

BPA made easy

Wounds International Novembre 2016 www.woundsinternational.com



Introduzione

La sola presenza di batteri nelle ferite croniche potrebbe non essere indice di infezione attiva o di guarigione inadeguata. Le ferite infette contengono batteri, ma potrebbe verificarsi o non verificarsi una reazione dell'ospite. Tuttavia, a un certo punto i batteri iniziano a inibire la guarigione, causando infezioni locali ed eventualmente sistemiche, se non trattate. Questo punto di patogenicità corrisponde al momento in cui i batteri iniziano a secernere proteasi. Questo documento Made Easy tratta il tema dell'attività della proteasi batterica (BPA) come marker oggettivo della patogenicità e mezzo per identificare le ferite che progrediscono verso l'infezione.

Autori: Dr. Thomas Serena, Dr. Paul Chadwick, Prof. Franck Duteille, Prof. Marco Romanelli, Dr. Severin Läuchli, Dr. José Luis Lázaro Martínez. Per i riferimenti completi degli autori a pagina 5.

Box 1 Proteasi dell'ospite: revisione

Sempre di più si riconosce che le cellule ospitanti e le cellule batteriche possono agire sinergicamente e causare la rottura del tessuto nel letto della ferita¹.

I principali gruppi di proteasi coinvolti nella guarigione delle ferite sono le metalloproteinasi della matrice e le proteasi della serina (ad esempio l'elastasi neutrofila umana). Durante la normale guarigione delle ferite, le proteasi rompono le proteine della matrice extracellulare danneggiate e i materiali estranei, consentendo la chiusura della ferita².

L'evidenza ha dimostrato che in alcune ferite croniche le proteasi sono notevolmente elevate; queste proteasi in eccesso - prodotte dalle cellule ospite - danneggiano la matrice extracellulare e degradano i fattori di crescita e i loro recettori².

Box 2 Definizioni utili³

- **Agente patogeno:** microrganismo che provoca o è in grado di provocare la malattia
- **Patogenicità:** capacità di un microrganismo di causare la malattia
- **Virulenza:** Misura quantitativa della probabilità che un agente patogeno provochi la malattia
- **Fattore di virulenza:** molecola prodotta da batteri che facilita la colonizzazione, la replicazione e la diffusione all'interno dell'ospite

Cosa sono le proteasi batteriche?

Le proteasi sono enzimi che agiscono sulle molecole proteiche, disgregandole in peptidi e aminoacidi. Le proteasi batteriche sono fattori di virulenza che vengono secreti da un gran numero di batteri comunemente rilevati sulle ferite croniche, tra cui *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* ed *Enterococcus faecalis*⁴.

In che modo le proteasi batteriche influenzano lo sviluppo dell'infezione?

Le proteasi batteriche degradano le proteine del tessuto ospite, compromettono le difese immunitarie dell'ospite e promuovono la diffusione locale e sistemica dei batteri. Le proteasi batteriche ostacolano la funzione delle cellule immunitarie sopprimendo la chemiotassi, prevenendo la fagocitosi e impedendo la comunicazione delle cellule immunitarie (Figura 1)⁴⁻⁶. Inoltre, le proteasi batteriche possono stimolare la produzione di proteasi umane/dell'ospite mediante attivazione del sistema immunitario (Box 1).

Cos'è il continuum dell'infezione della ferita?

Mentre molte ferite guariscono correttamente nonostante la presenza di batteri, per altre ferite, i batteri possono causare varie complicanze, come ad esempio:

- **Rottura del tessuto**
- **Dolore**
- **Impedimento alla capacità di guarigione della ferita e guarigione ritardata**
- **Complicanze potenzialmente fatali, ad esempio infezione sistemica.**

L'influenza dei batteri in una ferita può essere descritta come un continuum di importanza clinica, (Figura 2), e richiede livelli crescenti di vigilanza o di intervento nel momento in cui la ferita è in stato di patogenicità, infezione locale o infezione sistemica. Le diverse fasi di rilevanza clinica sono determinate dalla patogenicità batterica, nonché dalla risposta dell'ospite e dai segni di infiammazione o danno ai tessuti³.

Quali potrebbero essere le difficoltà da affrontare nella valutazione delle ferite colpite dai batteri?

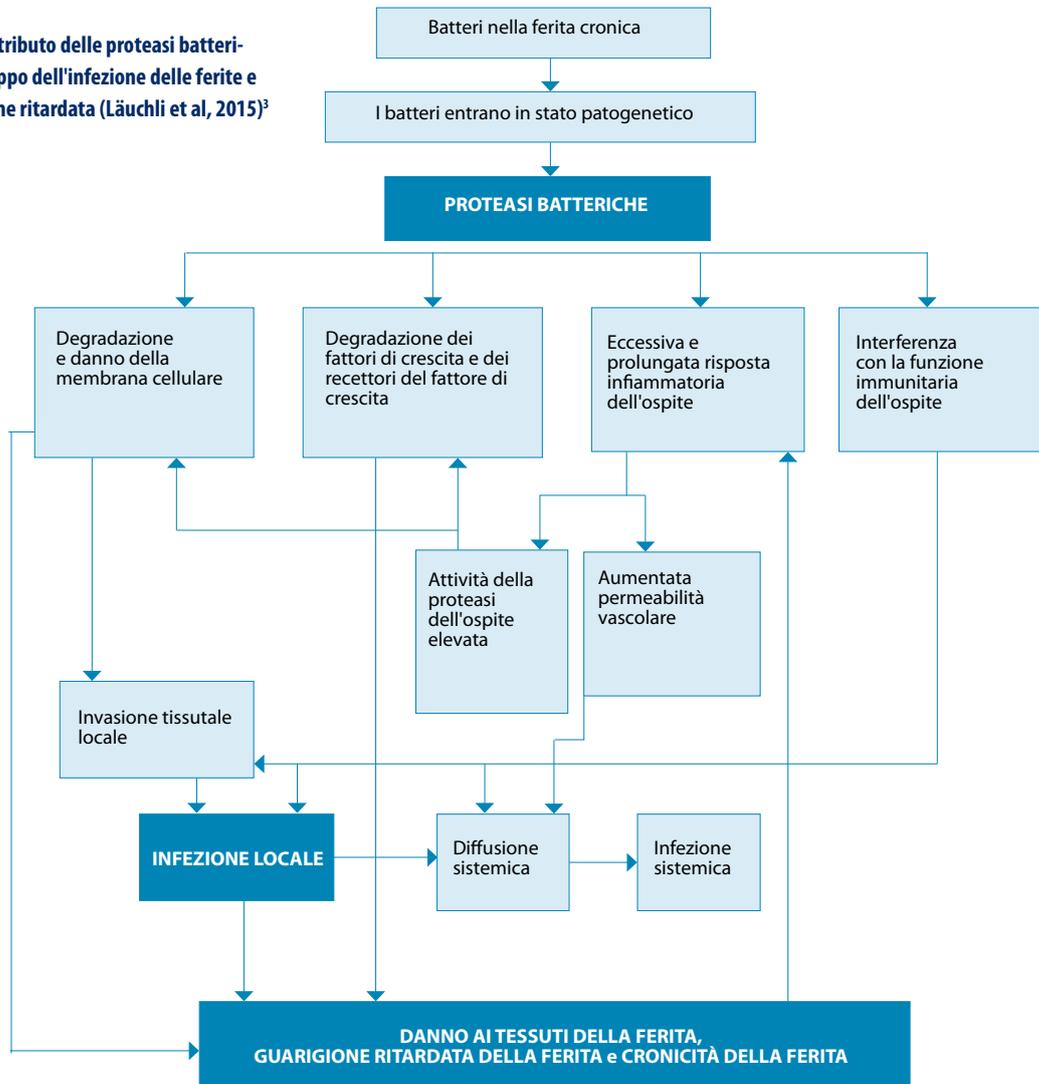
Assenza di segni clinici:

La risposta dell'ospite ai batteri e alle loro proteasi coinvolge spesso marker infiammatori come l'interleuchina-1 beta (IL-1 β) o il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Tuttavia, i tipici segni clinici di infezione potrebbero non essere sempre presenti se la risposta infiammatoria del paziente è indebolita, come nel caso in cui siano presenti comorbidità come il diabete o condizioni immunosoppressive⁷.

BPA made easy



Figura 1: Contributo delle proteasi batteriche allo sviluppo dell'infezione delle ferite e alla guarigione ritardata (Läuchli et al, 2015)³



| Stadi della progressione dell'infezione di ferite croniche | Richiesta sorveglianza | | Richiesto intervento | |
|--|---|--|---|--|
| | Non infettata/Contaminazione | Colonizzazione | Stato di patogenicità | Infezione sistemica |
| <p>Figura 2: Il continuum dell'infezione della ferita nelle ferite croniche (adattato da: Siddiqui e Bernstein, 2010; Collier, 2004; Kingsley et al, 2004; WUWHS, 2008) ⁸⁻¹¹</p> | <p>Presenza di batteri all'interno di una ferita senza reazione dell'ospite</p> | <p>I batteri sono presenti nella ferita e potrebbero moltiplicarsi, ma non inducono una reazione dell'ospite</p> | <p>I batteri si moltiplicano, esprimono proteasi che attaccano il tessuto e ritardano la guarigione; generalmente sono associati ad un'esacerbazione del dolore; una reazione evidente dell'ospite può essere assente o presente.</p> | <p>I batteri si moltiplicano a causa della colonizzazione critica/ infezione locale, ma provocano anche una risposta sistemica dell'ospite, ad esempio ipertensione o ipotermia, tachicardia</p> |

Aumento della patogenicità batterica e dei problemi clinici

Studio 1 Serena et al, 2015 – hanno valutato il rapporto tra il carico biologico totale e i livelli di BPA nelle ferite?

Sono stati prelevati tamponi doppi da 186 ferite croniche. Un tampone è stato testato con il test della proteasi batterica su un prototipo di flusso laterale rapido sul sito di cura, mentre l'altro è stato estratto per il test in un saggio di laboratorio sulla proteasi, utilizzando caseina come substrato, includendo un inibitore di HNE ('iCasein' assay)) per l'analisi delle citochine IL-1 β e TNF- α e per la cultura per la microbiologia quantitativa.

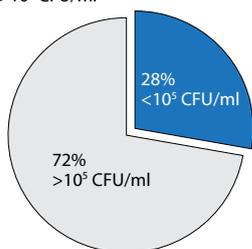
I risultati hanno mostrato che i livelli medi delle citochine proinfiammatorie IL-1 β e TNF- α sono significativamente più elevati nelle ferite con una positività al test BPA, rispetto alle ferite risultate negative alla BPA ($p < 0,0001$ e $p = 0,0002$, rispettivamente). Inoltre, quando l'attività della BPA è stata testata confrontandola con il carico biologico, un numero notevolmente superiore di ferite ha dato risultati positivi su un test rapido BPA del sito di cura quando il carico biologico totale superava 10^5 CFU/ml.

Studio 2 Serena et al, 2015 – hanno valutato il rapporto tra i livelli di BPA, i segni clinici di infezione e il carico biologico della ferita?

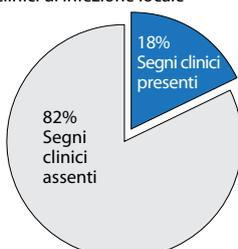
Sono stati prelevati tamponi di liquido della ferita da 366 ferite croniche (comprese ulcere da pressione, ulcere diabetiche del piede, ulcere della gamba e altre ferite non guarite). Questi tamponi sono stati estratti per il test del saggio 'iCasein' e per la valutazione del medico sui segni di infezione, sulla base dell'acronimo 'NERDS' (Non-healing, Exudative, Red and bleeding, Debris, Smell - non guarita, essudativa, rossa e sanguinante, sbrigliamento, odore); la presenza di tre o più 'NERDS' è considerata indicativa di infezione locale [Sibbald et al, 2003]). Quando la soglia di attività di iCasein superava le 125 mUnità/tampone, la ferita era classificata come BPA-positiva. Un altro tampone è stato prelevato per la cultura e la microbiologia quantitativa

Delle ferite testate, il 72% aveva conte batteriche che superavano 10^5 CFU/ml, e indicavano così un elevato carico biologico. Solo una piccola percentuale ha manifestato tre o più segni clinici di infezione (18%). Diversamente dal carico biologico e dei segni clinici, quasi la metà delle ferite risultava positiva al tampone per la BPA (49%): più di tre quarti di queste ferite (77%) non presentava segni locali di infezione. Si sospetta che esse fossero in uno stato patologico, che non aveva ancora progredito in infezione evidente.

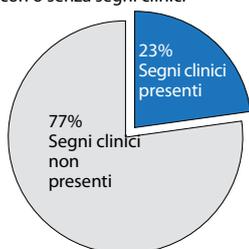
Percentuale di ferite con carico biologico $>10^5$ CFU/ml



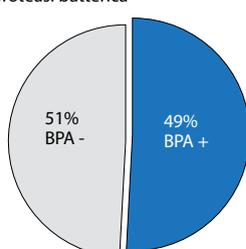
Percentuale di ferite presentanti segni clinici di infezione locale



Percentuale di ferite positive all'attività della proteasi batterica con o senza segni clinici



Percentuale di ferite positive all'attività della proteasi batterica



Difficoltà di interpretazione delle indagini microbiologiche:

Mentre un carico batterico di $>1 \times 10^5$ CFU/ml viene utilizzato tipicamente per la

diagnosi di infezioni da ferite, questa soglia potrebbe non essere appropriata per tutte le ferite; ad esempio al di sotto di questa soglia, la guarigione può essere ritardata

in pazienti con insufficienza immunitaria o se sono coinvolti batteri particolarmente virulenti, mentre altre ferite con un carico batterico biologico al di sopra di questa soglia possono guarire senza intervento. Inoltre, in alcuni casi, gli esami microbiologici possono essere difficili da interpretare, specialmente quando sono presenti batteri multipli. Pertanto, i risultati della cultura non dovrebbero sostituire il giudizio clinico, ma possono essere utilizzati per guidare la scelta della terapia antimicrobica, se appropriato^{12;13}

Infiammazione cronica versus infezione:

Le ferite possono essere coinvolte in un ciclo perpetuo di infiammazione parzialmente attribuibile ai batteri; questo danneggia la matrice extracellulare e degrada i fattori di crescita che stimolano il rilascio dei mediatori infiammatori per innescare una maggiore risposta infiammatoria, danneggiando così ulteriormente il tessuto e ritardando la guarigione. In questo contesto è importante distinguere tra infiammazione e infezione^{14;15}

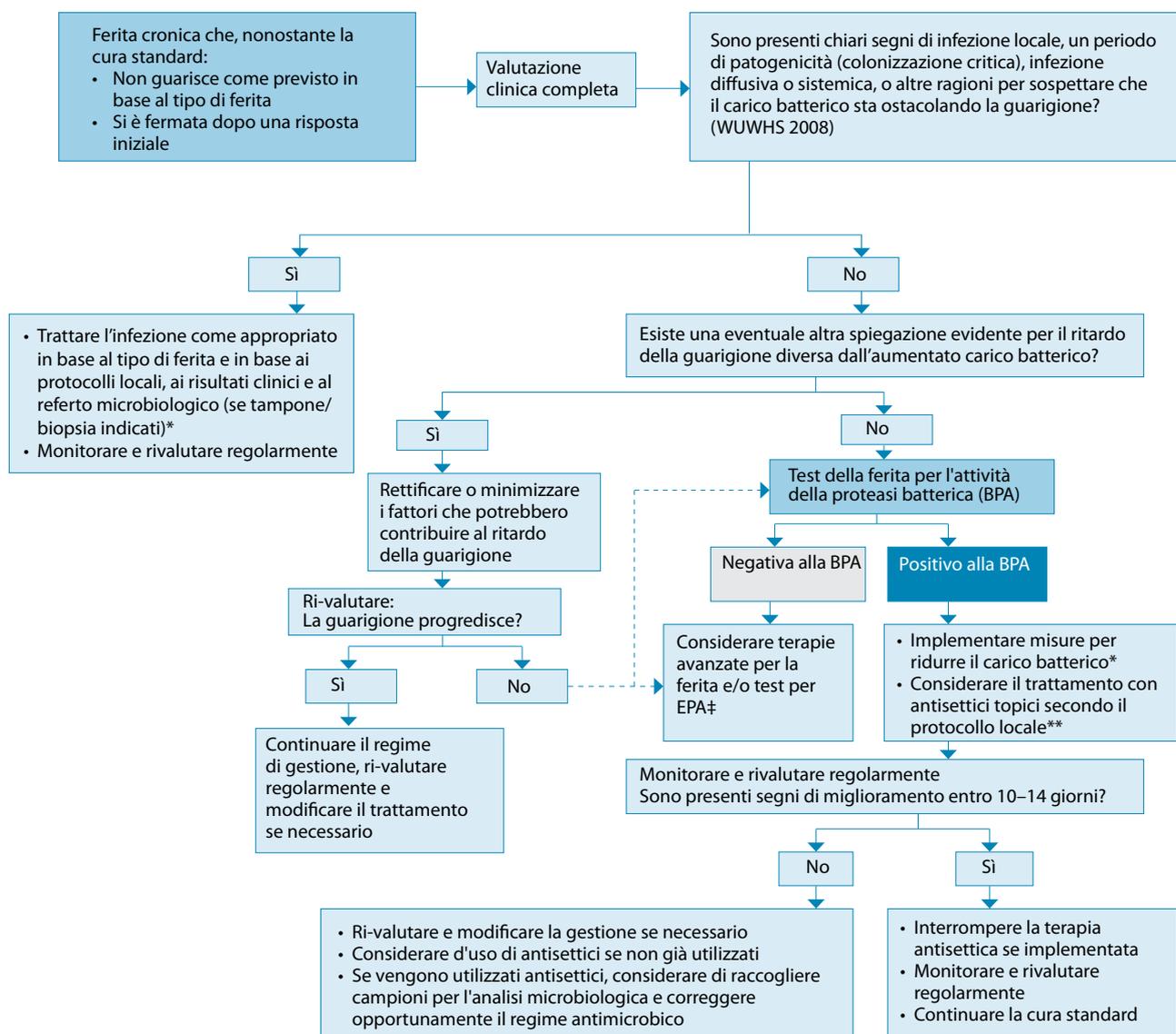
L'attività della proteasi batterica potrebbe essere un marker utile per la patogenicità?

I batteri nelle ferite croniche possono essere patogeni e non patogeni in natura. Un'indicazione della patogenicità dei batteri è l'espressione di fattori di virulenza enzimatici, come le proteasi batteriche che possono stimolare eccessivamente l'infiammazione nell'ospite ed eventualmente danneggiare il tessuto della ferita e impedire una risposta immunologica.

I risultati di due recenti studi condotti da Serena et al (2015)⁷ dimostrano che l'attività della proteasi batterica (BPA) può essere utilizzata come marker per un "periodo di patogenesi" nelle ferite croniche (Studio 1 e Studio 2). Perciò testare il liquido della ferita alla ricerca della BPA potrebbe essere un metodo utile per rilevare i batteri patogeni in grado di causare l'infezione prima della comparsa di segni clinici.

PRODOTTI PER LA PRATICA

Figura 3: Percorso per l'uso del test al sito di cura per l'attività della proteasi batterica (adattato da: Läuchli et al, 2015)³



***Inserire nel piano di gestione:**

- Ottimizzazione della risposta dell'ospite: nutrizione, idratazione, controllo glicemico, perfusione tissutale
- Riduzione del carico batterico: prevenire ulteriore contaminazione o contaminazione incrociata, facilitare il drenaggio della ferita, sbrigliamento della ferita, aumentare la frequenza di cambio della medicazione, pulire la ferita ad ogni cambio di medicazione, gestire l'essudato in eccesso, gestire il cattivo odore, antibiotici topici antisettici +/- sistemici
- Misure generali come gestione dei sintomi, istruire il paziente e l'assistente, ottimizzare la collaborazione del paziente, garantire il supporto psicosociale (WUWHS, 2008)

**Gli antibiotici sistemici sono generalmente riservati a pazienti con infezione diffusiva o sistemica; evitare l'uso di antibiotici topici (WUWHS, 2008)

‡ Se positivo all'attività della proteasi elevata, considerare di inserire interventi di modulazione della proteasi nella gestione (Wounds international, 2011; Dissemond et al, 2013)

NOTA: Alcuni pazienti con una DFU e carico biologico batterico potrebbero non mostrare segni clinici di infezione a causa di condizioni neurologiche, immunologiche o vascolari. In questi casi può essere utile effettuare il test prima di 15 giorni.

Cos'è il test WOUNDCHEK™ Bacterial Status?

WOUNDCHEK™ Bacterial Status* è un test di flusso laterale innovativo per la valutazione qualitativa della BPA direttamente da un tampone di una ferita cronica. WOUNDCHEK™ Bacterial Status è progettato per uso diagnostico, da applicare sul sito di cura come aiuto nella valutazione da parte dell'operatore sanitario o nel caso in cui una ferita non dovesse guarire a causa di una patogenesi batterica come indicato dalla presenza di BPA.

Il test WOUNDCHEK™ Bacterial Status utilizza il liquido della ferita cronica ottenuto dalla ferita, raccolto utilizzando un metodo noto come Serena Technique®, secondo il quale la ferita ripulita viene inumidita con soluzione salina e la superficie viene tamponata con un'azione a rullo fino a che tutta la punta schiumosa del tampone sia ricoperta.¹⁵ Un risultato positivo al test indica la presenza di BPA nella ferita. Questo rilevamento può permettere un intervento clinico precoce allo scopo di evitare che la ferita peggiori in un continuum verso l'infezione clinica più seria o sepsi.

Cosa indicano in pratica i risultati del test WOUNDCHEK™ Bacterial Status?

Poiché la presenza di BPA è indicativa di un'infezione imminente o attiva, il suo rilevamento potrebbe permettere il riconoscimento di batteri che si comportano in modo patologico, anche in assenza di segni clinici di infezione, consentendo il trattamento per ridurre il carico batterico. Un risultato positivo al test BPA segnala al medico la presenza in una ferita di batteri che si comportano in modo patogenetico, e gli consente di stabilire in modo oggettivo se il carico batterico debba essere contrastato anche quando i segni clinici potrebbero non essere immediatamente apparenti

e di intervenire prima dello sviluppo di un'infezione effettiva.

Come si vede nel percorso per l'uso del test della proteasi batterica nel sito di cura illustrato nella [Figura 3](#), il risultato del test consente al medico di migliorare la cura del paziente, attraverso le seguenti misure:

- **Implementare le misure per ridurre il carico batterico della ferita, come ottimizzare la risposta dell'ospite, prevenire un'ulteriore contaminazione della ferita, lo sbrigliamento, aumentare la frequenza dei cambi di medicazione, utilizzare antisettici topici come argento o PHMB**
- **Monitorare e valutare la ferita regolarmente**
- **Continuare la cura standard se appropriato.**

Se la guarigione viene ritardata ma il risultato è negativo e i segni clinici dell'infezione sono assenti, il medico può scegliere un approccio di cura alternativo, come il test per l'attività elevata della proteasi dell'ospite o considerare interventi di modulazione della proteasi.

I batteri presenti nel biofilm possono secernere proteasi e hanno dimostrato di produrli a livelli più elevati rispetto allo stato planctonico¹⁷. Le ferite che risultano positive al test della BPA a possono inoltre contenere un biofilm su almeno parte del letto della ferita¹⁸. Sebbene non sia noto se il test della BPA possa essere utilizzato per indicare la presenza del biofilm, molti dei trattamenti usati per le ferite positive alla BPA sono utilizzati anche per la gestione del biofilm, come le medicazioni barriera, lo sbrigliamento e gli antisettici¹⁹⁻²¹.

Come misura supplementare alle tecniche attuali di valutazione della ferita, che generalmente sono soggettive in natura, l'uso di questo test potrebbe avere un gran numero di benefici sia clinici che economici.

In un'epoca in cui la resistenza agli antibiotici è in aumento, le soluzioni che potrebbero ridurre il loro eccessivo utilizzo e supportare l'uso mirato degli antibiotici sono preziose per il più ampio sistema sanitario³. Infatti, mentre i test diagnostici sono in grado di guidare con successo le decisioni del medico, questo potrebbe metterli in condizione di monitorare il progresso della terapia scelta, ridurre le complicanze a lungo termine (ad esempio perdita dell'arto) e migliorare la qualità di vita del paziente (come la riduzione del dolore).

*Non ancora disponibile in tutti i Paesi

[Il Made Easy è stato supportato da WOUNDCHEK Laboratories. Il contenuto del presente Made Easy non rispecchia necessariamente il punto di vista dell'azienda.](#)

Informazioni sugli autori

Serena T¹, Chadwick P², Duteille F³, Romanelli M⁴, Lächli S⁵, Martínez J⁶,

- 1 **CEO e Direttore Medico, SerenaGroup Inc**
- 2 **Consulente Podologo, Salford Royal Hospital NHS Foundation Trust**
- 3 **Primario di chirurgia della ricostruzione e della plastica cosmetica – Burn Centre, University Hospital, Nantes**
- 4 **Consulente Dermatologo, Unità di ricerca delle lesioni, Dipartimento di Dermatologia, Università di Pisa**
- 5 **Primario di Chirurgia Dermatologica, Ospedale universitario di Zurigo; Presidente, European Wound Management Association**
- 6 **Primario di Unità di piede diabetico, Universidad Complutense de Madrid**

Per citare il presente documento:

Serena T, Chadwick P, Romanelli M, Lächli S, Martínez J. BPA Made Easy Wounds International 2016; 12(4) Disponibile all'indirizzo: <http://www.woundsinternational.com>

USO DEL TEST WOUNDCHek BACTERIAL STATUS: CASISTICA

PREMESSE

Questo paziente presentava un'ulcera diabetica sulla pianta del piede destro. Quando esaminata alla Settimana 1 e alla Settimana 4, la ferita non evidenziava segni di infezione clinica, ma risultava positiva al test della BPA (attività della proteasi batterica) in entrambe le occasioni. Alla Settimana 5, il paziente manifestava numerosi segni di infezione ed era stato trasferito alla chirurgia per l'amputazione. NB: Questo caso faceva parte di un protocollo di studio clinico che richiedeva che il medico curante fosse "in cieco" sui risultati del test BPA fino al completamento dello studio.

Settimana 0:

- Nessun segno clinico di infezione
- Ma il test della ferita indicava positività per la BPA
- Trattamento erogato: medicazione di schiuma di poliuretano e strato di contatto non aderente in silicone

Settimana 4:

- Nessun segno clinico di infezione
- Ma il test della ferita indicava positività per la BPA
- Trattamento erogato: medicazione in fibra gel assorbente

Settimana 5:

- Il paziente era letto con brividi e dolori
- Il piede si era gonfiato ed emanava un odore forte
- Rossore del terzo dito con un'area di arrossamento di 9cm x 8cm sul dorso del piede
- Paziente trasferito alla chirurgia per l'amputazione



Settimana 0



Settimana 4

Bibliografia

1. McCarty S, Cochrane C, Clegg P, et al. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Repair Regen* 2011; 20: 125–36
2. International consensus. *The role of proteases in wound diagnostics. An expert working group review*. London: Wounds International, 2011
3. Lächli S, Swanson T, Serena T, et al. The use of a point-of-care test for bacterial protease activity in chronic wounds *Wounds International* 2015; 6(4): 22–8
4. Koziel J, Potempa J. Protease-armed bacteria in the skin. *Cell Tissue Res* 2013; 351: 325–37
5. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Molec Biol Rev* 1997; 61(2): 139–69
6. Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* 2002; 78: 216–24
7. Serena T, Bayliff S, Brosnan P, et al. *Bacterial proteases: a marker for a 'state of pathogenesis' in chronic wounds*. Poster presented at SAWC, Las Vegas, 2015
8. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; 28: 519–26
9. Collier M. Recognition and management of wound infections. *World Wide Wounds* 2004. Available at: <http://www.worldwidewounds.com/2004/january/Collier/Management-of-Wound-infections.html> (accessed 21.10.16)
10. Kingsley A, White R, Gray D. Applied Wound Management supplement. The Wound Infection Continuum: a revised perspective. *Wounds UK* 2004; 13–8 (Ed: D Gray)
11. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). *Principles of best practice: Wound infection in clinical practice. An international consensus*. London: MEP Ltd, 2008. Available at: <http://www.woundsinternational.com> (accessed 28.10.16)
12. Sibbald RG, Orsted H, Schultz GS et al. Preparing the wound bed 2003; focus on infection and inflammation. *Ostomy Wound Manage* 2003; 49(11): 24–51
13. Healy B, Freedman A. Infections. In: Grey JE, Harding KG (eds). *ABC of Wound Healing*. BMJ Books Blackwell, 2006. 35–8
14. Gardner SE, Frantz RA, Troia C, et al. A tool to assess clinical signs and symptoms of localized infection in chronic wounds: development and reliability. *Ostomy Wound Manage* 2001; 47(1): 40–7
15. Dissemond J, Dowsett C, Schultz G, et al. *Elevated Protease Activity Made Easy*. Wounds International 2013. Available at: www.woundsinternational.com (accessed 21.10.16)
16. Serena TE. Development of a novel technique to detect proteases in chronic wounds. *Adv Wound Care* 2014; 3(12): 729–32
17. Evans E, Brown MRW, Gilbert P. Iron chelator, exopolysaccharide and protease production in *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of the effects of specific growth rate in biofilm and planktonic culture. *Microbiology* 1994; 140: 153–7
18. Attinger C, Wolcott R. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. *Adv Wound Care* 2012; 1(3): 127–32
19. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, et al. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic wounds. *J Antimicrob Ther* 2005; 55: 143–9
20. Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms Made Easy. *Wounds International* 2010; 1(3): Available at: <http://www.woundsinternational.com> (accessed 21.10.16)
21. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008; 17(11): 502–8

Sommario

La presenza di batteri sulla superficie di una ferita potrebbe non essere indice di infezione o di guarigione inadeguata. Infatti, in molti casi la guarigione avviene nonostante la presenza di batteri. Tuttavia, quando i batteri iniziano a comportarsi in modo patogenetico, possono verificarsi complicanze, tra cui infezione locale o sistemica. Recenti studi hanno dimostrato che la BPA può essere utilizzata come marker oggettivo di patogenicità batterica, anche quando non sono evidenti indicatori clinici di infezione. L'innovativo test del flusso laterale WOUNDCHek™ Bacterial Status offre una valutazione qualitativa della BPA direttamente da un campione di tampone di una ferita cronica. Questo rilevamento può consentire interventi clinici anticipati e impedire che le ferite progrediscano nel continuum dell'infezione fino a uno stato di infezione più elevato.