Morganella morganii
- Oligella ureolytica
- Proteus mirabilis
- Proteus vulgaris
- Providencia rettgeri
- Providencia stuartii
- Pseudomonas aeruginosa
- Pseudomonas fluorescens
- Pseudomonas putrefaciens
- Serratia marcescens
- Stenotrophomonas maltophilia

Şekil 4.4: LDT öncesi diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar



Şekil 4.5: 3.LDT sonrası diyabetik ayak ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar

Bası ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler değerlendirildiğinde;

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin sırasıyla *C. striatum* (% 23.7), *S. agalactiae* (%28.9), *S. pyogenes* (%18.4), *S. haemolyticus* (%18.4) ve *S. epidermidis* (%15.8) olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.5, Şekil 4.6

3. LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin *C. striatum* (% 45.1), *S. epidermidis* (% 21.1) ve *S. haemolyticus* (% 13.2) olduğu saptanmıştır. Tablo 4.5, Şekil 4.7

Bası ülserlerinde LDT öncesi üreyen bakteri oranları 3. LDT sonrası üreyenlerin oranları ile karşılaştırıldığında LDT öncesi üreyen *C. striatum*, *S. pyogenes* ve *S. agalactiae* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Diğer Gram pozitif bakterilerin LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Tablo 4.5

Bası ülserlerinde üreyen Gram negatif bakteriler değerlendirildiğinde yalnız Gram negatif çomakların ürettiği Gram negatif diplokokların üremediği görülmüştür.

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların sırasıyla *P. aeruginosa* (36,8), *P. mirabilis* (%18.4), *P. vulgaris* (%10.5), *K. aerogenes* (%10.5) ve *M. morgani* (%10.5) olduğu görülmüştür. Tablo 4.6, Şekil,4.8

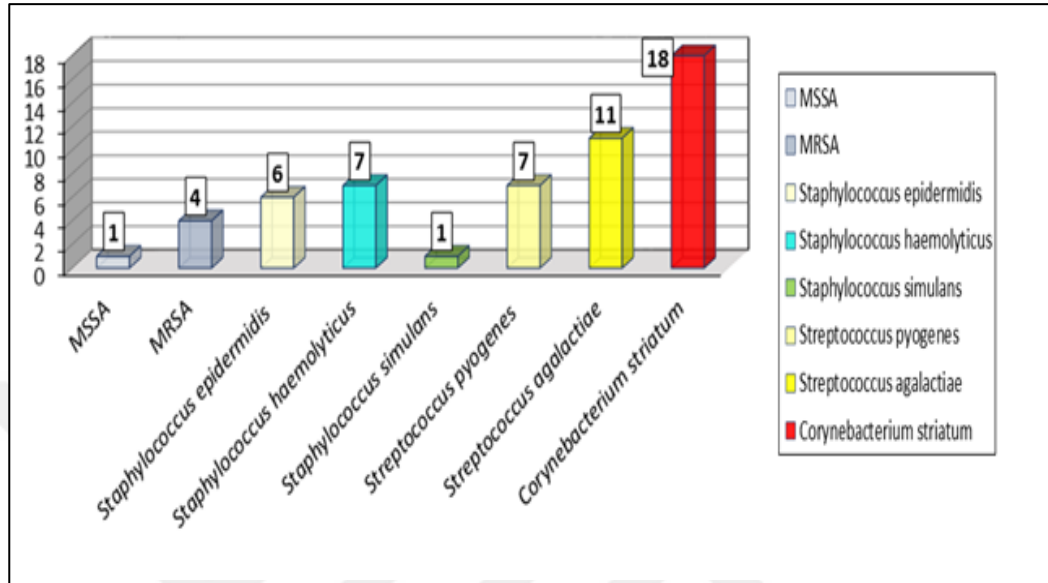
3. LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların sırasıyla, *P. aeruginosa* (%26.5), *P. mirabilis* (%10.3), *K. aerogenes* (%7.9) olduğu saptanmıştır . Tablo 4.6, Şekil 4.9

LDT öncesi üreyen *P. vulgaris* ve *M. morgani* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Diğer Gram negatif bakterilerin LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Tablo 4.6

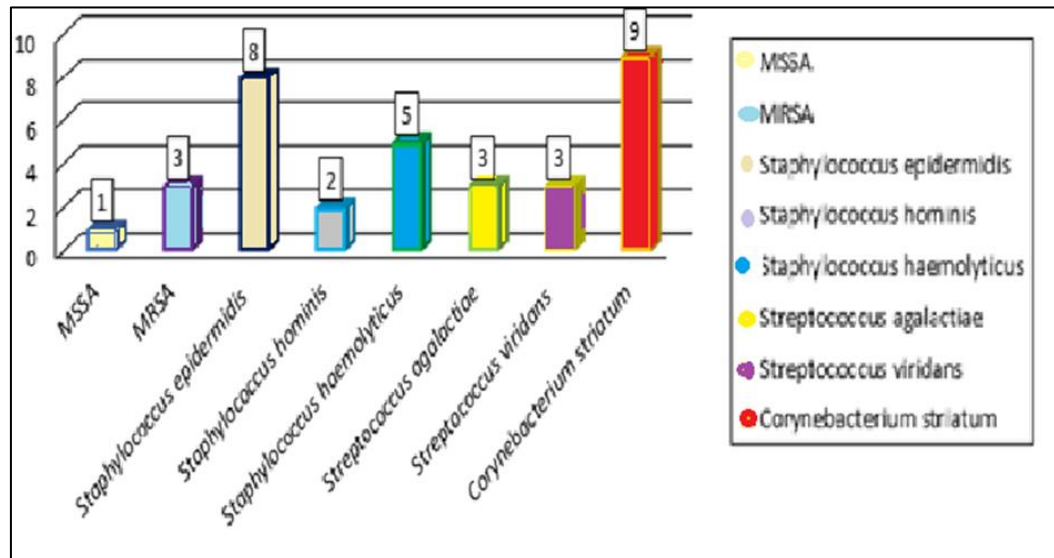
Tablo 4.5:LDT öncesi ve 3.LDT sonrası bası ülserlerinde Gram pozitif bakterilerin dağılımı

Gram pozitif bakteriler	Bası ülseri. LDTÖ n:38 LDTS n:38		
Gram pozitif diplokoklar			
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	p
MSSA	1(2,63)	1(2,63)	>0.05
MRSA	4(10,5)	3(7,9)	>0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6(15,8)	8(21,1)	>0.05
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7(18,4)	5(13,2)	>0.05
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	2(5,3)	>0.05-
<i>Staphylococcus simulans</i>	1(2,63)	0	>0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7(18,4)	0	<0.05
<i>Streptococcus agalactiae. (B grubu streptokoklar)</i>	11(28,9)	3(7,9)	<0.05
<i>Streptococcus viridans</i>	0	3(7,9)	>0.05
Gram pozitif çomaklar			
<i>Corynebacterium striatum</i>	18(47,4)	9(23,7)	<0.05

MSSA: Metisilin duyarlı S.aureus, MRSA: Metisilin dirençli S.aureus, KNS: Koagülaz negatif stafilokok.
LDT: Larva Debridman Tedavisi



Şekil 4.6: LDT öncei bası ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler

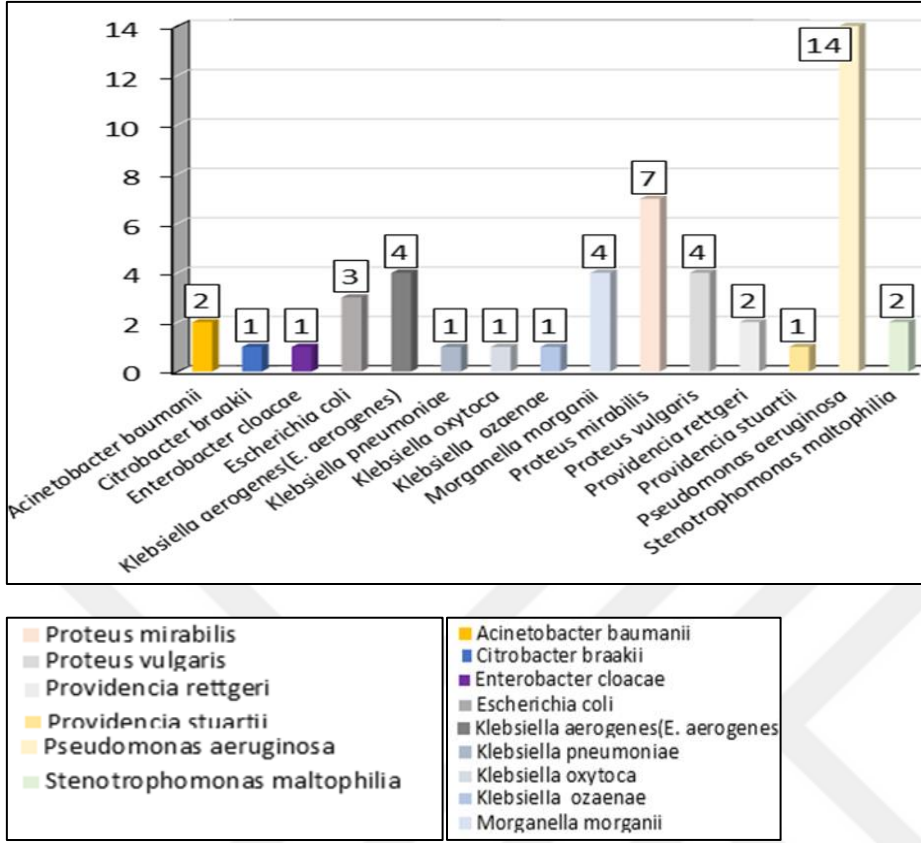


Şekil 4.7: 3.LDT sonrası bası ülserlerinde üreyen Gram pozitif bakteriler

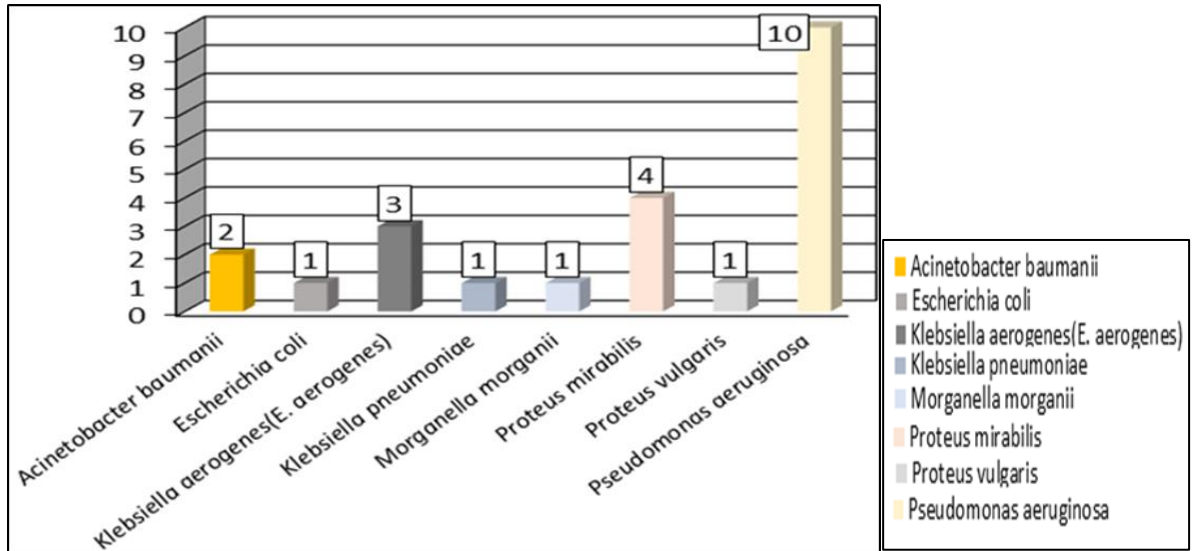
Tablo 4.6: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası bası ülserlerinde Gram negatif çomakların dağılımı

Gram negatif çomaklar	Bası ülseri. LDTÖ n:38 LDTS n:38		
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	P
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2(5,3)	2(5,3)	>0.05
<i>Citrobacter braakii</i>	1(2,6)	0	>0.05
<i>Enterobacter cloacae</i>	1(2,6)	0	>0.05
<i>Escherichia coli</i>	3(7,9)	1(2,6)	>0.05
<i>Klebsiella aerogenes</i> (Eski: <i>E.aerogenes</i>)	4(10,5)	3(7,9)	>0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1(2,6)	1(2,6)	>0.05
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1(2,6)	0	>0.05
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1(2,6)	0	>0.05
<i>Morganella morganii</i>	4(10,5)	1(2,6)	<0.05
<i>Proteus mirabilis</i>	7(18,4)	4(10,5)	>0.05
<i>Proteus vulgaris</i>	4(10,5)	1(2,6)	<0.05
<i>Providencia rettgeri</i>	2(5,3)	0	>0.05
<i>Providencia stuartii</i>	1(2,6)	0	>0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14(36,8)	10(26,3)	>0.05
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2(5,3)	0	>0.05

LDT:Larva Debridman Tedavisi



Şekil 4.8: LDT öncesi bası ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar



Şekil 4.9: LDT sonrası bası ülserlerinde üreyen Gram negatif çomaklar

Venöz ülserlerde üreyen Gram pozitif bakteriler değerlendirildiğinde;

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin sırasıyla *S. epidermidis* (%45,5), *S. Haemolyticus* (%27,3), *S. agalactiae* (%27,3), *C. striatum* (%27,3) olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.7, Şekil 4.10

3. LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram pozitif bakterilerin *S. epidermidis* (%72,7) ve *S. viridans* (%18,2) olduğu saptanmıştır. Tablo 4.7, Şekil 4.11

Venöz ülserlerde LDT öncesi üreyen bakterilerin oranı 3. LDT sonrası üreyenlerin oranı ile karşılaştırıldığında LDT öncesi üreyen *S. haemolyticus* ve *S. agalactiae* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Buna karşın 3. LDT sonrası üreyen *S. epidermidis* oranı ise LDT öncesi üreme oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı dercede artmıştır ($p<0.05$). Diğer Gram pozitif bakterilerin LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Tablo 4.7

Venöz ülserlerde üreyen Gram negatif bakteriler değerlendirildiğinde, yalnız Gram negatif çomakların ürettiği Gram negatif diplokokların üremediği görülmüştür.

LDT öncesi: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların sırasıyla *K. aerogenes* (%45,5), *P. mirabilis* (%27,3) ve *P. Aeruginosa* (%18,2) olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.8, Şekil 4.12

3. LDT sonrası: En yüksek oranda üreyen Gram negatif çomakların *K. aerogenes* (%27,3) ve *P. Aeruginosa* (%18,2) olduğu saptanmıştır. Tablo 4.8, Şekil 4.13

Venöz ülserlerde LDT öncesi üreyen Gram negatif çomakların oranı 3. LDT sonrası üreyenlerin oranı ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

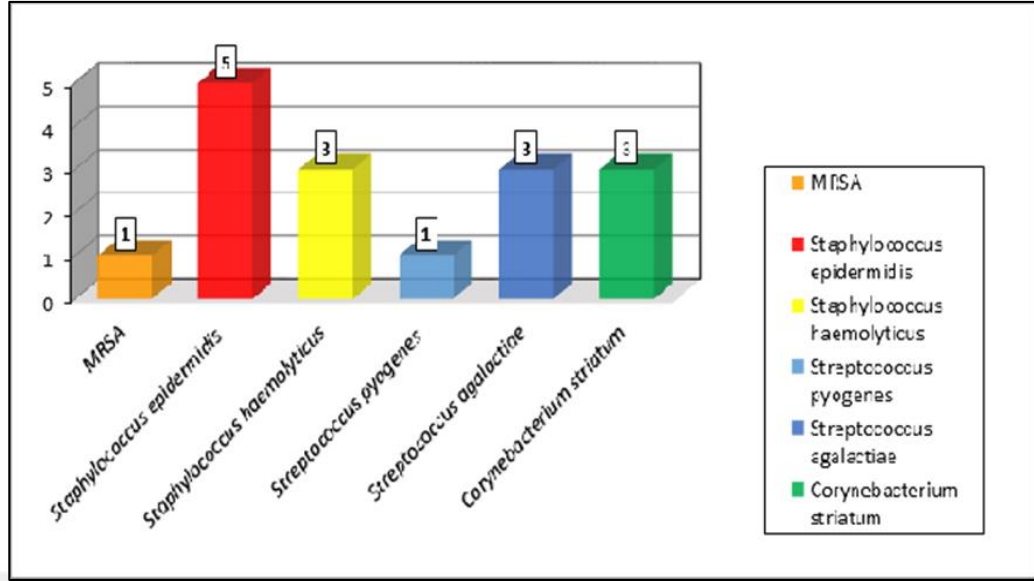
Tablo 4.7:LDT öncesi ve 3.LDT sonrası venöz ülserlerde Gram pozitif bakterilerin dağılımı

Gram pozitif bakteriler	Venöz ülser LDTÖ n:11 LDTS n:11		
Gram pozitif diplokoklar			
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	p
MRSA	1(9,1)	1(9,1)	>0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5(45,5)	8(72.7)	<0.05
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3(27,3)	0	<0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1(9,1)	0	>0.05
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3(27,3)	0	<0.05
<i>Streptococcus viridans</i>	0	2(18,2)	>0.05
Gram pozitif çomaklar			
<i>Corynebacterium striatum</i>	3(27,3)	1(9,1)	<0.05

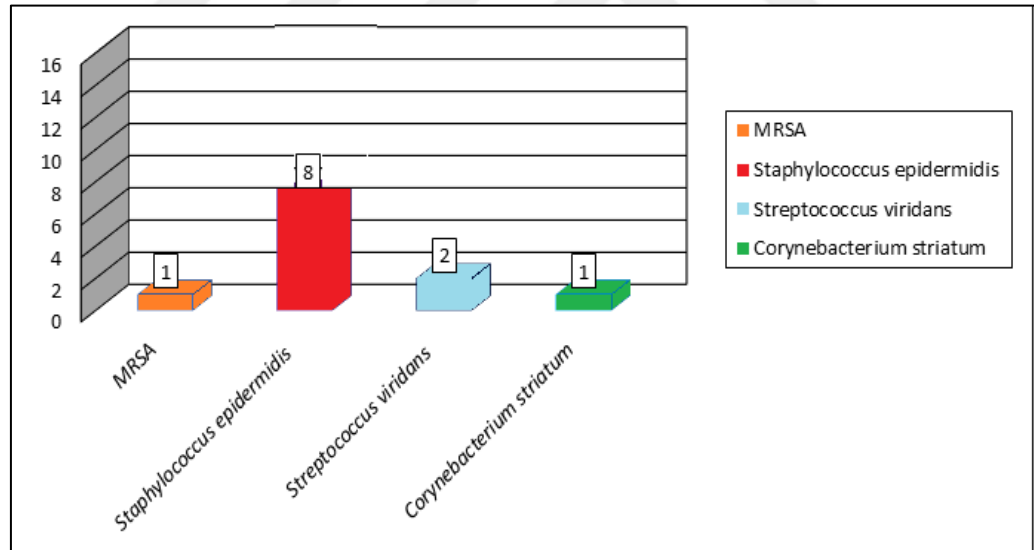
MRSA: Metisilin dirençli S.aureus, LDT: Larva Debridman Tedavisi

Tablo 4.8: LDT öncesi ve 3.LDT sonrası Venöz ülserlerde Gram negatif çomakların dağılımı

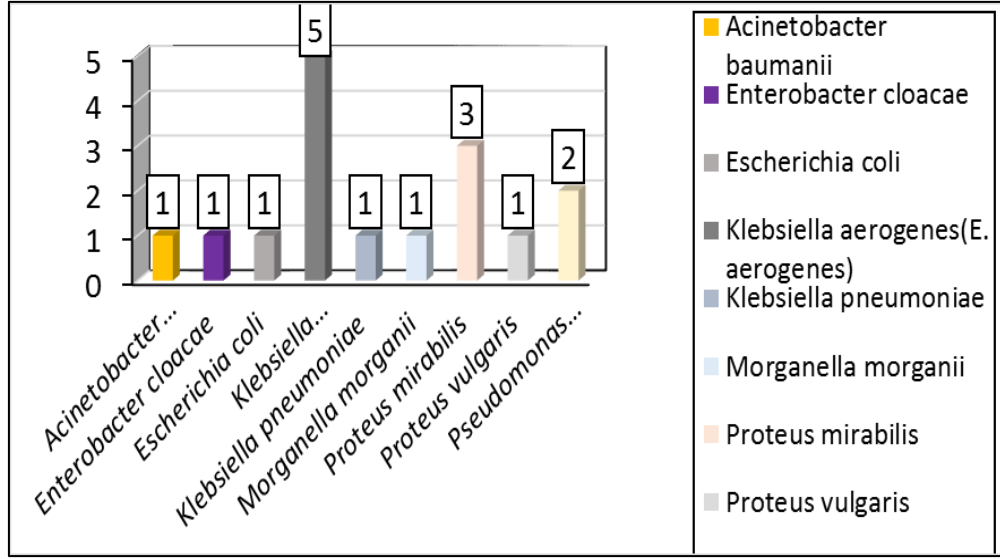
Gram negatif çomaklar	Venöz ülser. LDTÖ n:11 LDTS n:11		
	LDT Öncesi s(%)	3.LDT Sonrası s(%)	p
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1(%9,1)	1(%9,1)	>0.05
<i>Enterobacter cloacae</i>	1(%9,1)	0	>0.05
<i>Escherichia coli</i>	1(%9,1)	0	>0.05
<i>Klebsiella aerogenes</i> (Eski: E.aerogenes)	5(%45,5)	3(%27,3)	>0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1(%9,1)	1(%9,1)	>0.05
<i>Morganella morganii</i>	1(%9,1)	0	>0.05
<i>Proteus mirabilis</i>	3(%27,3)	0	>0.05
<i>Proteus vulgaris</i>	1(%9,1)	0	>0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2(%18,2)	2(%18,2)	>0.05



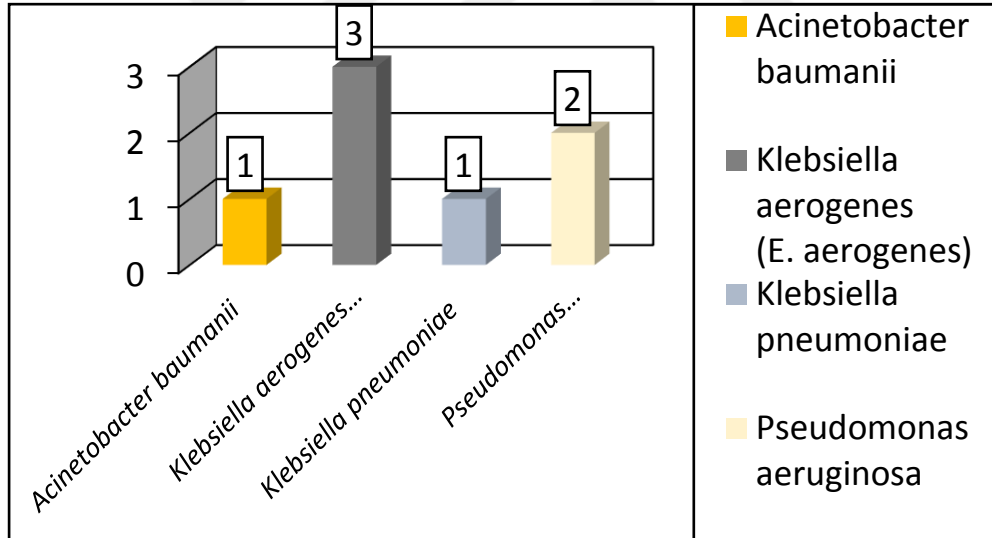
Şekil 4.10: LDT öncesi venöz ülserlerde üreyen Gram pozitif bakteriler



Şekil 4.11: 3.LDT sonrası venöz ülserlerde üreyen Gram pozitif bakteriler



Şekil 4.12: LDT öncesi venöz ülserlerde üreyen Gram negatif bakteriler



Şekil 4.13: 3.LDT sonrası venöz ülserlerde üreyen Gram negatif çomaklar

Tablo 4.9 LDTöncesi ve 3.LDTS sonrası örneklerde Gram pozitif bakterilerin dağılımı

Gram pozitif bakteriler	Tüm yara örnekleri LDTÖ n:100, LDTS n:100 (Diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri, venöz ülserler)		
Gram pozitif diplokoklar			
	LDT Öncesi s %	3.LDT Sonrası s%	P
MSSA	2	3	>0.05
MRSA	13	11	>0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49	66	>0.05
<i>Staphylococcus hominis</i>	8	8	>0.05
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	2	0	>0.05
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0	>0.05
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	21	12	>0.05
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	0	>0.05
<i>Kytococcus sedentarius</i>	2	0	>0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i>	21	3	<0.05
<i>Streptococcus agalactiae</i> .(B grubu streptokoklar)	43	19	<0.05
Non A non B Beta hemolitik streptococcus	2	0	>0.05
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0	>0.05
<i>Streptococcus viridans</i>	3	17	<0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	7	>0.05
Gram pozitif çomaklar			
<i>Corynebacterium striatum</i>	49	53	>0.05
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	0	>0.05
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	2	0	>0.05
<i>Arcanobacter haemolyticum</i>	7	0	>0.05

MSSA: Metisilin duyarlı S.aureus, MRSA: Metisilin dirençli S.aureus, KNS: Koagülaz negatif stafilokok.
LDTÖ:Larva Debridman Tedavisi öncesi, LDTS :Larva Debridman Tedavisi sonrası

Tablo 4.10: LDT öncesi ve 3.LDTS sonrası örneklerde Gram negatif çomakların dağılımı

Gram negatif çomaklar	Tüm yara örnekleri LDTÖ n:100, LDTS n:100 (Diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri, venöz ülserler)		
	LDT Öncesi s %	3.LDT Sonrası s%	P
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	9	>0.05
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0	>0.05
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	>0.05
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	>0.05
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0	>0.05
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	2	<0.05
<i>Escherichia coli</i>	22	12	>0.05
<i>Klebsiella aerogenes</i> (Eski: <i>E.aerogenes</i>)	17	13	>0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	8	>0.05
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	5	>0.05
<i>Klebsiella ozaenae</i>	4	2	>0.05
<i>Morganella morganii</i>	17	6	>0.05
<i>Oligella ureolytica</i>	1	0	>0.05
<i>Proteus mirabilis</i>	32	20	>0.05
<i>Proteus vulgaris</i>	21	12	>0.05
<i>Providencia rettgeri</i>	4	0	>0.05
<i>Providencia stuartii</i>	7	3	>0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44	34	>0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	0	>0.05
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	1	0	>0.05
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	>0.05
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9	0	<0.05

LDTÖ:Larva Debridman Tedavisi öncesi, LDTS :Larva Debridman Tedavisi sonrası

Tüm biyopsi örnekleri yara türüne bakılmaksızın değerlendirildiğinde;

100 hastanın kronik yaralarından LDT öncesi en yüksek oranda üreyen bakterilerin *S. epidermidis* (%49), *C. striatum* (%49), *S. agalactiae* (%43) *P. aruginosa* (%44), *P. mirabilis* (%32), olduğu belirlendi. 3. LDT ardından en yüksek oranda üreyen bakterilerin *S. Epidermidis* (% 66), *C. striatum* (%53), *P. aruginosa* (%34), *P. mirabilis* (%20) olduğu saptandı.

LDT öncesi alınan örneklerde yüksek oranda üreyen *S. Agalactiae* (%43), *E. coli* (%22), *P. vulgaris* (%21), *S. pyogenes* (%21) ve *S. haemolyticus* (%21) oranlarının 3. LDT sonrası belirgin şekilde düştüğü ancak LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

LDT öncesi alınan biyopsi örneklerinde üreyen bakterilerin oranları 3. LDT'yi takiben alınan biyopsilerde üreyen bakterilerin oranları ile karşılaştırıldığında; LDT öncesi üreyen *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *E. cloacae*, *S. multiophilia* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri ve venöz ülserler ayrı ayrı değerlendirildiğinde;

Diyabetik ayak ülserlerinde: LDT öncesi üreyen *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *E. cloacae* ve *M. morgani* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu ($p<0.05$) 3. LDT sonrası üreyen *S. epidermidis* ve *S. virridans* oranlarında ise LDT öncesi üreme oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı dercede artma olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Bası ülserlerinde: LDT öncesi üreyen *C. striatum*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *P. vulgaris* ve *M. morgani* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Venöz ülserlerde: LDT öncesi üreyen *S. haemolyticus* ve *S. agalactiae* oranlarında 3. LDT sonrası istatistiksel olarak anlamlı dercede azalma olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Buna karşın 3. LDT sonrası üreyen *S. epidermidis* oranı ise LDT öncesi üreme oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı dercede artmıştır ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Kronik iyileşmeyen yaralar hastalarda morbidite ve mortalite nedeni olmakla beraber sağlık sistemi için de önemli bir yük teşkil etmektedir. Yara iyileşmesi karmaşık bir olaylar dizisidir ve bu süreçte yara iyileşmesini engelleyen veya önleyen en önemli faktörlerden biri yara enfeksiyonudur (58). Enfeksiyonun kantitatif tanımı, cm^2 başına veya gram doku başına 10^5 bakteri kolonisi varlığı olarak tanımlanmaktadır. Bakteri yükünün gram dokuda 10^6 bakteri kolonisine yükselmesi halinde yara iyileşmesinin geciktiği bildirilmiş ve kronik yaralarda canlı bakteri miktarının tedavi düzenlemesi ve izlenmesinde önem taşıdığı gösterilmiştir (58,60,62,64-66).

Kronikleşen yaraların özellikle diyabet, yüksek tansiyon, dolaşım bozuklukları, obezite gibi sağlık sorunları yaşayan kişilerde görüldüğü ve yarada ülserleşme insidansının yaşa bağlı olarak arteroskleroz gelişmesine neden olan obezite, sigara kullanımı ve diyabet gibi faktörlerin varlığı ile ilişkilendirildiği bildirilmektedir(60-62). Agale ve ark. (67) 2003 yılında, Shukla ve ark (68) 2005 yılında kronik ülserli yaraları kapsayan çalışmalarında hastalarda venöz hipertansiyon, arterial yetersizlik, diyabete bağlı nöropati, bası ülserleri vaskülit ve trauma gibi altta yatan önemli sorunların varlığına işaret etmişlerdir. Ülkemizde Eğribel tarafından kronik yaralarla yapılan tez çalışmasında hastaların büyük bölümünün diyabetli kişilere ait diyabetik ayak yaralarından oluştuğu gösterilmiştir (69). Çavuşoğlu (70) ve ark. 2020 yılında yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların bası yaralarının prevalensini inceledikleri çalışmalarında hipertansiyon ve diyabet mellitusun hastalarda eşlik eden önemli hastalıklar olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hastalarımızda diyabet hipertansiyon ve venöz yetmezlik eşlik eden başlıca hastalıklar olarak görülmüştür. (Tablo4.1)

Vanaja ve Banu (58) 2018 yılında yaptıkları çalışmada kronik yaralara sahip hastaların 73'ünün erkek 23'ünün kadın olduğunu ve yaş ortalamalarının 51-60 arası olduğunu belirtmişlerdir. 60 yaş üstü hastaların %0.6-3 kadarında yaraların kronik ülserlere dönüştüğünü ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hastalarımızın 57'si erkek 43'ü kadın olarak belirlendi. Yaş ortalamaları da benzer şekilde erkeklerde 57 ± 3 , kadınların 49 ± 2 yaşlarında olduğu görüldü.

Doku biyopsileriyle çalışmanın gerçekçi sonuçlar vermesi yanısıra hastalar için invazif bir yöntem olması nedeniyle klinisiyenin kaçındığı bir örnek türüdür. Birçok çalışmada biyopsi

yerine swap ile alınan sürüntü örnekleri tercih edilmiştir. Herawi ve ark. (71) çalışmalarında diyabetik hasta kronik yaralarından eş zamanlı aldıkları sürüntü ve biyopsi örneklerini bakteriyolojik yönden incelemiş ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Elde edilen veriler doğrultusunda sürüntü ve biyopsi örneklerine ait kültür sonuçlarının %62 oranında benzerlik gösterdiğini, biyopsilerden izole edilen bakterilerin ancak %91'inin sürüntülerden izole edilebildiğini, %9'unun atlandığını göstermişlerdir. Doku biyopsileri ile çalışmanın daha gerçekçi sonuçlar vereceği üzerinde durmuşlardır. Biz de araştırmamızı doku biyopsileri ile gerçekleştirdik.

Sürüntü örneklerinde yarı-kantitatif sayımla elde edilen bakteri sayılarının gram dokuda elde edilen bakteri sayılarıyla benzerlik gösterdiği bir çok çalışmada gösterilmiş ve bu şekilde bakteri miktarı belirlenmesinin güvenli bir yöntem olduğu vurgulanmıştır(58-66). Biz de araştırmamızda yarıkantitatif bir yöntemle bakteri yoğunluklarını belirledik.

Larva Debridman tedavisinin dünyada birçok ülkede kullanılan bir yöntem olduğu bilinmektedir. Mumcuoglu ve ark. birçok çalışmada bu yöntemle Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin yaradan tamamen uzaklaştırıldığını ve yaranın düzeldiğini göstermişlerdir (72-77). Ülkemizde ilk defa 2002 yılında askeri bir hastane olan Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde bulunan hastalara bu yöntemin uygulandığı bilinmektedir. Burada tedavi olan hastaların %90'ında larvalar yarayı tamamen debride etmiş ve yeni doku granülasyonunun oluşmaya başladığı gözlenmiştir (78, 79). Hastanemizde ise 2007 yılından itibaren Polat E. tarafından uygulanan bu tedavi ile pek çok enfekte kronik yaranın tedavi edildiği gösterilmiştir (80-83). Tantawi ve ark. (84) LDT gören 10 hastanın 13 diyabetik ayak yara ülserinden aldıkları örneklerle yaptıkları çalışmada, 11 ülserin 7 haftada tamamen iyileştiğini ve LDT uygulamalarını takiben bakteri yoğunluğunun hızlıca 10^5 koloninin altına düştüğünü, bu durumun da yara iyileşmesini kolaylaştırdığını belirtmişlerdir. Tanyürek ve ark. (85) 61 yaşındaki bir diyabetik hastanın iyileşmeyen kronik yarasında *E. fecalis* üretmişler ve LDT ve antibiyotik tedavisi ile hasta dokuda %90 oranında granülasyon gelişimini sağladıklarını, tedavi öncesi kültürde 250.000 CFU/mL olan bakteri konsantrasyonunun tedavi sonrası 13.000 CFU/ml'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Bu bilgilerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da 3. LDT sonrası 4+ üreyen biyopsi sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$) görülmüştür.

Szczepanowski ve ark. (86), 2022 yılında LDT uygulanan 80 diyabetik ayak hastasına ait ülser lezyonlardan tedavi öncesi ve tedavi sonrası aldıkları sürüntü örnekleriyle yaptıkları

bakteriyolojik çalışmada *Corynebacterium* türlerinin, Enterobacterales, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokokların azaldığını buna karşın başta *P. mirabilis* olmak üzere *Proteus* türlerinin arttığını göstermişlerdir. Steenvoordel ve Jukema (87) 27 günlük bir zaman diliminde 7 kez ard arda LDT uygulayarak tedavi ettikleri 16 hastanın yara biyopsilerinde üreyen mikroorganizmaları tedavi öncesi üremelerle karşılaştırmışlardır. Tedavinin Gram negatif bakterilere göre Gram pozitif bakteriler üzerine daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bizim bulgularımıza göre 3. LDT'yi izleyen kültürlerde üreyen Gram pozitif ve Gram negatif bakteri sayıları eşit miktarda azalmıştır. Ülkemizde Bolaban D. (88) LDT neticesinde larva salgılarının MRSA ve MSSA üzerine etkin olduğunu bildirmiştir. Herawi ve ark. (71) 2019 yılında diyabetik ayak ülserlerinde bulunan bakterileri araştırmışlar ve Gram pozitif bakterilerden streptokokların en yüksek oranda bulunduğunu bunu stafilokokların, *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerin, (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, ve *Proteus mirabilis*) *Enterococcus spp.*, *Citrobacter* ve *Fusobacterium* cinslerinin izlediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar streptokoklardan *S. agalactiae* ve *S. pyogenes*'in bu yaralardaki varlığına işaret etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise LDT öncesi *C. striatum* (%49), *S. agalactiae* (%43) *P. aeruginosa* (%44), *P. mirabilis* (%32)'in en sık üreyen etkenler olduğu 3. LDT ardından en yüksek oranda üreyen bakterilerin *S. Epidermidis* (% 66) *C. striatum* (%53), *P. aeruginosa* (%34), *P. mirabilis* (%20) olduğu saptanmıştır. Konvansiyonel yöntemlere göre MALDI-TOF ile çalışmış olmamızın daha doğru sonuçlar elde etmemizi sağladığı kanaatindeyiz.

Bası ülserleri ile yapılmış çalışmalar incelendiğinde, Dana ve Bauman (89) 2014 yılında bası ülserlerinin bakteriyolojisini incelemiş olan 11 adet yayın incelemişler ve *S. aureus* (%11), *P. mirabilis* (%17), *P. aeruginosa* (%11) ve *E. faecalis* (%30)'in bu ülserlerde en sık üretilen bakteriler olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ürettiğimiz *P.mirabilis* oranı bu çalışma sonuçlarıyla uyumuştur ancak *P.aeruginosa*, oranımız daha yüksektir. *S.aureus* oranımız daha düşüktür ve *E. faecalis* hiç izole edilmemiştir. Ayrıca bizim çalışmamızda LDT öncesi en sık izole edilen bakteriler *C. striatum* (% 23.7), *S. agalactiae* (%28.9), *S. pyogenes* (%18.4), *S. haemolyticus* (%18.4), *S. epidermidis* (%15.8), *P. aeruginosa* (36.8), *P. mirabilis* (%18.4) ve *P. vulgaris* (10.5) olarak belirlenmiştir. Ülkemizde Dinçer ve ark. (90) 142 olgunun bası ülserlerinde üreyen bakterileri incelemişler ve en sık üreyen bakterilerin *P. aeruginosa* (%35.9), *A. baumannii* (%33), *E. coli* (% 33.8), *P. mirabilis* (%18), MRSA (%7) ve Enterokoklar (%1) olduğunu belirtmişlerdir. Bizim bulgularımızın özellikle *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, ve MRSA oranları (%10.5) bu çalışma oranları ile örtüşmektedir. Örneklerin alındığı ülserin

durumu, hastanın immün sistemi, bulunduğu ortam (ev veya hastane) ve kullandığı antibiyotikler üreyen bakterilerin çeşidini ve oranlarını etkileyen faktörlerdir. Farklı merkezlere ait bulguların birbirleriyle benzeşmemesi bu durumla ilişkilendirilebilir.

Venöz ülserlerde enfeksiyona neden olan bakterileri araştıran birçok çalışmanın sonuçları incelendiğinde sonuçların birbirleriyle uyumlu olmadığı görülmektedir. Engelberg ve ark. (91) 2018 yılında 285 venöz ülserli hastanın 679 sürüntü örneği ile yaptıkları çalışmada izole ettikleri bakterilerin %76.1'inin Gram pozitif ve % 58.2'sinin Gram negatif bakteriler olduğunu göstermişlerdir. Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve B grubu streptokokların, Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *E. cloacae* nin en yüksek oranda üreyen bakteriler olduğunu belirlemişlerdir. Ülkemizde Aykut ve ark. (92) 2012 yılında 76 hastanın venöz ülserlerinde bulunan bakterileri araştırmışlardır. Ülserlerin %51.2 sinde *S. aureus*, % 23'ünde koliform bakteriler, %12.8'inde *Pseudomonas* spp., %5.3'ünde streptokokların bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla bizim bulgularımız kıyaslandığında sonuçların pek de uyumlu olmadığı dikkat çekmektedir. Ancak sürüntü değil de biyopsi örnekleri ile çalışmış olmamız ve MALDI-TOF ile tanımlama yapmamız sonuçlarımızın güvenli olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda LDT öncesi *S. aureus* ve *S. pyogenes* %9.1, B grubu streptokoklar ise %27 oranında üretilmiş, en sık üreyen Gram pozitif bakteri *S. epidermidis* (%45) olmuştur. Gram negatif bakterilerden ise *K. aerogenes* %45 oranla en sık üretilmiştir. Bunu *P. mirabilis* (%27.3) ve *P. aeruginosa* (%18.2) izlemiştir.

Araştırmamızın en güçlü yönlerinden birisi çalışmanın biyopsi örnekleriyle yapılmış olması dolayısı ile örneklerde saptanan bakterilerin deri mikrobiyotasından kolonize olabilmeye olasılığının uzaklaşmış olmasıdır. Diğer önemli ve güçlü bir yön üreyen bakteri yoğunluklarının canlı bakterilere ait veriler olması ve bakterilerin MALDI TOF MS gibi bakterileri tür düzeyinde %85-%95 oranlarında doğru tanımlayabilen bir hızlı tanı yöntemi ile tanımlanmış olmasıdır. Ancak bu güçlü yönler karşın çalışmamızın sınırlılıkları da bulunmaktadır. Bunlardan birincisi LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreyen bakterilerin oranları kıyaslanmıştır ancak bu bakterilerin ülserlere uygulanan LDT'si süresince varlığını sürdüren aynı bakteri olup olmadığı bilinmemektedir. Bunun için her bir bakterinin gen dizilemesi yapılmalıydı. Diğer bir sınırlılık biyopsilerde üreyen bakterilerin 3. LDT ne kadar izlenmesi ve devam eden tedavi sonucundaki son durumun bilinmemesidir. Ayrıca venöz ülserli olgu sayısının düşük olması ve biyopsi örneklerinde üretilmeyen ya da güç üreyen bakterilerin

çalışma kapsamına alınmamış olması da diğer sınırlılıklardır. Doku biyopsilerinde mikrobiyota analizleri yapılabilseydi daha kapsamlı sonuçlar elde edilmiş olacaktı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1.Ülsere yara biyopsileri ile gerçekleştirilen çalışmamızda özellikle diyabet, venöz yetmezlik hipertansiyon gibi altta yatan önemli hastalıkları olan kişilerde deri mikrobiyota bakterilerinden *S. epidermidis* ve *C. striatum*'un invazyonla derin dokulara ilerleyerek yarayı infekte edebildiği ve genelde biyofilm oluşturma özelliği olan bu bakterilerin yaraların kronikleşmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür.

2.*S. agalactiae* çalışmamızda yüksek oranlarda üretilmiştir. LDT öncesi bu bakterinin oranı biyopsi örneklerinde %43 3. LDT sonrası ise % 19'dur ve 3. LDT sonucunda biyopsilerde bulunma oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Bu bakterinin yara infeksiyonlarındaki rolü hakkında daha çok çalışma yapılması yararlı olacaktır.

3. *S. pyogenes*, *E. cloacae*, *S. maltophilia* gibi önemli patojenlerin biyopsilerde bulunma oranı 3.LDT sonucunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$).

4.*P. aeruginosa* ve *P. mirabilis*'in LDT ile diğer bakterilere göre daha zor eredike edilebilen bakteriler olduğu anlaşılmıştır. 3. LDT'de oranları azalmıştır ancak daha uzun süreli LDT'deki durumları izlenmelidir.

5 Tüm yara biyopsileri dikkate alındığında 3. LDT sonrası 4+ üreyen biyopsi sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). 1+ üreyen biyopsi sayısının ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ($p<0.05$), 3+ ve 2 + üreme gösteren biyopsi sayısının LDT öncesi ve 3. LDT sonrası üreme oranları arasında anlamlı düzeyde fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

LDT'nin yarayı iyileştirme ve infeksiyon etkenini yok etme yönünde son derece olumlu etkisi olduğu görülmektedir. Larva salgıları ile antibiyofilm etkinliği olan yeni moleküllerin geliştirilmesi insan sağlığı açısından büyük yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Altındaş, Yara - Açık Yara, Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri., s. 81-88, 2001.
2. Polat, Çakan, İpek, T. Larva Debridman Tedavisi. Turk Aile Hek Derg. 14(4): 188-191,2010.
3. Bowler, Duerden, Armstrong, Wound microbiology and associated approaches to wound management, Clin Microbiol Rev.,14(2), 244-269, 2001.
4. Pechter, Sherman, Maggot therapy: the surgical metamorphosis, Plast Reconstr Surg., 72, 567-570, 1983.
5. Sherman, Hall, Thomas, Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions, Annu Rev Entomol., 45, 55- 81, 2000.
6. Whitaker, Twine, Whitaker, Welck, Brown, Shandall, Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential, Postgrad Med J., 83, 409–413, 2007.
7. Chernin, Surgical maggots, South Med J., 79, 1143-1145, 1986.
8. Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly) J Bone Joint Surg Am. 1931;13: 438–475.
9. Preuss, Stenzel, Esriti, The successful use of maggots in necrotizing fasciitis of the neck: a case report, Head Neck., 26(8), 747- 750, 2004.
10. Graner,Livin gston The maggot therapy of wounds, Mil Med., 162(4), 296-300, 1997.19.
11. Wollina, Katre, Herold, Looks, Biosurgery in wound healing--the renaissance of maggot therapy, J Eur Acad Dermatol Venereol., 14(4), 285-289, 2000.
12. Mumcuoglu, Clinical applications for maggots in wound care, Am J Clin Dermatol., 2(4), 219-227, 2001.
13. Sherman, A new dressing design for use with maggot therapy, Plast Reconstr Surg., 100, 451-456, 1997.

14. Tanyuksel, et al. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey, *Dermatology.*, 210(2), 115-118, 2005.
15. Teich, Myers, R. A. M., Maggot therapy for severe skin infections, *South Med J.*, 79, 1153-1155, 1986.
16. Attinger, Janis, Steinberg, et al., Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants, *Plast Reconstr Surg.*, 117(7 Suppl), 72S-109S, 2006.
17. Robinson, Norwood, The role of surgical maggots in the dissection of osteomyelitis and other infected wounds, *Journal of Bone and Joint Surgery.*, 15, 409-412, 1933.
18. Bexfield, Elisabeth Bond, Roberts, Dudley, Nigam, Thomas, Newton, R.P., Ratcliffe NA. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infection.* 10(4):325- 33, 2008.
19. Huberman, Gollop, Mumcuoglu, Ket al., Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*, *Med Vet Entomol.*, 21(2), 127-131, 2007.
20. Mumcuoglu, Miller, Mumcuoglu, et al., Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), *J Med Entomol.*, 38(2), 161-166, 2001
21. Cerovski. Zdarek. Fucik. Mo nincova .Voburka Bem. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci.* 67(3):455-66. 2010 .
22. Kerridge, Lappin-Scott, Stevens, Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*, *Med Vet Entomol.*, 19(3), 333-337, 2005.
23. Plas, Jukema, Wai, et al., Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother.*, 61(1), 117-122, 2008.
24. Cazander, van Veen, Bouwman, et al., The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials, *Clin Orthop Relat Res.*, 467(2), 536-545, 2009.
25. Nigam, Bexfield, Thomas, Ratcliffe, Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance, *Evid Based Complement Alternat Med.*, 3(2), 223-227, 2006.
26. Chambers, Woodrow, Brown, et al., Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of nonhealing wounds, *Br J Dermatol.*, 148(1), 14-23, 2003.

27. Donnelly, Wound healing--from poultices to maggots. (a short synopsis of wound healing throughout the ages), *Ulster Med J.*, 67 Suppl 1, 47-51, 1998.
28. Daeschlein, Mumcuoglu, Assadian, O., et al., In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions, *Skin Pharmacol Physiol.*, 20(2), 112-115, 2007.
29. Wollina, Liebold, Schmidt, et al., Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds--clinical data and remittance spectroscopy measurement, *Int J Dermatol.*, 41(10), 635-639, 2002.
30. Prete, Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy, *Life Sci.*, 60(8), 505-510, 1997.
31. Horobin, Shakesheff, Woodrow, et al., Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components, *Br J Dermatol.*, 148(5), 923-933, 2003.
32. Hobson, 1931. On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochem J*, 25: 1458-1463.
33. Senior, Graham , Stevenson , 1998. An investigation into the antibacterial properties of maggots in the healing of chronic necrotic ulcers. Third International Conference on Biotherapy, Jerusalem, Israel, May 24-27, p. 34.
34. Ziffren , Heist , May , Womack , 1957. The secretion of collagenase by maggots and its implication. *Ann Surgery*, 138: 932-934.
35. Simmons, 1935. The bactericidal properties of excretions of the maggot of *Lucilia sericata*. *Bull Entomol Res.*, 26: 559-563.
36. Pavillard, Wright, 1957. An antibiotic from maggots. *Nature*, 152: 916-917.
37. Thomas, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S, 1999. The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J. Tissue Viability*, 9: 127-132.
38. Sherman, Wyle FA, 1996. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics, and schools. *Amer J Trop Med Hyg*, 54: 38-41.
39. Fleischmann, Thoener B, 2000. Biobag - a live wounddressing containing maggots. Fifth International Conference on Biotherapy, Wurzburg, Germany, June 29-July 1, p. 8.

40. Weil, Simon, Sweadner, 1933. Larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Amer J Surgery*, 19: 36-48.
41. Simmons, 1938. The culture of fly larvae for use in maggot therapy. Thesis in Zoology and Entomology. Iowa State College, Ames.
42. Bexfield, Bond, Morgan, et al., Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis, *Br J Dermatol.*, 162(3), 554-562, 2010.
43. Mumcuoglu, Ingber, Gilead, Stessman, Friedmann, Schulman, Bichucher, Ioffe-Uspensky, Miller, Galun, Raz, 1998. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 21: 2030-2031.
44. Sherman, My-Tien Tran, Sullivan, 1996. Maggot therapy for venous stasis ulcers. *Arch Dermatol*, 132: 254-256.
45. Sherman, Wyle, Vulpe, 1996. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *Spinal Cord Med*, 18: 71-74.
46. Onyekwelu, Yakkanti, Protzer, Pinkston, Tucker, Seligson. Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev*. 2017 Jun;1(3):e022.
47. Arıcan, Dokgöz. 2019.Yaralar. *Adli Tıp ve Adli Bilimler*, Halis Dokgöz, Editör, Akademisyen Kitabevi, Ankara, ss.309-335.
48. Leaper, Assadian, Edmiston. Approach to chronic wound infections *Br J Dermatol*. 2015;173(2):351-8.
49. Bowler. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann Med*. 2002; 34(6):419-27.
50. Olivier Gonzales, Costa TF, Araujo Andrede Z, Peixoto Medrado ARA. Wound healing - A literature review. *Anal Brasileiros de Dermatologia*. 2016; 91(5): 614-620.
51. Reinke, Sorg. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*. 2012;49:35-43.
52. Koneman, Allen, Janda, Schereckenberger, Winn. *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology* 6th ed. JH. Philadelphia: *Lippincott*, 2006, 118-165.
53. *Unat Tıp Bakteriyolojisi Ve Virolojisi*. 2.baskı. İstanbul: Dergah Yayınları; 1986.

54. Salles, Saad, Matos D. Chronic Wound Infection: Bacterial Colonization in the Dermal Pericolostomic Region. *Wounds*. 2008 Apr;20(4):107-9.
55. O'HARA CM. Manual and Automated Instrumentation for Identification of *Enterobacteriaceae* and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(1): 147–162.
56. Croxatto , Prod'hom, Greub Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2): 380-407.
57. Wieser, Schneider, Jung, Schubert MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):965-74.
58. Vanaja, Geetha Banu S. Role of semi-quantitative bacteriological culture in management of chronic wound infections. *Indian Journal of Microbiology Research*, 2018;5(3):398-403
59. Terry Swanson, David Keast, Rose Cooper, Joyce Black, Donna Angel, Greg Schultz, Keryln Carville, Jacqui Fletcher. Ten top tips: identification of wound infection in a chronic wound. *Wounds International* 2015;6(2).
60. Bendy, Nuccio, Wolfe, Collins, Tamburro, Glass, and Martin. Relationship of quantitative wound bacterial counts to healing of decubitis. Effect of topical gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1964;10:147-55.
61. Howell-Jones, Wilson, Hill, Howard, Price, Thomas. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wound. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(2):143–149
62. Breidenbach, Trager. Quantitative culture technique and infection in complex wounds of the extremities closed with free flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1995(5):860-65.
63. Bowler, Duerden, Armstrong d.g. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244–69.
64. Thomson, Smith. What is infection?. *Am. Surg*. 1994;167(1A):7S–11S.
65. Lawrence, The bacteriology of burns. *Hosp. Infect* 1985; 6(2):3–17.
66. Johnny Kwei^{1,2,3}, Fenella. Halstead^{1,4}, Janine Dretzke ^{4,5}, Beryl Oppenheim^{1,4} and Naiem S. Moimen¹, Protocol for a systematic review of quantitative burn wound microbiology in the management of burns patients. *Systematic Reviews* (2015) 4:150
67. Agale, Chronic leg ulcers; Epidemiology, Aetiopathogenesis, and Management. *Ulcers* 2013; 2013():
68. Shukla, Anssari, Gupta, Wound healing research; a perspective from India. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2005;4(1):7-8.
69. Eğribel, 2021, Yaralarda Biyofilm İçeren Bakteriler Üzerine *Lucilia Sericata* Larvalarının Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

70. Çavuşoğlu, A.Yeni, İncekara, Acun, Polat, Tülek Z.D.
Bir Yoğun Bakım Ünitesinde Basınç Yarası Prevalansı: Retrospektif Bir Çalışma. JAREN 2020;6(2):203-9.
71. Heravi, Zakrzewski, Vickery,Hu, Bacterial Diversity Of Diabetic Foot Ulcers: Current Status And Future Prospectives.Clin Med. 2019 Nov; 8(11): 1935.
- 72.Mumcuoglu, 2001. Clinical applications for maggots in wound care. Am J Clin Dermatol, 2(4): 219-227.
73. Mumcuoglu, Lipo, Ioffe-Uspensky , Miller, Galun , 1997. Maggot therapy for gangrene and osteomyelitis (in Hebrew). Harefuah, 132: 323-325.
74. Mumcuoglu, Miller, Ioffe-Uspensky, 2000. The potential of maggots to secrete cytokines in vitro. Fifth International Conference on Biotherapy, Wurzburg, Germany, June 73.July 1, p. 14-5.
75. Mumcuoglu, Miller, Mumcuoglu, Friger, Tarshis, 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata*. J Med Entomol, 38(2): 161-166.
76. Mumcuoglu, Ingber, Gilead, Stessman, Friedmann, Schulman, Bichucher, Ioffe-Uspensky , Miller, Galun, Raz, 1998. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. Diabetes Care, 21: 2030-2031.
77. Mumcuoglu, Ingber, Gilead, Stessman, Friedmann, Schulman, Bichucher, Ioffe-Uspensky, Miller, Galun, Raz, 1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. Intl. J. Dermatol, 38: 623-627.
- 78.Tanyuksel, Araz, Dundar, Uzun, Gumus, Alten, Saylam, Taylan-Ozkan, Mumcuoglu, 2005. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. Dermatology, 210: 115-118
79. Tanyuksel, Araz, 2007. Maggot Tedavisi. Özcel, ed. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Meta Basım. p. 883- 889.
80. Polat, Çakan, İpek, Larva debridman tedavisi Türk Aile Hek Derg 2010; 14(4): 188-191.
81. Kecici, Polat, Kutlubay. Efficacy of Maggot Debridement Therapy on Refractory Leg Ulcers of Behçet Disease: An Open-Label Study. Clin. Exp. Dermatol. 2021, 46:834-841.
82. Sirekbasan, Polat, Cangel U.The Effect of Bacterial Colonization and Maggot Debridement Treatment on Wound Healing in Chronic Venous Leg Ulcers. Clin Lab 2021,1:67(5).
83. Polat. Treatment of pressure ulcers with larvae of *Lucilia sericata*. Turkish Journal Of Physical Medicine And Rehabilitation,2017, .63:. 4, .307-312.

84. Tantawi, Gohar, Kotb, Beshara, M M El-Naggar Clinical and microbiological efficacy of MDT in the treatment of diabetic foot ulcers. Wound Care, 2007 ;16(9):379-83.
85. Mehmet Tanyürek, Özgür Kuru Remzi Engin Araz, Hatice Zeynep Güçlü Kilbaş, Şenol Yıldız Rıdvan Alaca, Hakan Aykemal Şimşek, Cemil Yıldızıyüksel Yurttaş, Bahtiyar Demiralpmustafa DeveciBülent A. Beşirbellioğlu. Kronik Yaraların Tedavisinde Steril Lucilia Sericata Larva Uygulamalarıgülnane Tıp Derg 2014;56: 218-222.
86. Szczepanowski, Grabarek, Boroń, Tukiendorf, Kulik-Parobczy, Miszczyk. Microbiological effects in patients with leg ulcers and diabetic foot treated with Lucilia sericata larvae Int Wound. 2022 Jan;19(1):135-143.
87. Steenvoordel, Jukema. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. Journal Of Tissue Viability,2014, 14(3)97-101.
- 88.Bolaban. Lucilia Sericata Larvaları ve Salgılarının Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA) ve Metisiline Duyarlı Staphylococcus Aureus (MSSA) Üzerine Antibakteriyel Etkilerinin İn-Vivo ve İn-Vitro Koşullarda Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı.
89. Dana, Bauman, Bacteriology of pressure ulcers in individuals with spinal cord injury: What we know and what we should know. Spinal Cord Med. 2015 ,38(2):147-60.
- 90.Dincer, Kahveci, Tas, Karakaya. An analysis of the bacteria produced in pressure ulcers and the costs of antibiotherapy for patients in a long-term intensive care unit. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi.2017,24(2)181-186.
91. Engelberg, Dörler, Stücker, Reich-Schupke. Int Wound. 2018 15(6):958-965. Impact of Gram-negative bacteria on the treatment of venous leg ulcers.
92. Aykut, Çetinkol, Albayrak, Güzeloğlu. Venöz Ülserlerde Bakteri Kolonizasyonu ve Antibiyoterapinin Yara İyileşmesine Etkisi.Tepecik Eğitim Hast Derg 2012; 22 (2): 107-110.