

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN**

mgr inż. Adrianna Podbielska-Kubera

**OCENA WIRULENCJI WYBRANEJ FLORY BAKTERYJNEJ SKÓRY
KOŃCZYN DOLNYCH U CHORYCH Z PATOLOGIĄ STOPY
CUKRZYCOWEJ**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. M. Durlik, prof. IMDiK PAN

**Pracę wykonano w Zespole Kliniczno-Badawczym
Chirurgii Transplantacyjnej**

Warszawa 2015

*Serdecznie dziękuję Promotorowi, Profesorowi Markowi Durlikowi
za opiekę merytoryczną oraz cenne uwagi i wskazówki w trakcie przygotowywania
pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również dr hab. Hannie Gałkowskiej
za pomoc merytoryczną podczas realizacji badań,*

*Pracownikom Zespołu Kliniczno- Badawczego Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK PAN
za okazaną pomoc oraz przyjazną atmosferę pracy,*

Mamie

za ogromne wsparcie i pomoc,

Mężowi i Synowi

za cierpliwość i wyrozumiałość

Praca finansowana z grantu nr 1PO5D 01623 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa
Wyższego

Wykaz stosowanych skrótów.....	5
1. Wstęp.....	9
1.1. Epidemiologia stopy cukrzycowej.....	10
1.2. Powikłania cukrzycy	11
1.2.1. Mikroangiopatia	12
1.2.2. Makroangiopatia	12
1.2.3. Zespół stopy cukrzycowej	12
1.3. Bakterie w cukrzycy	20
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.3.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
1.4. Wirulencja bakterii	23
1.4.1. Czynniki wirulencji <i>S.aureus</i>	25
1.4.2. Czynniki wirulencji <i>S.epidermidis</i>	30
1.5. Biofilm	31
1.5.1. Operon icaADBC i międzykomórkowa adhezyna polisacharydowa PIA	33
1.5.2. Quorum sensing	34
1.6. Ocena stopnia pokrewieństwa między szczepami	34
2. Cel pracy	36
3. Materiały	37
3.1. Kryteria włączenia chorych do badań.....	37
3.2. Podział grupy badanej	38
4. Metody	40
4.1. Izolacja <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> z materiału klinicznego, identyfikacja i bankowanie.....	40
4.2. Określanie oporności na antybiotyki oraz oporności wielolekowej szczepów MRSA i MRSE.....	41
4.3. Izolacja DNA i wykrywanie obecności genów kodujących czynniki wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	41
4.3.1. Izolacja genomowego DNA	42
4.3.2. Wykrywanie obecności genów kodujących czynniki wirulencji przy zastosowaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy PCR	43
4.3.2.2. Warunki reakcji PCR dla genu <i>etd</i> i <i>edin</i>	45
4.4. Badanie ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> przy zastosowaniu techniki RT-PCR.....	46
4.4.1. Izolacja RNA	46
4.4.2. Odwrotna transkrypcja.....	47
4.4.3. PCR dla genów <i>eta</i> , <i>fnbA</i> , <i>cna</i>	46
4.5. Badanie podobieństwa genetycznego szczepów techniką elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)	46
4.6. Metody statystyczne	47
5. Wyniki	48
5.1. Flora bakteryjna chorych leczonych ambulatoryjnie i w warunkach szpitalnych.....	48
5.2. Flora bakteryjna chorych z cukrzycą oraz zdrowych ochotników. Uwzględnienie rodzaju stopy cukrzycowej i miejsca pobrania materiału do badań	49
5.3. Oporność na metycylinę i oporność wielolekowa szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	52
5.4. Obecność genów kodujących czynniki wirulencji oraz częstość ich występowania	57

5.4.1.	Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSA i MSSA pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową z podziałem na stopę neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwienną (SCNied.)	58
5.4.2.	Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSE i MSSE pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową z podziałem na neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwienną (SCNied.)	61
5.4.3.	Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> od chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) i zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału	62
5.4.4.	Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwienną (SCNied.) w zależności od miejsca pobrania materiału	63
5.4.5.	Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.epidermidis</i> od chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) i zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału	67
5.4.6.	Analiza szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> pobranych od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną (SCNeur.) i niedokrwienną (SCNied.) oraz od zdrowych ochotników pod kątem częstości występowania genów wirulencji	65
5.5.	Ekspresja genów kodujących czynniki wirulencji szczepów <i>S.aureus</i>	74
5.6.	Badanie podobieństwa genetycznego szczepów techniką PFGE	77
6.	Podsumowanie wyników	81
7.	Dyskusja	83
7.1.	Czynniki wirulencji bakterii <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	83
7.1.1.	Obecność genów wirulencji <i>S.aureus</i> u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej	83
7.1.2.	Obecność genów wirulencji <i>S.epidermidis</i> u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej	97
7.1.3.	Oporność na antybiotyki bakterii <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	97
7.2.	Ekspresja wybranych czynników wirulencji	94
7.3.	Podobieństwo genetyczne izolatów	102
7.4.	Przydatność badań wirulencji bakterii u chorych z zespołem stopy cukrzycowej w postępowaniu terapeutycznym	102
8.	Wnioski końcowe	97
9.	Streszczenie	97
9.1.	Summary	116
10.	Spis rycin, tabel i załączników	102
10.1.	Ryciny	102
10.2.	Tabele	120
10.3.	Załączniki	120
11.	Piśmiennictwo	120
12.	Załączniki	127

Wykaz stosowanych skrótów

Aap	(ang. <i>accumulation- associated protein</i>)	białko związane z akumulacją bakterii
ABI	(ang. <i>ankle-brachial index</i>)	wskaźnik kostkowo-ramienny
AGE	(ang. <i>advanced glycation end-product</i>)	późny produkt glikacji
agr	(ang. <i>accessory gene regulator system</i>)	system regulacyjny genów
Bap	(ang. <i>biofilm-associated protein</i>)	białko związane z produkcją biofilmu
bFGF	(ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>)	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BHI	(ang. <i>brain heart infusion</i>)	bulion mózgowo-sercowy
BM-PC	(ang. <i>bone marrow progenitor cell</i>)	endogenna komórka progenitorowa szpiku kostnego
CA-MRSA	(ang. <i>community-acquired MRSA</i>)	pozaszpitalne oporne szczepy <i>S.aureus</i>
CFU	(ang. <i>colony forming unit</i>)	jednostka tworząca kolonię
CGRP	(ang. <i>calcitonin gene-related peptide</i>)	peptyd związany z genem kalcytoniny
Cna	(ang. <i>collagen-binding protein</i>)	białko wiążące kolagen
CoNS	(ang. <i>coagulase-negative staphylococci</i>)	gronkowce koagulazoujemne
CRA	(ang. <i>Congo red agar</i>)	podłoże agarowe zawierające czerwony barwnik Congo
CRP	(ang. <i>C-reactive protein</i>)	białko C-reaktywne
DAG	(ang. <i>diacyloglicerole</i>)	diacyloglicerol
DFU	(ang. <i>diabetic foot ulcer</i>)	owrzodzenie stopy cukrzycowej
DNS	(ang. <i>diabetic neuropathy symptom</i>)	objaw neuropatii cukrzycowej
eDNA	(ang. <i>extracellular DNA</i>)	zewnątrzkomórkowe DNA
EGF	(ang. <i>epidermal growth factor</i>)	naskórkowy czynnik wzrostu
EMG	(ang. <i>electromyography</i>)	elektromiografia
EPC	(ang. <i>endothelial progenitor cell</i>)	komórka progenitorowa śródbłonna naczyń krwionośnych
EPS	(ang. <i>extracellular polymeric substances</i>)	zewnątrzkomórkowe polimery
Edin	(ang. <i>epidermal cell differentiation inhibitor</i>)	inhibitor różnicowania się komórek naskórka

Eta	(ang. <i>exfoliative toxin A</i>)	toksyna A odpowiedzialna za łuszczenie się naskórka
Etd	(ang. <i>exfoliative toxin D</i>)	toksyna D odpowiedzialna za łuszczenie się naskórka
FnBP	(ang. <i>fibronectin-binding protein</i>)	białko wiążące fibronektynę
HA-MRSA	(ang. <i>hospital-acquired MRSA</i>)	oporne szczepy <i>S.aureus</i> nabyte w placówkach opieki zdrowotnej
HbA1c		hemoglobina glikowana
FGF	(ang. <i>fibroblast growth factor</i>)	czynnik wzrostu fibroblastów
HIF-1α	(ang. <i>hypoxia-inducible factor-1α</i>)	indukowany niedotlenieniem czynnik 1 α
HSC	(ang. <i>hemapoietic stem cell</i>)	krwiotwórcza komórka macierzysta
ica locus	(ang. <i>intercellular adhesion locus</i>)	obszar chromosomu zajmowany przez geny związane z produkcją PIA
IDF	(ang. <i>International Diabetes Federation</i>)	Międzynarodowa Federacja Diabetyków
IDGF-I	(ang. <i>insulin-like growth factor-I</i>)	insulinopodobny czynnik wzrostu-I
IDSA	(ang. <i>Infectious Diseases Society of America</i>)	Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych
IWGDF	(ang. <i>International Working Group on the Diabetic Foot</i>)	Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Stopy Cukrzycowej
IL	(ang. <i>interleukin</i>)	interleukina
IS256	(ang. <i>insertion sequence element</i>)	sekwencja insercyjna IS256
kDa		jedn. masy atom., kilodalton
kpz		kilo par zasad
MQ		woda z aparatury MilliQ
MLST	(ang. <i>multilocus sequence typing</i>)	różnicowanie szczepów oparte na badaniu kilku sekwencji
MMP	(ang. <i>matrix metalloproteinase</i>)	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
MRSA	(ang. <i>methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>)	metycylinooporny szczep <i>S.aureus</i>
MRSE	(ang. <i>methicillin resistant Staphylococcus epidermidis</i>)	metycylinooporny szczep <i>S.epidermidis</i>

MSCRAMMs	(ang. <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>)	białka powierzchniowe rozpoznające adhezyjne cząsteczki macierzy
MSSA	(ang. <i>methicillin sensitive Staphylococcus aureus</i>)	metycylinowrażliwy szczep <i>S.aureus</i>
MSSE	(ang. <i>methicillin sensitive Staphylococcus epidermidis</i>)	metycylinowrażliwy szczep <i>S.epidermidis</i>
NGF	(ang. <i>nerve growth factor</i>)	czynnik wzrostu nerwów
NFκB	(ang. <i>nuclear factor kappa-B</i>)	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa-B)
NO	(ang. <i>nitric oxide</i>)	tlenek azotu
NOS	(ang. <i>nitric oxide synthase</i>)	syntaza tlenu azotu
OB (Odczyn Biernackiego)		miara szybkości opadania czerwonych krwinek w osoczu
PBP	(ang. <i>penicillin binding protein</i>)	białko wiążące penicylinę
PCR	(ang. <i>polymerase chain reaction</i>)	łańcuchowa reakcja polimerazy
PDGF	(ang. <i>platelet-derived growth factor</i>)	płytkowy czynnik wzrostu
PEDIS	(ang. <i>perfusion, extent/size, depth/tissue loss, infection and sensation</i>)	ukrwienie, rozległość, głębokość, zakażenie, odczuwanie bodźców
PFGE	(ang. <i>pulsed field gel electrophoresis</i>)	elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym
PIA	(ang. <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)	polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa
PKC	(ang. <i>protein kinase C</i>)	kinaza białkowa C
PMN/PML	(ang. <i>polymorphonuclear leukocyte</i>)	polimorfojądrowy leukocyt
PMSF	(ang. <i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>)	fluorek fenylometylosulfonylu
PNAG	(ang. <i>poly-N-acetylglucosamine</i>)	poli-N-acetyloglukozoamina
RAPD	(ang. <i>random amplification of polymorphic DNA</i>)	losowa amplifikacja polimorficznego DNA
rbf	(ang. <i>regulator of biofilm formation</i>)	regulator powstawania biofilmu
RCF	(ang. <i>relative centrifugal force</i>)	względna siła odśrodkowa
S(AD)SAD	(ang. <i>Size (Area and Depth), Sepsis, Arteriopathy and Denervation</i>)	jedna z klasyfikacji chorych ze stopą cukrzycową
sar	(ang. <i>staphylococcal accessory regulator</i>)	gronkowcowy system regulatorowy
SC		stopa cukrzycowa
ScNeur.		stopa cukrzycowa neuropatyczna

SCNied.		stopa cukrzycowa niedokrwienna
SCC	(ang. <i>staphylococcal cassette chromosome</i>)	gronkowcowa kasetta chromosomowa
SDF-1α	(ang. <i>stromal cell-derived factor-1α</i>)	czynnik pochodzący z komórek zrębu
SDS	(ang. <i>sodium dodecyl (lauryl) sulfate</i>)	laurylosiarczan sodu
SE	(ang. <i>staphylococcal enterotoxin</i>)	enterotoksyna gronkowcowa
SSP1	(ang. <i>staphylococcal surface protein</i>)	gronkowcowe białko powierzchniowe
SSS	(ang. <i>scalded skin syndrome</i>)	zespół oparzonej skóry
TBE bufor	(ang. <i>Tris/kwas borowy/EDTA buffer</i>)	bufor Tris/kwas borowy/EDTA
TE bufor	(ang. <i>Tris/EDTA buffer</i>)	bufor Tris/EDTA
TGF-β	(ang. <i>transforming growth factor-β</i>)	transformujący czynnik wzrostu
TNF-α	(ang. <i>tumor necrosis factor</i>)	czynnik martwicy nowotworowej
TSS	(ang. <i>toxic shock syndrome</i>)	zespół wstrząsu toksycznego
TSST-1	(ang. <i>toxic shock syndrome toxin 1</i>)	toksyna zespołu wstrząsu toksycznego
VCAM-1	(ang. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)	cząsteczka adhezyjna-1 komórki naczyniowej
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych
VRE	(ang. <i>vancomycin-resistant enterococci</i>)	enterokoki odporne na wankomycynę
ZSC		zespół stopy cukrzycowej

1. Wstęp

Cukrzyca stanowi piątą co do częstości przyczynę śmierci na świecie po zakażeniach, chorobach sercowo-naczyniowych, nowotworach i urazach. Liczba zachorowań na cukrzycę stale rośnie [133]. Ciężkim powikłaniem cukrzycy jest zespół stopy cukrzycowej (ZSC), często z towarzyszącym zakażeniem. Owrzodzenia stopy u chorych na cukrzycę stanowią istotny problem zarówno zdrowotny, jak i społeczny.

U chorych z niewydolnością naczyniową zakażenie postępuje szybko i może prowadzić do amputacji kończyny, a niekiedy do zagrożenia życia [60]. Również zmiany neuropatyczne, powiązane z utratą czucia w stopach, grożą rozwojem owrzodzeń o zaburzonym przebiegu gojenia.

Obecność drobnoustrojów w ranie to jedna z głównych przyczyn utrudnionego gojenia owrzodzeń u chorych z ZSC. Powstaje zatem pytanie, w jak dużym stopniu drobnoustroje izolowane od tej grupy chorych wykazują cechy chorobotwórczości.

Geny wirulencji, będące odzwierciedleniem stopnia chorobotwórczości bakterii, mogą stanowić molekularne markery inwazyjności umożliwiające rozróżnienie pomiędzy szczepami inwazyjnymi i kolonizującymi i tym samym dające szanse wytypowania osób szczególnie narażonych na rozwinięcie ciężkiego zakażenia. Z przeglądu literatury wynika, że u chorych z zespołem stopy cukrzycowej bada się jedynie obecność bakterii i ich lekowrażliwość, a nie obecność genów wirulencji. Wyjątek stanowi doniesienie Sotto i wsp. [129], którzy przeprowadzili badania wirulencji genów bakterii pochodzących z owrzodzeń u chorych z zespołem stopy cukrzycowej we Francji. Do badań włączyli oni jedynie chorych, u których zakażenie spowodowane było obecnością szczepów *S.aureus*.

W literaturze nie odnotowano doniesień, w których osobnej analizie poddawano szczepy pochodzące ze stopy cukrzycowej niedokrwiennej i neuropatycznej. Jedynie w 2009 r. Gershater i wsp. [50] wykazali, że wśród pacjentów z niedokrwinną stopą cukrzycową występowało więcej niegojących się owrzodzeń w porównaniu ze stopą cukrzycową neuropatyczną. Zakażenie owrzodzenia stanowiło jeden z czynników prognostycznych opóźnionego gojenia jedynie w grupie chorych z owrzodzeniem niedokrwinnym. W przypadku stopy cukrzycowej neuropatycznej nie zauważono takiej zależności.

Prezentowane w pracy badania wpisują się w kierunek rozdzielnego traktowania chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwinną. Jednocześnie badania te stanowią kontynuację wcześniejszych prac prowadzonych w Zespole Kliniczno-Badawczym Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK PAN, a dotyczących bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis*

izolowanych z powierzchni skóry, z ran i tkanek głębokich hospitalizowanych chorych [150].

Przeprowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej badania wirulencji bakterii dotyczyły chorych z cukrzycą należących do grupy neuropatycznej, niedokrwiennej oraz zdrowych ochotników. Porównania wyników dokonano w oparciu o kryteria związane z rodzajem stopy cukrzycowej, a także w odniesieniu do miejsca pobrania materiału.

W pracy zbadano również zdolność bakterii do ekspresji genów wirulencji, aby ocenić ich konstytutywną możliwość wytwarzania funkcjonalnego białka.

Określenie występowania genów wirulencji chorych z ZSC może pomóc w wyborze optymalnego sposobu leczenia, stanowiącego często połączenie terapii antybiotykowej z zabiegiem chirurgicznym, a także leczeniem dodatkowym (np. terapią hiperbaryczną). Obecnie badanie stopnia wirulencji bakterii nie wchodzi w zakres standardowych procedur leczniczych u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej.

W niniejszej pracy zbadano ponadto sposób rozprzestrzeniania się zakażeń bakteryjnych. W celu sprawdzenia, czy miejsca pobrania materiałów do badań są zasiedlane przez szczepy bakterii o takiej samej czy różnej klonalności, wykonano badanie podobieństwa genetycznego szczepów. Dzięki zastosowaniu techniki elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym sprawdzono również, czy dochodzi do przemieszczania się szczepów bakteryjnych pomiędzy chorymi.

1.1. Epidemiologia stopy cukrzycowej

Cukrzyca stanowi poważny problem zdrowotny występujący u ok. 6% populacji na świecie [56].

U ponad 55% chorych z cukrzycą stwierdza się niedokrwienie kończyn dolnych wywołane miażdżycą [75]. Ocenia się, że chorzy ci mają o 25% większe ryzyko rozwoju owrzodzeń stopy i o 50% zwiększone ryzyko zakażenia owrzodzenia. Prawdopodobieństwo owrzodzenia stopy u tych chorych zwiększa się do 42% w okresie 20 lat trwania choroby [72]. Może też dojść do pojawienia się kolejnych owrzodzeń w następnych latach. Znacznie gorsze statystyki dotyczą krajów rozwijających się (głównie afrykańskich) [119].

Większość (60–80%) owrzodzeń stopy ulega wygojeniu, ale 5-24% prowadzi do amputacji w ciągu 6-18 miesięcy [1]. Przeciętny czas gojenia się owrzodzenia mieści się w przedziale 11-14 tygodni.

U chorych z cukrzycą ryzyko amputacji jest nawet 40-krotnie większe niż u chorych bez cukrzycy [148]. 40-70% wszystkich przypadków zabiegów odjęcia kończyny dolnej, nie będących następstwem urazu, spowodowanych jest cukrzycą [1]. Utrata jednej kończyny zwiększa ryzyko utraty drugiej. Śmiertelność okołoperacyjna sięga 10%. Śmiertelność

pooperacyjna, w zależności od poziomu odjęcia kończyny, kształtuje się w przedziale 5-40% [15]. W ciągu roku po zabiegu umiera 13-40% chorych, w ciągu 3 lat 35%–65%, a w ciągu 5 lat- 39%–80% [148].

W Polsce zapadalność na owrzodzenie stopy cukrzycowej jest porównywalna z innymi krajami europejskimi. Zespół stopy cukrzycowej obserwuje się u ok.100-150 tysięcy chorych [30]. Jednakże statystyki dotyczące amputacji kończyn są bardzo niekorzystne. Liczba wykonywanych amputacji waha się w przedziale 5-180/10000 chorych na cukrzycę/rok [74]. Polska należy do krajów, w których obserwuje się najwięcej takich zabiegów (14 tysięcy rocznie). Oznacza to, że dziennie przeprowadza się średnio 38 amputacji.

Wysoki wskaźnik amputacji w Polsce może wynikać z dużej częstości występowania cukrzycy, późnego diagnozowania chorych, małej liczby wyspecjalizowanych ośrodków medycznych, późnego kwalifikowania chorego do leczenia chirurgicznego i ograniczonych nakładów na leczenie [81].

Leczenie owrzodzeń stopy cukrzycowej jest bardzo kosztowne. W krajach rozwiniętych wydatki ponoszone na ten cel przekraczają 20% całkowitych kosztów przeznaczonych na leczenie chorych z cukrzycą [148]. W Polsce 12-15% środków związanych z leczeniem cukrzycy przeznacza się na chorych ze stopą cukrzycową [69].

1.2. Powikłania cukrzycy

Długotrwały wzrost stężenia glukozy we krwi uszkadza śródbłonek naczyń, co powoduje swobodne przenikanie białek osocza poza łożysko naczyniowe. W ten sposób przenika m.in. fibrynogen, który następnie polimeryzuje do fibryny, stanowiąc nieprzepuszczalny dla tlenu i substancji odżywczych „mankiet” wokół naczynia, co w konsekwencji prowadzi do martwicy. W wyniku zaburzeń w funkcjonowaniu śródbłonek naczyń krwionośnych dochodzi do zmian w obrębie wszystkich tkanek. Powikłania dotyczą układu kostnego, nerwowego, mięśniowego, naczyniowego, warstwy podskórnej i skóry. Są to często zmiany nieodwracalne.

Do głównych powikłań cukrzycowych zalicza się: mikroangiopatię, makroangiopatię i zespół stopy cukrzycowej. Bała M. i wsp. [10] wskazują na wysoką częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych, nadciśnienia tętniczego, udarów i powikłań mikroangiopatycznych wśród chorych z cukrzycą.

1.2.1. Mikroangiopatia

Mikroangiopatia to zaburzenie mikrokrążenia, które utrudnia przepływ krwi przez włosniczki oraz uszkadza ich ściany. Mikroangiopatia powiązana jest ze zwiększoną przepuszczalnością naczyń, zwiększonym ciśnieniem i przepływem krwi oraz wzrostem jej lepkości. Procesy te zachodzą najczęściej w siatkówce (retinopatia), nerkach (nefropatia) i nerwach obwodowych (neuropatia). Występuje u ponad 40% chorych z 2 typem cukrzycy i jest główną przyczyną owrzodzeń stopy cukrzycowej. Włosniczki są stale narażone na wysokie ciśnienie, co prowadzi do pogrubienia błony podstawnej (około 8000 nm, porównując z 1000-3000 nm grubości u zdrowych osób) [90]. Konsekwencją pogrubienia błony podstawnej jest upośledzona migracja leukocytów do ogniska zakażenia w tkance [31].

1.2.2. Makroangiopatia

Makroangiopatia dotyczy zmian miażdżycowych obejmujących ściany dużych tętnic, w tym tętnic kończyn dolnych. Patofizjologia miażdżycy u pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych jest taka sama i charakteryzuje się uszkodzeniem śródbłonna, agregacją płytek krwi i formowaniem płytek miażdżycowych [124]. Odmienne jest natomiast rozmieszczenie zmian miażdżycowych w tętnicach kończyn dolnych. Najczęstszą lokalizacją u osób bez cukrzycy jest tętnica udowa, a u chorych z cukrzycą zmiany występują w tętnicach poniżej kolana [31]. Ponadto w cukrzycy zmiany miażdżycowe są częstsze, bardziej rozsiane i pojawiają się wcześniej [56].

Niedokrwienie 10-krotnie zwiększa ryzyko amputacji [75]. Obniżona zdolność organizmu do gojenia owrzodzeń w niedokrwieniu wynika ze zredukowanej dostępności tlenu i składników odżywczych oraz upośledzenie procesów naprawczych [92]. Martwica stopy to konsekwencja zarówno krytycznego niedokrwienia, jak i zakażenia. Początkowo obserwuje się martwicę suchą, która przy obecności zakażenia może przekształcić się w martwicę wilgotną [75].

1.2.3. Zespół stopy cukrzycowej

Stopa cukrzycowa (SC) to zakażenie, owrzodzenie i/lub destrukcja tkanek głębokich kończyn dolnych (poniżej kostki) w połączeniu z zaburzeniami neurologicznymi oraz chorobami naczyń obwodowych o różnym stopniu zaawansowania [30].

Zakażenie owrzodzenia stopy cukrzycowej rozpoznawane jest na podstawie przynajmniej dwóch spośród wymienionych objawów: ropień, rumień, ból, podwyższona ciepłota [114].

Zespół stopy cukrzycowej ma złożoną etiologię, w której czynnik dominujący może stanowić niedokrwienie i/lub neuropatia. Na tej podstawie wyróżnia się trzy postacie ZSC: stopę cukrzycową z przewagą czynnika neuropatycznego, stopę cukrzycową z przewagą zmian niedokrwienych oraz postać mieszaną, w której występują zarówno cechy stopy neuropatycznej, jak i niedokrwiennej. Prawie zawsze obserwuje się zmiany neuropatyczne w stopie niedokrwiennej [75].

Charakterystykę objawów związanych z występowaniem stopy cukrzycowej niedokrwiennej i neuropatycznej przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Objawy występujące u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwiennej [119]

	Stopa neuropatyczna	Stopa niedokrwienne
wywiad	długotrwała cukrzyca, nefropatia, retinopatia	obecne czynniki ryzyka miażdżycy, hiperlipidemia, dusznica bolesna
lokalizacja	część podeszwowa	części grzbietowe, dystalne, boczne krawędzie
ból	nie występuje lub mały	bardzo nasilony
czucie	zaburzone	prawidłowe lub przeczulica
badanie	stopa ciepła, różowa, sucha	stopa zimna, zmiany troficzne
tętno	dobrze wyczuwalne	brak

Pomimo rzadkiej częstości występowania zespołu stopy cukrzycowej niedokrwiennej, to właśnie u tych chorych wykonuje się najczęściej wysokich amputacji (powyżej stawu kostkowego), co w późniejszym czasie stwarza ryzyko przedwczesnej śmierci, gdyż chorzy po zabiegu amputacji żyją przeciętnie tylko 3-5 lat [111]. Najtrudniejsza do leczenia i charakteryzująca się najcięższym rokowaniem jest mieszana postać stopy cukrzycowej.

1.2.3.1. Klasyfikacja owrzodzeń stopy cukrzycowej

Istnieje kilka klasyfikacji owrzodzeń stopy cukrzycowej, jednak żadna z nich nie jest uniwersalna.

1. Klasyfikacja Wagnera uwzględnia zaawansowanie zmian w przebiegu ZSC ze względu na ich głębokość i zasięg [119, 30].

Tabela 2. *Stadia zmian w przebiegu zespołu stopy cukrzycowej według klasyfikacji Wagnera [30]*

Podział kliniczny wg Wagnera	
stopień 0	stopa wysokiego ryzyka, o zmienionej morfologii, jeszcze bez owrzodzenia
stopień 1	powierzchowne owrzodzenie
stopień 2	owrzodzenie ze stanem zapalnym skóry i tkanek podskórnych
stopień 3	zaawansowana zmiana z zajęciem struktur kostnych; ropowica
stopień 4	miejscowa martwica sucha leczona zachowawczo lub zgorzel wilgotna
stopień 5	rozległa zmiana martwicza, kwalifikowanie do amputacji

2. Skala Uniwersytetu w Teksasie określa obecność lub brak zakażenia i niedokrwienia, nie uwzględnia jednak neuropatii.

3. Klasyfikacja S(AD)SAD (*ang. Size (Area and Depth), Sepsis, Arteriopathy and Denervation*) obejmuje 4 kategorie (wielkość rany z jej powierzchnią i głębokością, a także obecność zakażenia, patologii naczyń i odnerwienia) w 4-stopniowej skali.

4. Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Stopy Cukrzycowej (*ang. International Working Group on the Diabetic Foot, IWGDF*) zaproponowała klasyfikację PEDIS, która różnicuje rany na podstawie 5 cech: przepływu krwi, rozległości, głębokości, obecności zakażenia i odczuwania bodźców. Ponadto IWGDF zaleca różną częstość badań kontrolnych w zależności od obecności lub braku neuropatii czuciowej/choroby naczyń obwodowych oraz przebytego owrzodzenia [29,88].

5. Prosty, 4-punktowy system oceny objawów neuropatii cukrzycowej (*ang. diabetic neuropathy symptom, DNS*) został zaproponowany przez Meijera i wsp. [75]. Autorzy kwalifikują chorych na podstawie występowania następujących objawów: nieskoordynowanego chodu, uczucia pieczenia i mrowienia, uczucia klucia oraz pogorszonego czucia w obrębie skóry podudzi i stóp.

6. Klasyfikacja Fontaine'a opiera się na ocenie stopnia niedokrwienia uwzględniając brak objawów klinicznych, występowanie chromania przestankowego, bóle spoczynkowe oraz występowanie martwicy [75].

Kliniczna klasyfikacja zakażeń w zespole stopy cukrzycowej dzieli zakażenia łagodne, umiarkowane i ciężkie. Zakażenia łagodne cechują się obszarem występowania ograniczonym do skóry i tkanki podskórnej oraz obszarem zaczerwienienia wokół rany

sięgającym do 2 cm. W zakażeniu umiarkowanym dodatkowo obserwuje się jeden z możliwych objawów: zapalenie tkanki łącznej powyżej 2 cm wokół rany, poszerzenie naczyń limfatycznych, zgorzel, ropień i brak objawów ogólnych zakażenia. Z kolei zakażenia ciężkie związane są z występowaniem ogólnoustrojowej odpowiedzi organizmu i cechują się rozległym, szybko postępującym zapaleniem tkanki łącznej, obumieraniem tkanek głębokich, zakażeniami kości, niedokrwieniem i toksycznością ustrojową. Zakażenia ciężkie zawsze wymagają hospitalizacji. Chorzy z zakażeniami w stopniu lekkim, z powierzchownymi owrzodzeniami, bez zajęcia struktur kostnych i tkanek głębokich, pozostają pod opieką ambulatoryjną [60].

1.2.3.2. Neuropatia cukrzycowa

Neuropatia, jedna z głównych przyczyn ZSC, jest obecna w różnym stopniu u większości chorych z cukrzycą. Trudno precyzyjnie oszacować rzeczywistą częstość występowania [143]. Neuropatię stwierdza się u 70-80% chorych ze stopą cukrzycową, przy czym aż u ok. 50% chorych jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój owrzodzenia [75].

Neuropatia najczęściej występuje u osób z długo trwającą cukrzycą, chociaż jej objawy mogą być znacznie przesunięte w czasie dzięki właściwej kontroli glikemii [59]. U innych neuropatia cukrzycowa pojawia się dość wcześnie w trakcie trwania choroby, a u części chorych bez wyrównania glikemii neuropatia nigdy nie występuje [75].

Obserwacje te mogą świadczyć o genetycznym podłożu neuropatii cukrzycowej [75]. Zaburzenia neuropatyczne dotyczą komponenty ruchowej, czuciowej i autonomicznej nerwów.

Pojawiają się zaniki mięśni, obserwujemy występowanie palców młoteczkowatych, zmianę kształtu stopy i ograniczoną ruchomość stawów na skutek gromadzenia się glikozylowanego kolagenu. Deformacje stóp przyczyniają się do powstania nowych miejsc nacisku, co dodatkowo naraża stopy na rozwój zmian troficznych.

Obwodowa neuropatia czuciowa stanowi często późne powikłanie cukrzycy. Cienkie, bezmielinowe włókna typu C i zmielinizowane włókna typu A-delta unerwiające skórę ulegają uszkodzeniu w przebiegu neuropatii czuciowej [45].

Neuropatia autonomiczna wyraża się zanikiem potliwości na stopie, hiperkeratozą, tworzeniem się modzeli, palców młoteczkowatych, a także przetok tętniczo-żylnych. Częstość występowania neuropatii autonomicznej ocenia się na około 30%, a śmiertelność z powodu powikłań sięga 25-50% w ciągu 5-10 lat [88,91].

Najczęstszą postacią kliniczną neuropatii cukrzycowej jest symetryczna, dystalna polineuropatia, która zwiększa ryzyko rozwoju zespołu stopy cukrzycowej o 80% [75]. Postać ta rozwija się skrycie, choć niekiedy może mieć gwałtowny początek, obejmując cienkie i/lub grube włókna nerwowe [143]. Chorzy z cukrzycą cechują się obniżoną zdolnością regeneracji aksonów, a zmiany we włóknach nerwowych zaczynają się u nich w bardzo wczesnym stadium choroby, zanim pojawią się kliniczne objawy neuropatii. Dodatkowo niedobór czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*, NGF) w cukrzycy przyczynia się do nieprawidłowego wzrostu i funkcjonowania włókien nerwowych [74]. Włókna nerwowe uwalniają czynniki neurogenne takie jak: neuropeptyd - substancję P, który wpływa na wzrost przepuszczalności śródbłonna naczyń, peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP) i czynnik wzrostu nerwów NGF. Zmniejszony stopień unerwienia w przebiegu ZSC oraz obniżona ekspresja czynników neurogennych mogą być powiązane z małą liczbą komórek zapalnych napływających do miejsca zapalenia i wydłużonym czasem gojenia się owrzodzeń [45].

Patogeneza neuropatii cukrzycowej nie jest w pełni wyjaśniona [75]. Prawdopodobnym czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie neuropatii jest hiperglikemia. Wraz ze wzrostem stężenia glukozy we krwi rośnie stężenie glukozy w komórkach nerwowych, uaktywnia się proces glikolizy, szlak polioliowy i tworzenie późnych produktów glikacji (ang. *advanced glycation end-product*, AGE). Wymienione procesy przyczyniają się do wzrostu stężenia wolnych rodników. W cukrzycy wydolność systemu obrony przed wolnymi rodnikami (tzw. sieć antyoksydacyjna) jest osłabiona. Stres oksydacyjny może odgrywać istotną rolę w rozwoju zaburzeń funkcji naczyń i nadciśnienia tętniczego. Wzrost stężenia diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerole*, DAG) pod wpływem hiperglikemii aktywuje m.in. enzym kinazę białkową C (ang. *protein kinase C*, PKC), co przyczynia się do zwiększenia przepuszczalności i kurczliwości ścian naczyń krwionośnych i w ten sposób upośledza mikrokrażenie. Aktywacja szlaku polioliowego redukuje szybkość przewodzenia nerwowego, a nasilona lipoliza prowadzi do apoptozy neuronów [75]. Aktywacja późnych produktów glikacji powiązana jest z tworzeniem blaszek miażdżycowych poprzez stymulację makrofagów oraz przyspieszenie utylizacji tlenu azotu. Następuje zwężenie naczyń, niedotlenienie neuronów i ich uszkodzenie. Receptory dla AGE są obecne na licznych typach komórek ważnych dla prawidłowego procesu gojenia się owrzodzeń: komórkach śródbłonna, monocytach, fibroblastach i komórkach mięśni gładkich. W owrzodzeniach cukrzycowych późne produkty glikacji stymulują wydzielanie prozapalnych cytokin, przyczyniają się do kaskady zdarzeń powodujących opóźnienie napływu komórek efektorowych do rany i do utrzymywania się stanu przewlekłego zapalenia. Płytkowy czynnik wzrostu stymuluje

receptory na fibroblastach. Aktywowane fibroblasty przyczyniają się do szybkiego procesu granulacji tkanki [59]. Zdolność fibroblastów do proliferacji zostaje zahamowana w środowisku hiperglikemicznym [31]. Brak równowagi w poziomie proteaz i ich inhibitorów, spowodowany utrzymującą się produkcją mediatorów zapalenia i napływem komórek efektorowych, uniemożliwia syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej i jej przebudowę, które są niezbędne w procesie gojenia się owrzodzenia.

1.2.3.3. Diagnostyka i leczenie zespołu stopy cukrzycowej

Diagnostyka zespołu stopy cukrzycowej obejmuje dane z wywiadu i badania przedmiotowego. Dane z wywiadu dostarczają informacji o dolegliwościach związanych z neuropatią (pieczenie, mrowienie, kłucie) i zaburzeniami ukrwienia kończyny (chromanie przestankowe, ucieplenie stopy). Natomiast badania przedmiotowe oceniają wygląd i funkcjonowanie stopy (kształt, deformacje, otarcia, pęknięcia), neuropatię- poprzez badanie czucia dotyku (wacikiem), ucisku (monofilamentem Semmesa-Weinsteina o wystandaryzowanej sile zgięcia 10 g), wibracji (kamertonem Rydel-Seiffera), bólu (neurotipem), temperatury (termotipem), zaburzenie wydzielania potu (neuropadem), badanie odruchu ścięgna Achillesa, ocenę stanu naczyń [30]. W diagnostyce polineuropatii wykorzystuje się również badania elektrofizjologiczne: badania elektromiograficzne (EMG) oraz badania szybkości przewodzenia nerwowego (elektro-neurografia) [75]. Badanie elektromiograficzne opiera się na analizowaniu czynności elektrycznej mięśni; polega na rejestracji potencjałów z mięśni w czasie spoczynku, jak również niewielkiego i maksymalnego skurczu. Elektro-neurografia to badanie przewodnictwa impulsów we włóknach czuciowych i ruchowych nerwów obwodowych.

Standardowe badania elektrofizjologiczne nie pozwalają wykryć zaburzeń czynności drobnych włókien nerwowych, dlatego konieczne są pomiary progów pobudliwości czuciowej, nerwowo-naczyniowej i autonomicznej [143].

W cukrzycy typu 2 zwolnienie przewodnictwa nerwowego bywa najwcześniej rozpoznawanym objawem neuropatii, często występuje już w momencie rozpoznania cukrzycy [143].

U chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną istotne jest określenie wskaźnika kostkowo-ramiennego (ang. *ankle-brachial index*, ABI), które możliwe jest dzięki pomiarowi ciśnienia skurczowego w tętnicach stopy przy użyciu ultrasonografii Dopplera oraz ciśnienia skurczowego w obrębie ramienia (rutynowy pomiar ciśnienia tętniczego). Prawidłowe wartości ilorazu ciśnienia na tętnicy piszczelowej tylnej lub grzbietowej stopy i tętnicy ramiennej to 0,9-1,3 [75]. Wartość ABI <0,7 wskazuje na niedokrwienie, a wartość poniżej 0,5 na krytyczne niedokrwienie i jest wskazaniem do operacji [59]. Ocena kliniczna obejmuje

obecność ropnej wydzieliny i typowych objawów zakażenia. Ból i wrażliwość na temperaturę mogą nie występować u chorych z neuropatią, natomiast u chorych z niedokrwieniem nie obserwuje się zaczerwienienia [11]. U chorych z podejrzeniem zakażenia należy przeprowadzić badania mikrobiologiczne i laboratoryjne.

W zależności od stanu chorego kolejne etapy postępowania leczniczego obejmują: oczyszczenie rany, redukcję zakażenia, zastosowanie opatrunków ułatwiających gojenie, rewaskularyzację niedokrwionych tkanek, zmniejszenie obciążenia miejsc z owrzodzeniem [65].

Większość zakażonych owrzodzeń wymaga interwencji chirurgicznej, od niewielkiego chirurgicznego oczyszczania owrzodzenia do dużych amputacji i operacji rekonstrukcyjnych tętnic [6]. U chorych z martwicą suchą, z bólami spoczynkowymi i chromaniem przestankowym operacja rekonstrukcyjna jest zabiegiem z wyboru.

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego w leczeniu ran łagodnych początkowo stosuje się antybiotykoterapię empiryczną, a następnie celowaną. W pierwszym etapie wprowadza się antybiotyki o szerokim spektrum działania obejmującym bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne [15]. Oczyszczanie rany i terapia antybiotykami powinny być inicjowane już na wczesnym etapie rozwoju owrzodzenia, aby nie dopuścić do powstawania trudno gojącej się rany [92].

Początkowo poleca się cefalosporyny I generacji, klindamycynę, fluorochinolony, amoksycylinę z kwasem klawulanowym. W umiarkowanych infekcjach IWGDF zaleca stosowanie amoksycyliny z klawulanianem, cefalosporyny II/III generacji oraz klindamycynę z ciprofloksacyną. U chorych z ciężkimi infekcjami stosuje się wankomycynę z imipenemem/cilastyną, wankomycynę lub linezolid z cefalosporyną III/IV generacji bądź fluorochinolonom i metronidazolem, a także karbapenemy [75]. Antybiotyki glikopeptydowe: wankomycyna i teikoplanina są zwykle stosowane przeciwko wieloopornym gronkowcom. Ostatnie doniesienia wskazują na zmniejszoną wrażliwość enterokoków i gronkowców na antybiotyki glikopeptydowe [87].

1.2.3.4. Owrzodzenia w zespole stopy cukrzycowej

Największym problemem w procesie gojenia się owrzodzeń jest występowanie zakażenia. Za powstawanie zakażenia w przewlekłych ranach odpowiedzialne jest współwystępowanie martwicy tkanek i niskiego stężenia tlenu, które stwarzają bakteriom idealne warunki do funkcjonowania [60]. Tlen umożliwia proliferację fibroblastów, a także hydroksylację proliny i lizyny, co jest niezbędne w uwalnianiu kolagenu z fibroblastów i włączaniu go w budującą się macierz. Uszkodzenie tkanek i zakażenie skutkują lokalnym niedotlenieniem. Niedotlenienie (przy ciśnieniu parcjalnym tlenu <15mm Hg) wpływa

na zaburzoną produkcję kolagenu, uniemożliwia migrację fibroblastów, przyczynia się do lizy komórek i uwolnienia enzymów proteolitycznych powodujących uszkodzenie tkanek [77]. Przy wzroście ciśnienia tlenu z wartości 15 mm Hg do 40 mm Hg produkcja kolagenu wzrasta 7 razy [113].

Optymalny proces gojenia się owrzodzenia wymaga kilku etapów: stanu zapalnego, proliferacji komórek mezenchymalnych w miejscu rany połączonej z tworzeniem nowych naczyń krwionośnych i nabłonka, syntezy kolagenu oraz przebudowy [34]. W proces regulacji kolejnych etapów gojenia owrzodzeń zaangażowanych jest wiele komórek: keratynocyty, komórki Langerhansa, fibroblasty, komórki śródbłonka naczyń, makrofagi, granulocyty i limfocyty [48].

Komórkowa odpowiedź na uszkodzenie obejmuje aktywację keratynocytów, fibroblastów, komórek śródbłonka, makrofagów i płytek krwi. Wiele czynników wzrostu i cytokin uwalnianych przez te komórki jest niezbędnych do koordynowania procesu gojenia owrzodzenia [17]. Na brzegu owrzodzenia w zespole stopy cukrzycowej obserwuje się wysoką aktywność proliferacyjną keratynocytów. Jednakże przemieszczanie się keratynocytów po utworzonej w tkance ziarninie wykazuje znaczne spowolnienie [44]. Upośledzona migracja leukocytów do miejsca zakażenia ułatwia bakteryjną kolonizację [47]. Na szybkość napływu leukocytów do miejsca uszkodzenia wpływają czynniki chemotaktyczne i czynniki wzrostu uwalniane przez komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej, a także przez keratynocyty, fibroblasty i komórki śródbłonka [47]. Granulocyty dominują w pierwszym etapie odpowiedzi immunologicznej i pozostają w trudno gojących się owrzodzeniach przez długi czas. Na brzegu owrzodzenia obserwuje się występujące w dużych ilościach makrofagi, które odgrywają zasadniczą rolę w granulacji tkanki [48]. Gałkowska i wsp. [47] udowodnili, że w warstwie naskórka ekspresja czynników odpowiedzialnych za proliferację i migrację keratynocytów jest podwyższona. Ponadto obserwuje się niską ekspresję czynników związanych z tworzeniem nowych naczyń krwionośnych [47]. Ci sami autorzy [48] zaobserwowali u chorych z owrzodzeniem w przebiegu ZSC zwiększone występowanie cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję limfocytów, monocytów, eozynofili i bazofili do śródbłonka naczyń krwionośnych (VCAM-1, cząsteczka adhezyjna komórek naczyń krwionośnych). Czynniki te mogą stanowić marker zmian w funkcjonowaniu komórek śródbłonka naczyń krwionośnych chorych z cukrzycą.

W odpowiedzi humoralnej biorą udział: metaloproteiny (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs), czynniki wzrostu i cytokiny, białka odpowiedzialne za komunikację pomiędzy komórkami [67]. Metaloproteiny uczestniczą w fazie gojenia się ran poprzez usuwanie uszkodzonych tkanek. MMPs obecne w niewielkiej ilości stanowią prawidłowy element procesu gojenia i przebudowy ran. Są również niezbędne w procesie

tworzenia nowych naczyń krwionośnych, migracji fibroblastów i keratynocytów oraz wytwarzaniu komórek śródbłonna, zaś nadmierna ilość MMPs przyczynia się do spowolnienia gojenia się owrzodzeń [14]. Obecność mikroorganizmów niekorzystnie wpływa na te procesy [70].

Niewłaściwe nabłonkowanie w przewlekłych owrzodzeniach w zespole stopy cukrzycowej związane jest z występowaniem zmian w środowisku dna owrzodzenia spowodowanych zakażeniem oraz ograniczoną dostępnością składników odżywczych [53].

1.3. Bakterie w cukrzycy

Organizm ludzki stanowi środowisko życia dla wielu typów mikroorganizmów [17]. Drobnoustroje bytujące w różnych niszach organizmu mogą przyczynić się do zakażeń ran i owrzodzeń. Mikroorganizmy zasiedlające układ pokarmowy i układ moczowo-płciowy stanowią potencjalne źródło rozwoju zakażenia w innych obszarach ciała [17]. Kolonizacja organizmu przez szczepy *S.aureus* MRSA może stanowić czynnik ryzyka rozwoju zakażeń tymi bakteriami w innym obszarze organizmu, m.in. na stopach.

Bowling i wsp. [17] wykazali, że szczepy MRSA bytujące w jamie nosowej chorych i w rejonie stóp to te same drobnoustroje.

Zbyt małą rolę w rozwoju owrzodzeń cukrzycowych przypisuje się własnym bakteriom chorego pochodzącym ze stóp i podudzi [150]. Skóra stóp i podudzi stanowi środowisko życia wielu szczepów bakteryjnych, które nie występują w innych obszarach organizmu. Bakterie te stanowią florę saprofityczną, w większości należącą do koagulazo-ujemnych gronkowców. Bakterie pochodzące z okolic odbytu i narządów płciowych przemieszczają się i kolonizują skórę stóp. Ponadto śródbłonek limfatyczny posiada zdolność transportowania bakterii, stanowiąc ryzyko zakażenia ścian tętnic [150].

Bakterie kolonizujące stopy, zwłaszcza gronkowce, mogą odgrywać istotną rolę w występowaniu powikłań naczyniowych [150]. Niedokrwienie kończyny stwarza korzystne warunki życia dla mikroorganizmów cechujących się wysokim stopniem patogenności, co może przyczyniać do wystąpienia zmian zapalnych. Sama cukrzyca stanowi czynnik ryzyka rozwoju zakażeń bakteryjnych [73].

Profil bakteriologiczny zakażeń u chorych z cukrzycą nie został jednoznacznie ustalony. Wielu badaczy zakłada główną rolę tlenowych, Gram-dodatnich ziarniaków, a zwłaszcza dominującego *Staphylococcus aureus*. Niektórzy twierdzą, że to bakterie beztlenowe (np. *Peptostreptococcus*) przeważają u chorych ze stopą cukrzycową, ze względu na występowanie niskiego poziomu tlenu, co sprzyja wzrostowi tych mikroorganizmów. Według Citron i wsp. gronkowce stanowią ok. 24% zidentyfikowanych bakterii w owrzodzeniach stopy cukrzycowej, spośród których 55% to *S.aureus* [25,133].

Badania mikrobiologiczne wykonywane u pacjentów z owrzodzeniem stopy cukrzycowej wykazały obecność wielu, średnio 5-6 gatunków bakterii [125].

Poza *S.aureus* i *S.epidermidis* izoluje się także inne koagulazoujemne gronkowce oraz inne bakterie- *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. i *Enterobacteriaceae* (*Proteus* spp., *E.coli*, *Klebsiella* spp. i *Enterococcus* spp.) [125]. *Enterococcus* zazwyczaj nie jest patogenem. Leczenia wymagają jedynie szczepy VRE odporne na wankomycynę [75]. Hospitalizacja, zabiegi chirurgiczne i długi czas przyjmowania antybiotyków o szerokim zakresie działania predysponują pacjentów do kolonizacji i infekcji bakteryjnej z obecnością metycylinoopornych *S.aureus* (MRSA) i wankomycynoopornych paciorkowców.

S.aureus i *S.epidermidis*, szczegółowo analizowane w pracy doktorskiej, należą do bakterii najczęściej izolowanych z owrzodzeń stopy cukrzycowej. Powyższe gatunki bakterii stanowią ogromny problem kliniczny i przyczyniają do występowania zakażeń, często opornych na liczne antybiotyki. Obecność wymienionych bakterii w owrzodzeniach może prowadzić do poważnych problemów terapeutycznych.

W złożonym kompleksie trudno jest technicznie oddzielić i zidentyfikować więcej niż 3 do 6 gatunków. Wynika to z dużej koncentracji bakterii oraz współzawodnictwa międzygatunkowego. Sekwencjonowanie całego genomu zmniejsza ten problem. Jedynym ograniczeniem jest fakt, że identyfikuje ono DNA zarówno z żywych, jak również martwych bakterii. Molekularne techniki nie są więc powszechnie stosowane do charakteryzowania składu bakteryjnego przewlekłych ran.

Badania mikrobiologiczne stanowią w dalszym ciągu standardowe kryterium rozpoznania infekcji u chorych na cukrzycę. Materiałem obarczonym najmniejszym ryzykiem zanieczyszczenia przypadkowymi bakteriami jest dno rany z wyskrobinami oraz wycinek tkanek głębokich lub kości. Posiewy z wymazów z owrzodzeń nie odzwierciedlają faktycznego składu mikrobiologicznego, ponieważ są dodatkowo zasiedlane przez bakterie pochodzące z ciała chorego oraz ze środowiska [125]. Materiał do badań mikrobiologicznych należy pobierać po chirurgicznym oczyszczeniu rany, ale przed włączeniem empirycznej antybiotykoterapii [75].

Rola obecności bakterii w patogenezie przewlekłych, trudno gojących się owrzodzeń nie jest jasna. Łagodne i umiarkowane rany są zasiedlane przez Gram-dodatnie bakterie, tj. *S.aureus*, *S.epidermidis* i paciorkowce. Spotykamy także inne koagulazoujemne gronkowce, rzadziej *E.coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. czy *Pseudomonas* spp. [75]. W ostrych i przewlekłych ranach środowisko mikrobiologiczne jest najczęściej wielogatunkowe, a populacja bakterii ulega ciągłym zmianom [127].

Infekcje stóp u chorych z cukrzycą zwykle zaczynają się od owrzodzeń skóry. Pomimo, że większość zakażeń pozostaje powierzchowna, w ok. 25% dochodzi do przemieszczania się bakterii ze skóry do głębszych tkanek i/lub kości [11]. Pierwszym etapem po pojawieniu się bakterii w owrzodzeniu jest kolonizacja, która charakteryzuje się obecnością namnażających się bakterii bez widocznej reakcji immunologicznej ze strony gospodarza. Obecność powyżej 10^5 mikroorganizmów/gram tkanki przyczynia się do wolniejszego gojenia rany [23].

W sytuacji osłabionego działania układu immunologicznego gospodarza kolonizacja może przekształcić się w zakażenie. Kliniczne oznaki zakażenia to ból, zmiana koloru rany, gorsza lub nieobecna granulacja tkanki oraz nieprzyjemny zapach rany [54].

Trudno jest określić, które bakterie zakłócają prawidłowe gojenie się ran, które są obojętne dla gojenia, a które gojenie ułatwiają [23]. Niedokrwienie tkanek w wolno gojących się owrzodzeniach może stanowić korzystniejsze środowisko dla kolonizacji pewnej grupy mikroorganizmów w porównaniu z innymi drobnoustrojami [52].

Powszechnie występowanie gronkowców w środowisku skutkuje obecnością zakażeń zarówno w szpitalach, jak również w pozaszpitalnej populacji chorych. W środowisku szpitalnym przenoszenie drobnoustrojów między pacjentami jest bardzo ułatwione ze względu na kontakt z personelem medycznym i innymi pacjentami lub sprzętem medycznym.

Chorobotwórczość bakterii jest uzależniona od ich zdolności do produkcji czynników wirulencji włączonych w kolonizację i inwazję tkanek gospodarza. Dla lepszej oceny ryzyka występowania patogennych szczepów istotne jest, poza poznaniem ilości mikroorganizmów, zbadanie obecności czynników chorobotwórczości (wirulencji) [79].

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Najbardziej chorobotwórczym gatunkiem z rodzaju *Staphylococcus*, wytwarzającym największą liczbę czynników chorobotwórczości jest *Staphylococcus aureus* [149]. Stałe kolonizuje on około 30% populacji, ale ze względu na wytwarzanie wielu czynników odpowiedzialnych za chorobotwórczość nie może być uważany za składnik normalnej flory bakteryjnej człowieka.

S.aureus powoduje ostre, często zagrażające życiu infekcje związane z owrzodzeniami skóry i ranami pooperacyjnymi, zakażenia układowe i narządowe, zapalenie wsierdza, kości i szpiku, zapalenie płuc, zatrucia pokarmowe [63]. Bakteria ta stanowi najczęstszy patogen w przypadkach zakażenia stopy cukrzycowej pojedynczym szczepem bakterii [125].

1.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

Koagulazoujemne gronkowce (CoNS) to składnik flory bakteryjnej skóry i błon śluzowych zdrowych ludzi; mogą być także czynnikiem patogennym u chorych z zakażeniami implantów ortopedycznych, zastawek serca, protez naczyniowych i zakażeniami układu moczowego [20].

Najbardziej powszechnym gatunkiem jest *S.epidermidis* [107]. Przez długi czas *S.epidermidis* uważany był za nieszkodliwy drobnoustrój. Badania wskazują jednak, że jest to patogen oportunistyczny i w sprzyjających warunkach, przy obniżonej odporności gospodarza, może przyczyniać się do rozwoju zakażeń. *S.epidermidis* może zapobiegać kolonizacji organizmu gospodarza przez bardziej wirulentne mikroorganizmy, takie jak *S.aureus*. Nie potwierdzono jednak, czy *S.epidermidis* wydziela czynniki mające wpływ na kolonizację innych drobnoustrojów *in vivo*. Chociaż zakażenia powodowane przez *S.epidermidis* nie zagrażają zwykle bezpośrednio życiu chorego, są one trudne do leczenia i stanowią poważny problem zdrowotny. Trudności wynikają głównie z oporności na antybiotyki i zdolności do tworzenia biofilmu, czyli kolonii bakterii w macierzy zewnątrzkomórkowych polisacharydów (PIA) [138, 110].

1.4. Wirulencja bakterii

W proces zapoczątkowania zakażenia zaangażowane są m.in. takie czynniki bakteryjne jak: zdolność adhezji do powierzchni komórek tkanki gospodarza i ewentualnej penetracji do wnętrza komórki, rozprzestrzenianie się między komórkami (inwazyjność patogena), zdolność do produkcji toksyn, oporność na antybakteryjne czynniki obecne w surowicy. Adhezyny, polisacharydy otoczkowe, białka powierzchniowe, endotoksyny oraz enzymy pozwalają bakteriom kolonizować komórki gospodarza, przestrzenie międzykomórkowe i płyny ustrojowe [141].

Wirulencja bakterii określa ich stopień zjadliwości. Istotnym czynnikiem, od którego zależy wpływ bakterii na organizm gospodarza, jest sprawność układu immunologicznego gospodarza. Mikroorganizm zazwyczaj nie ekspresjonuje czynników wirulencji w organizmie gospodarza o swoistej odporności [141]. Czynnikiem wirulencji są: adhezyny, inwazyjny, zewnątrzkomórkowe enzymy i toksyny, elementy biofilmu. Nagromadzenie czynników wirulencji przyczynia się do zwiększonej oporności bakterii na powszechnie stosowane antybiotyki i w ten sposób ułatwia przetrwanie bakterii w nieprzychylnym środowisku gospodarza [79].

Bakterie *S.aureus* mogą produkować ponad 30 czynników wirulencji, które dzielimy na 2 główne grupy: 1) czynniki związane z powierzchnią komórki bakteryjnej i 2) enzymy

degradujące. Elementy powierzchni rozpoznające adhezyjne cząsteczki macierzy zewnątrzkomórkowej to białka powierzchniowe promujące kolonizację w wyniku związania z macierzą komórkową gospodarza. W skład tej grupy wchodzi białka wiążące fibrynogen, fibronektynę i kolagen. Odgrywają one zasadniczą rolę w początkowej fazie zakażenia, a także decydują o zdolności bakterii do wiązania się do tkanek gospodarza i inicjowania kolonizacji [109].

Bakterie *S. aureus* w dalszym etapie rozwoju zakażenia mogą wydzielać wiele czynników (enzymów i egzotoksyn) pozwalających na pozyskiwanie składników odżywczych, inwazję komórek gospodarza, przeżycie komórek bakteryjnych w organizmie gospodarza i ich rozprzestrzenianie się. Patogenne bakterie produkują enzymy: proteazy, hialuronidazy, lipazy. Czynniki te uczestniczą w destrukcji tkanek. Ważną cechą *S.aureus* jest zdolność do wydzielania toksyn, które formują pory w błonach cytoplazmatycznych i przyczyniają się w ten sposób do lizy komórek [109]. *S.aureus* produkuje toksynę zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1), eksfoliatyny, hemolizyny, leukocydyny oraz gronkowcowe enterotoksyny (SE). Toksyny te mają różny mechanizm działania. Enterotoksyny są odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe, natomiast eksfoliatyny złuszcza naskórek [109]. Eksfoliatyna A (Eta) i eksfoliatyna B (Etb) są ściśle powiązane z zespołem oparzonej skóry. Hemolizyny (alfa, beta gamma i delta) oraz leukocydyny, dzięki zdolnościom cytolitycznym, uszkodzają komórki gospodarza i ułatwiają inwazję tkanek. Hemolizyna alfa oligomeryzuje w błonie komórkowej tworząc pory umożliwiające osmolityczną cytolizę [108]. Wśród czynników wirulencji *S.aureus*, białka powierzchniowe, jak Cna (białko wiążące się do kolagenu) i FnBPA (białko wiążące się do fibronektyny), promują bakteryjną adhezję i kolonizację rany. Bakterie *S.aureus* produkują także liczne toksyny, m.in. eksfoliatyny Eta i Etd, przyczyniające się do złuszczenia naskórka [103]. Z kolei egzotoksyna, Edin, hamuje różnicowanie się komórek naskórka [28].

S.epidermidis produkuje także adhezyny, m.in. AtlE, stanowiącą główną autolizynę umożliwiającą wiązanie się bakterii do białek gospodarza [144]. Bakterie *S. aureus* i *S. epidermidis* przylegają do owrzodzonej tkanki i są zdolne do tworzenia biofilmu. Bakteryjny biofilm odgrywa rolę m.in. w patogenezie zakażeń, w kolonizacji sprzętów medycznych oraz tkanek. Wytwarzanie biofilmu związane jest z obecnością operonu *icaADBC* [116]. Sekwencja insercyjna *IS256* ma wpływ na występowanie inwazyjnego biofilmu u bakterii *S.epidermidis* i dlatego może stanowić marker patogenności tego gatunku [77].

1.4.1. Czynniki wirulencji *S.aureus*

1.4.1.1. FnBP - białko wiążące fibronektynę

S.aureus wykazuje ekspresję licznych białek powierzchniowych rozpoznających adhezyjne cząsteczki macierzy (ang. *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMM), które odgrywają znaczącą rolę w kolonizacji tkanek gospodarza i wirulencji bakterii [21].

Bakterie mogą przylegać do nieuszkodzonych komórek śródbłonka albo poprzez receptory adhezyjne albo poprzez pomostowe ligandy: fibrynogen, fibronektynę, kolagen, witronektynę, elastynę, protrombinę, czynnik von Willebrandta.

Adhezyny to bakteryjne powierzchniowe białka rozpoznające struktury (receptory) na powierzchni gospodarza, ułatwiające kolonizację, a także wzrost bakterii w organizmie gospodarza [39]. Duża liczba adhezyn niezbędnych dla rozpoznania różnych receptorów wydaje się stanowić ważny czynnik w rozwoju zakażeń i może zwiększać patogenność szczepów.

Do głównych adhezyn należą białka wiążące fibronektynę (FnBP). Stanowią one wielofunkcyjne MSCRAMM i pełnią kluczową rolę w inwazji komórek eukariotycznych przez bakterie *S.aureus*. Większość szczepów bakteryjnych rozróżnianych we florze szpitalnej (77%) koduje dwa białka wiążące fibronektynę: FnBPA i FnBPB [27]. Białka te są kodowane przez geny *fnbA* i *fnbB* i uczestniczą w wiązaniu się bakterii do składników macierzy zewnątrzkomórkowej [124]. Białko wiążące fibronektynę może funkcjonować zarówno jako adhezyna, jak również jako inwazyjna w procesie adhezji [76].

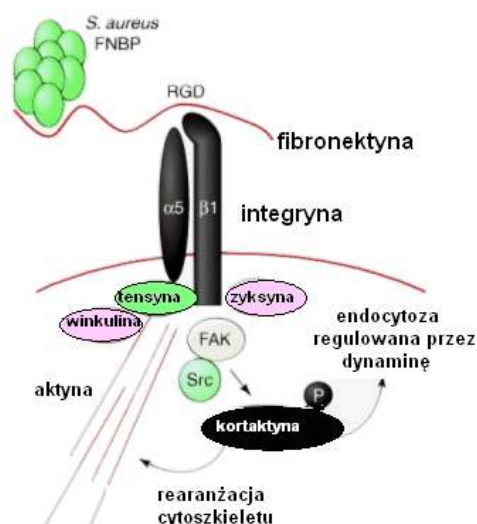
Białka FnBP są znacząco powiązane z zakażeniem ogólnoustrojowym, nagłą utratą wagi i śmiertelnością w modelu zwierzęcym sepsy u gryzoni. Białko FnBPA może ułatwiać kolonizację zastawek serca, a także napływ bakterii do śledziony, co sprzyja powstawaniu zakażeń tych narządów [32].

Domeny białka FnBPA odgrywają dwie role: równoległą (wiązanie fibrynogenu inicjuje chorobę) i synergistyczną (związaną z rozwojem choroby). Wiązanie fibrynogenu występuje we wczesnym etapie procesu zakażenia, podczas gdy wiązanie fibronektyny następuje w późniejszym czasie [108].

Sekwencje aminokwasowe fragmentów wiążących fibronektynę są wysoce konserwatywne u części szczepów (95% zgodności), w przeciwieństwie do domen wiążących fibrynogen i elastynę, znacznie różniących się u różnych szczepów (45% zgodności) [21].

Białka FnBP, jako czynniki powierzchniowe inicjujące adhezję bakterii *S.aureus* do komórek gospodarza, wiążą się z fibronektyną pełniącą rolę cząsteczki pośredniczącej

w wiązaniu się do integryny $\alpha_5\beta_1$. Integryna ta jest głównym receptorem dla wiązania się fibronektyny na powierzchni komórek gospodarza. Związanie to aktywuje liczne białka strukturalne i enzymy uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w komórce oraz w aktywacji wielu cząsteczek efektorowych powodujących polimeryzację aktyny i reorganizację cytoszkieletu komórki. Wynikiem tych procesów jest endocytoza bakterii do wnętrza komórki gospodarza [54].



Rycina 1. Wnikanie komórek bakteryjnych *S.aureus* do wnętrza komórek gospodarza- na podstawie [54] - rycina zmodyfikowana

FAK- kinaza adhezji miejscowej, RGD- motyw wiążący integrynę $\alpha_5\beta_1$ (Arg-Gly-Asp), Src—rodzina kinaz białkowych biorących udział w przekazywaniu sygnałów w komórce

Sekwencja polipeptydu FnBPA składa się z 11 różnych powtórzeń aminokwasowych, które pośredniczą w wiązaniu się do fibronektyny [32]. Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym sepsy wskazują, że liczba powtórzeń ma znaczący wpływ na wirulencję. Bakterie *S.aureus* wydzielające białka FnBPA bez lub z kilkoma powtórzeniami są znacznie mniej wirulentne w porównaniu z białkami FnBPA zawierającymi wszystkie powtórzenia [32].

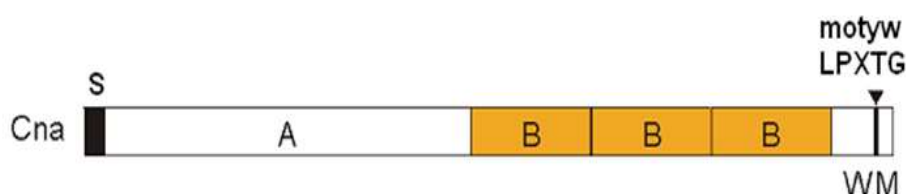
1.4.1.2. Białko wiążące kolagen Cna

Białko wiążące kolagen należy do adhezyn powierzchniowych i kodowane jest przez gen *cna*. Umożliwia bakteriom wiązanie kolagenu oraz tkanek zawierających kolagen stanowiąc czynnik patogenezы zapalenia kości, stawów i wsierdzia [109].

Białko Cna posiada N-końcowy peptyd sygnałny, a także region A o masie 55 kDa nie zawierający powtórzeń, region B, w skład którego wchodzi 1-4 powtórzone jednostki o masie 25 kDa, region kotwiczący białko w ścianie komórkowej, segment

transbłonowy oraz krótki fragment cytoplazmatyczny [58]. Region A zawiera fragment peptydowy o masie cząsteczkowej 19 kDa, który odpowiedzialny jest za wiązanie się do kilku typów kolagenu.

Mechanizm działania białka Cna jako czynnika wirulencji nie jest jasny. U szczepów *S.aureus* zidentyfikowano trzy rodzaje białka Cna posiadające tę samą zdolność wiązania kolagenu, lecz różną masę cząsteczkową. Znalaziono również formę białka Cna, która nie wiąże kolagenu z powodu mutacji punktowej. Białka pełniące analogiczne funkcje do Cna odnaleziono również w innych bakteriach m.in. Ace (*Enterococcus faecalis*), Acm (*Enterococcus faecium*), Cne (*Streptococcus equi*). Białka te posiadają domenę podobną do domeny A w białku Cna, która odpowiada za zdolność do wiązania kolagenu [146].



Rycina 2. Schemat budowy białka wiążącego kolagen.

S- peptyd sygnałowy, A, B - domeny, W- region zlokalizowany w ścianie komórkowej, M- region znajdujący się w błonie komórkowej, motyw LPXTG (leucyna, prolina, x-dowolny aminokwas, treonina, glicyna) – element białek rozpoznawanych przez sortazę [67]

1.4.1.3. Toksyna Eta

Eksfoliatyny należą do rodziny toksyn gorączkotwórczych o aktywności superantygenów. Wyróżnia się cztery rodzaje: eksfoliatynę A (Eta), B (Etb), C (Etc) i D (Etd) [100].

Eksfoliatyny A i B powodują gronkowcowy zespół oparzonej skóry (SSS) i liszajec pęcherzowy. Eksfoliatynę C po raz pierwszy wyizolowano z zakażenia skóry u konia. Eksfoliatyna D jest odpowiedzialna za zakażenia skóry u ludzi.

Eksfoliatyny uszkadzają desmoglobinę-1 (Dsg-1), glikoproteinę wytwarzaną wyłącznie w skórze, która występuje w połączeniach pomiędzy keratynocytami (desmosomami). W wyniku uszkodzenia Dsg-1 następuje rozdzielanie keratynocytów, co skutkuje złuszczeniem się naskórka i powstawaniem pęcherzy. Bakterie wnikają wówczas do głębszych warstw naskórka [2].

1.4.1.4. Inhibitor różnicowania się komórek naskórka Edin oraz eksfoliatyna Etd

Inhibitor różnicowania się komórek naskórka to egzotoksyna przyczyniająca się do formowania dużych międzykomórkowych tuneli, makrootworów w komórkach śródbłonna, a także hamująca proces różnicowania się komórek naskórka.

Szczepki *S.aureus* wytwarzają egzotoksyny Edin należące do 3 typów: Edin-A, Edin-B lub Edin-C [93]. Egzotoksyna Edin może wzmacniać inwazyjną zdolność szczepów *S.aureus*. Szczepki posiadające gen *edin* często są odpowiedzialne za zakażenia głębokie tkanek miękkich. Toksyna Edin ma wpływ na podstawowe procesy komórkowe, m.in. fagocytozę [94].

Geny *edin-B* i *etd* stanowią centralną część wyspy patogeniczności [42]. Wyspy patogeniczności to duże (10-200 kbp) regiony genomu skupiające geny dla czynników wirulencji. Zaobserwowano współwystępowanie genów inhibitora różnicowania się komórek naskórka z eksfoliatyną D.

Badanie funkcji eksfoliatyn na mysim modelu wskazuje na indukcję wewnątrzskórnego rozrywania wiązań przez białko Etd. Pełna rola Etd nie została do końca poznana, trwają intensywne badania tej eksfoliatyny [83].

Rekombinowana toksyna Edin, a także toksyna Edin wytwarzana przez *S.aureus* dostają się do wnętrza komórek na drodze endocytozy i hamują proces gojenia się ran na poziomie komórek śródbłonna [42].

1.4.1.5. Leukocydyna PVL

PVL jest cytotoksyną formującą pory w ludzkich komórkach jedno- i wielojądrzastych, przyczyniającą się do destrukcji leukocytów i martwicy tkanek. Może stanowić potencjalny czynnik wirulencji powiązany z martwiczymi owrzodzeniami skóry i tkanek podskórnych.

W Europie Zachodniej leukocydyna PVL jest wykrywana w niewielkiej liczbie szczepów *S.aureus* pochodzących od zdrowych ochotników (ok. 5%). Zidentyfikowano ją natomiast u 55% szczepów pochodzących z zapalenia tkanki łącznej, 50% szczepów z owrzodzeń skórnych i 23% szczepów z zapalenia kości. Brak jest tego czynnika w szczepach odpowiedzialnych za inne zakażenia, takie jak zapalenia wsierdza, szpitalne zapalenie płuc czy zakażenia układu moczowego [83].

1.4.1.6. Gen oporności na metycylinę *mecA*

S.aureus jest powszechnie znany ze swych zdolności do szybkiego nabywania oporności na antybiotyki. Oporność bakteryjna ma znaczący wpływ na wzmocnienie

wirulencji, opóźnione działanie terapii leczniczej, dłuższą hospitalizację i czas powrotu do sprawności fizycznej u chorych [87].

Po rozprzestrzenieniu się oporności bakterii na penicylinę w XX w. metycylina stała się antybiotykiem pierwszego wyboru dla zakażeń *S.aureus*. Metycylina jest antybiotykiem ważnym klinicznie, ponieważ oporność na ten lek oznacza oporność *in vivo* na wszystkie antybiotyki β -laktamowe [49].

Po początkowym okresie dużej aktywności w leczeniu zakażeń gronkowcowych, *S.aureus* szybko nabył oporność na antybiotyki β -laktamowe (już 2 lata po wprowadzeniu penicyliny do leczenia), przy czym cecha ta przeważa w szczepach produkujących śluz (81%) w porównaniu do szczepów nie produkujących śluzu (57%) [136]. Obecnie kliniczne szczepy w ok. 91% są odporne na penicylinę, a u ok. 80% szczepów szpitalnych i 30-40% izolatów otrzymanych od zdrowych ochotników lub chorych nie hospitalizowanych obserwuje się oporność na metycylinę. Oporność na metycylinę występuje bardzo często również u koagulazoujemnych gronkowców, takich jak *S.epidermidis* [126].

Ponad 50% szczepów *S.aureus* izolowanych z owrzodzeń stopy cukrzycowej to MRSA, przeważają one także u chorych z zakażoną stopą cukrzycową.

Szczepy *S.aureus* odporne na metycylinę charakteryzują się obecnością dużego ruchomego elementu genetycznego nazywanego gronkowcą kasetą chromosomową (SCC*mec*), która może być przenoszona pomiędzy poszczególnymi gronkowcami [148, 101]. Kasetę zawiera gen *mecA*, który koduje zmienione białko wiążące penicylinę PBP2a, z niską zdolnością wiązania się do wszystkich β -laktamów [61]. PBP2a umożliwia transpeptydację warstwy peptydoglikanu w obecności antybiotyku, przyczyniając się do ułatwionego wzrastania szczepów MRSA w środowisku o dużym stężeniu antybiotyku [61].

Wśród bakterii z rodzaju *Staphylococcus* opisano pięć typów kaset SCC*mec* (I-V). Szczepy szpitalne odporne na metycylinę charakteryzują się występowaniem kaset SCC*mec* należących do typów I-III, natomiast szczepy pozaszpitalne zawierają kasetę typu IV [12].

Mechanizm odpowiedzialny za transfer genu *mecA* nie jest znany. Postuluje się, że możliwy jest horyzontalny transfer genu pomiędzy gronkowcami, a innymi bakteriami Gram-dodatnimi. Sugeruje się, że transfer genu *mecA* następuje od CoNS do *S.aureus* [53].

1.4.2. Czynniki wirulencji *S.epidermidis*

1.4.2.1. AtlE - autolizyna bakterii *S.epidermidis*

Produkt genu *atl* (Atl) u szczepów *S.aureus* jest główną autolizyną powierzchniową. Odpowiednikiem tego białka u *S.epidermidis* jest gen *atlE* i jego produkt AtlE, który odgrywa kluczową rolę w adhezji, poprzez bezpośrednią reakcję z powierzchnią hydrofobową protez [16]. Białko AtlE posiada także zdolność do wiązania się do witronektyny i fibronektyny [13]. Mutacje w genie *atlE* przyczyniają się do zredukowanej zdolności do kolonizowania powierzchni polimerowych. Poza tym mutanty genu *atlE* tracą zdolność do wiązania się do witronektyny.

Gen *atl* koduje dwufunkcyjną peptydoglikanową hydrolazę bakterii *S.aureus*. Peptydoglikanohydrolazy są grupą enzymów biorących udział w rozkładzie i obrocie peptydoglikanu u bakterii. Odgrywają więc rolę w patogenezie zakażeń bakteryjnych. Wskutek aktywacji specyficznych peptydoglikanohydrolaz zwanych autolizynami, komórki bakterii ulegają lizie [80]. Dzięki oddziaływaniom hydrofobowym z powierzchnią AtlE umożliwia zapoczątkowanie tworzenia biofilmu, czyli pierwotne przyleganie bakterii.

1.4.2.2. Sekwencja insercyjna *IS256*

Sekwencja *IS256* należy do rodziny sekwencji insercyjnych, które obecne są w szerokim kręgu bakteryjnych rodzajów: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Lactobacillus* i *Yersinia* [57]. Obecność wielu kopii *IS256* odpowiada za zdolność *S.epidermidis* do adaptowania się do warunków środowiska. Genomowe rearanżacje wynikające z wstawiania i wycinania sekwencji *IS256* wpływają na ułatwioną adaptację bakterii *S.epidermidis* do środowiska szpitalnego [61].

Sekwencja insercyjna *IS256* wpływa na ekspresję operonu *icaADBC*, formowanie biofilmu i oporność aminoglikozydową szczepów *S.epidermidis* [81]. *IS256* uczestniczy w fazie różnicowania się bakterii podczas ekspresji operonu *icaADBC* [122]. Potwierdzono, że niektóre szczepy mogą nabywać bądź tracić zdolność do produkcji biofilmu poprzez wstawienie lub wycięcie sekwencji insercyjnej *IS256* do genów *icaA*, *icaB* albo *icaC* [38].

Obecność *IS256* skutkuje opornością większości izolatów bakteryjnych na aminoglikozydy, ponieważ powiązana jest ona z pośredniczącym w oporności aminoglikozydowej, transpozonom Tn4001 [41]. Dodatkowo *IS256* łączy się z występowaniem oporności antybiotykowej przeciwko penicylinie, cefalosporynom, makrolidom, chinolonom, tetracyklinie, klindamycynie, ryfampicynie, jak również oporności wielolekowej.

Czynniki wirulencji: operon *icaADBC*, sekwencja *IS256* i oporność antybiotykowa współistnieją w większości izolatów bakteryjnych, które są powszechne w środowisku szpitalnym [91]. Ponieważ sekwencja *IS256* występuje często w szczepach pochodzenia klinicznego, uznawana jest za marker rozróżniający szczepy *S.epidermidis* inwazyjne od komensalnych [105]. *IS256* zidentyfikowano jako typowy marker wieloopornych szczepów szpitalnych, a także tworzących biofilm szczepów przyczyniających się do powstania oportunistycznych zakażeń [57].

1.5. Biofilm

Biofilm to kompleks współistniejących mikroorganizmów, umieszczonych w macierzy międzykomórkowej, w którym nawet odległe od siebie szczepy pozostają we wzajemnej zależności [85].

Większość bakterii wywołujących zakażenia stanowi naturalną mikroflorę człowieka i jako nieszkodliwe bakterie komensalne wytwarza biofilmy. W takim przypadku biofilm odgrywa ochronną oraz korzystną rolę w organizmie gospodarza. W niesprzyjających warunkach środowiska „nieszkodliwy” biofilm przekształcany jest w patogenny, odgrywając rolę w patogenezie zakażeń przewodu pokarmowego, układu moczowego, przewlekłym zapaleniu oskrzeli, zapaleniu wsierdza [140,77]. Gronkowce produkujące biofilm odpowiedzialne są za zakażenia implantów naczyniowych, cewników, zastawek serca oraz stentów wieńcowych, co może stanowić źródło rozprzestrzeniania się bakterii *S.aureus* do innych miejsc organizmu [106].

Badania przeprowadzone przez Plata i wsp. [109] wskazują, że wśród klinicznych izolatów *S.aureus* 45-75% szczepów (w zależności od rodzaju zakażenia) posiada zdolność do formowania biofilmu. Szacuje się, że ok. 65% szpitalnych zakażeń, a 80% wszystkich znanych zakażeń jest związanych z występowaniem tej struktury [137,142].

Wydłużająca się ekspozycja na bakterie tworzące biofilm w przypadku trudno gojących się ran może prowadzić do długotrwałej odpowiedzi zapalnej i zaburzeń w procesie gojenia się [104].

Bakterie w biofilmie charakteryzują się zmienioną charakterystyką wzrostu. Ponadto znacznie różnią się ekspresją genów od bakterii pozostających w formie rozproszonej [130]. W biofilmie rozpraszanie składników odżywczych i witamin jest spowolnione, w związku z czym część bakterii jest metabolicznie nieaktywna. Bakterie wewnątrz biofilmu mają ograniczoną przestrzeń do wzrastania i rosną wolniej. Z tego powodu stanowią trudniejszy cel dla antybiotyków, które działają głównie na bakterie rosnące szybko [122]. Dodatkowo

dostępność bakterii w biofilmie dla układu obronnego gospodarza jest utrudniona, a antybiotyki nie docierają do miejsca docelowego.

W większości biofilmów mikroorganizmy stanowią mniej niż 10% suchej masy, podczas gdy macierz zewnątrzkomórkowa to aż 90%.

Macierzą określa się konglomerat różnych typów biopolimerów, znanych jako zewnątrzkomórkowe polimery (ang. *extracellular polymeric substances*, EPS), odpowiedzialnych za adhezję do powierzchni, a także formowanie szkieletu dla trójwymiarowej struktury biofilmu. EPS stanowią również źródło składników odżywczych, chronią mikroorganizmy przed wysychaniem, antybiotykami, kationami metali, promieniowaniem UV i systemem immunologicznym gospodarza. Poza wielocukrami macierz zawiera także białka, kwasy nukleinowe, tłuszcze i inne biopolimery oraz jest stabilizowana przez elementy zewnątrzkomórkowe bakterii: pilusy, fimbrie [38].

Macierz wspomaga tworzenie mikrokolonii, a także umożliwia tworzenie ścieżek sygnałowych komórka-komórka, formuje tunele dla przepływu płynów, dopływu substancji odżywczych i odpływu produktów przemiany materii oraz ułatwia transfer genów poprzez procesy koniugacji, transformacji i transdukcji [85]. Wytwarzanie biopolimerów stanowi wyznacznik patogenności u szczepów *S.epidermidis* zarówno w zakażeniach implantów, jak również w zakażeniach nie powiązanych ze sztucznymi materiałami [96].

Rozwój biofilmu jest procesem złożonym i wieloczynnikowym. Mechanizmy odpowiedzialne za jego powstawanie różnią się w zależności od warunków środowiskowych i specyficznych cech bakterii. Na powstawanie biofilmu u gronkowców wpływają liczne czynniki środowiskowe: wzbogacenie podłoża hodowlanego w glukozę, NaCl, cytrynian sodowy, żelazo, heparynę, a ponadto wysoka osmolalność, dostępność tlenu, obecność etanolu, temperatura [136].

Biofilm wytwarzany jest w krótkim czasie po adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni (3-4 godziny), gdy wzrost bakterii ulega, po początkowym okresie adaptacji, przyspieszeniu. Rozpoczyna się formowanie polimerów, co nasila adhezję bakterii do powierzchni i tworzenie agregatów [35]. Powstawanie biofilmu jest procesem dynamicznym i obejmuje cztery etapy:

a) początkową adhezję - autolizyna AtlE, umożliwia zapoczątkowanie tworzenia biofilmu poprzez oddziaływania hydrofobowe z powierzchnią „nagą” lub pokrytą białkami gospodarza: witronektyną, fibronektyną, fibrynogenem, kolagenem, lamininą,

b) agregację komórek bakteryjnych powiązaną z międzykomórkową adhezyną polisacharydową PIA (ang. polysaccharide intercellular adhesin), białkami- Bap, Aap, FnBP i zewnątrzkomórkowym DNA z bakterii, które uległy lizie,

c) dojrzewanie - wzrost bakterii w warunkach tlenowych i beztlenowych,

d) dyspersję - odpowiada za rozprzestrzenianie się zakażenia, obejmuje syntezę proteaz, nukleaz i innych enzymów [35].

Bakterie w biofilmie są trudne do izolacji, dlatego diagnoza zakażeń przez nie wywoływanych wymaga technik innych od tych, które stosowane są w konwencjonalnej mikrobiologii [61]. Zakażenia związane z biofilmem tworzonym przez gronkowce są zwykle jednogatunkowe. Wyjaśnieniem tego zjawiska mogą być dobrze rozwinięte ścieżki sygnałowe między komórkami bakteryjnymi gronkowców, które prowadzą do zahamowania ekspresji czynników wirulencji innych rodzajów bakterii, bądź też ewolucyjna adaptacja bakterii do specyficznego środowiska (np. *S.epidermidis* do powierzchni skóry) [101].

1.5.1. Operon *icaADBC* i międzykomórkowa adhezyna polisacharydowa PIA

Bakterie *S.aureus* posiadają dwa niezależne mechanizmy wytwarzania biofilmu: 1) powiązany z adhezyną PIA i 2) niezależny od PIA (powiązany z białkami adhezyjnymi oraz globalnymi regulatorami *sarA* i *agr*). Ekspresja regulatora *agr* umożliwia odrywanie się komórek bakteryjnych od biofilmu. Gdy regulator *agr* nie jest aktywny, bakterie pozostają w pierwszej fazie formowania biofilmu i przylegają do powierzchni. Mutacje w regulatorze *agr* przyczyniają się do zwiększonej adherencji i wytwarzania stabilniejszych biofilmów [4].

W formowanie biofilmu u bakterii włączone są geny takie jak: operon *icaADBC*, autolizyna *atlE*, *fruA* (gen kodujący fruktospecyficzne permeazy), *sarA* (białko kodujące regulator) i *sigB* (gen kodujący czynnik sigma) [112].

W skład operonu *icaADBC* wchodzi cztery geny: *icaA* (1238bp), *icaD* (305 bp), *icaB* (869 bp) i *icaC* (1067 bp) kontrolowane przez gen *icaR* (557 bp) [29].

IcaA jest transmembranowym białkiem zawierającym 412 aminokwasy, posiadającym homologię do *N*-acetyloglukozotransferazy. Dla optymalnej aktywności wymaga produktu genu *icaD*. Kooperacja białek IcaA i IcaD wzmacnia aktywność glukozotransferazy, przyczyniając się do produkcji dłuższych fragmentów *N*-acetyloglukozaminy [142]. Gen *icaC* jest włączony w translokację tworzonego polisacharydu do powierzchni komórki.

Związane z powierzchnią białko IcaB odpowiada za deacetylację poli-*N*-acetyloglukozaminy [97]. Usunięcie genu *icaB* z operonu *icaADBC* szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* prowadzi do produkcji adhezyny PIA, która wiąże się mniej efektywnie do powierzchni komórki, co prowadzi do powstania szczepów nie wytwarzających

biofilmu. Nadekspresja genu *icaB* skutkuje powstaniem trwalszych, grubszych biofilmów [117]. Występujący u *S.aureus* i *S.epidermidis* gen *icaR*, o ukierunkowaniu przeciwnym do locusu *icaADBC*, koduje represor odgrywający zasadniczą rolę w środowiskowej regulacji ekspresji operonu *icaADBC* [97].

Przedmiotem największej liczby badań jest operon *icaADBC*, który koduje międzykomórkową adhezynę polisacharydową PIA [36]. Produkcja PIA stanowi obecnie najlepiej zdefiniowany mechanizm formowania biofilmu u bakterii *S.epidermidis* i *S.aureus* [96]. PIA to β -(1,6)-glukozaaminoglikan [63]. Wydzielanie PIA umożliwia początkową adhezję do powierzchni polimerów i pomiędzy bakteriami oraz sygnalizację komórka-komórka, co ułatwia formowanie się biofilmu. Deacylacja PIA jest niezbędna w procesie wiązania PIA do powierzchni komórki, jak również do tworzenia biofilmu, kolonizacji powierzchni i obrony przed odpowiedzią układu immunologicznego gospodarza [36].

Część szczepów izolowanych z biofilmów przy braku operonu *icaADBC* akumuluje biofilm dzięki udziałowi białek Aap i Bap [100].

1.5.2. Quorum sensing

Bakterie mają zdolność syntezy autoprzebieżników, których stężenie w środowisku rośnie w miarę wzrostu gęstości komórek w danej populacji [4]. Sygnały wysyłane przez przebieżniki są rozpoznawane przez wyspecjalizowane białka receptorowe. Odpowiedzią komórek w populacji jest zmiana ekspresji różnorodnych genów kontrolujących ważne szlaki metaboliczne i procesy życiowe. Funkcję cząsteczek sygnałowych u *S.aureus* pełnią oligopeptydy, powstające w wyniku trawienia większych prekursorów białkowych [59]. Powyższe zjawisko, zależne od gęstości występowania komórek, nosi nazwę quorum sensing i odgrywa istotną rolę m.in. w wirulencji, syntezie enzymów, tworzeniu biofilmu [4]. Quorum sensing kontrolowany jest przez system regulatorowy *agr*. Wraz ze wzrostem gęstości występowania bakterii, system *agr* staje się bardziej aktywny i produkuje w dużej ilości zewnątrzkomórkowe egzoenzymy degradacyjne oraz toksyny [145]. Następuje przejście bakterii ze stanu adhezji i komensalnej kolonizacji do powstawania inwazyjnych i agresywnych patogenów.

1.6. Ocena stopnia pokrewieństwa między szczepami

Obowiązkowym postępowaniem w monitorowaniu przenoszenia bakterii *S.aureus* między nosicielami jest typowanie wyodrębnionych izolatów. Klonalność szczepów *S.aureus* umożliwia ocenę poziomu pokrewieństwa między izolatami zależną od czynników środowiskowych [90].

Mikroorganizmy klonalnie pokrewne mają takie same cechy biochemiczne oraz właściwości genomowe. Zaliczenie badanych szczepów do tego samego klonu potwierdza epidemiczny charakter wywoływanych przez nie zakażeń.

Typowanie izolatów bakteryjnych służy kontroli rozprzestrzeniania się nosicielstwa szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* oraz zbieraniu informacji o epidemiach (Państwowa Inspekcja Sanitarna, Wojewódzkie Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne).

Ze względu na klonalny charakter rozprzestrzeniania się zakażeń bakteriami *S.aureus* i *S.epidermidis* istotne jest określenie stopnia pokrewieństwa analizowanych izolatów klinicznych na podstawie markerów epidemiologicznych [90].

Ocena stopnia pokrewieństwa między szczepami ma duże znaczenie z punktu widzenia prawnoroszczeniowego w przypadkach dochodzenia źródła zakażeń u chorych hospitalizowanych. Odpowiada bowiem na pytanie, czy rozwijające się u chorych zakażenie pochodzi z własnych bakterii chorego czy też związane jest z bakteriami nabytymi w trakcie leczenia szpitalnego.

S.aureus to jeden z głównych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych i występowanie szczepów MRSA wiązano w przeszłości z hospitalizacją chorego. W ostatniej dekadzie szczepy MRSA pojawiły się w środowisku pozaszpitalnym i przyczyniają się do występowania zakażeń wśród osób, u których nie zastosowano leczenia szpitalnego. Szczepy te określamy jako CA-MRSA (pozaszpitalne szczepy MRSA). Szczepy CA-MRSA posiadają gen *pvl* i gronkowcową kasetę chromosomową typu IV lub V. Te typy kaset charakteryzują się obecnością genu *mecA* bez dodatkowych genów oporności antybiotykowej. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność przemieszczania się wśród szczepów *S.aureus*, co może prowadzić do zwiększenia populacji szczepów MRSA u osób, które nie są związane ze środowiskiem szpitalnym. Genotypowanie szczepów MRSA umożliwia przydzielenie bakterii do odpowiednich typów, a tym samym ustalenie pochodzenia: szpitalne lub środowiskowe [132].

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena stopnia wirulencji wybranych gronkowców u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej niedokrwiennej oraz neuropatycznej, a także zbadanie podobieństwa genetycznego izolatów *S.aureus* i *S.epidermidis* u poszczególnych chorych.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

- 1) zbadanie częstości występowania genów wirulencji u bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis* izolowanych od chorych z cukrzycą z uwzględnieniem:
 - różnic pomiędzy stopą niedokrwienną a neuropatyczną
 - miejsca pobrania materiału do badań
 - oporności szczepów na metycylinę
- 2) wstępną ocenę przydatności badań wirulencji bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis* u chorych z zespołem stopy cukrzycowej w postępowaniu terapeutycznym.
- 3) ocenę możliwości przenoszenia się zakażenia pomiędzy chorymi na podstawie określenia podobieństwa genetycznego szczepów *S.aureus* oraz *S.epidermidis*

3. Materiały

Materiał do badań mikrobiologicznych pochodził od 50 chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej leczonych w Klinice Gastroenterologii i Chorób Metabolicznych WUM w Warszawie. Szpitalnie leczonych było 16 chorych, a ambulatoryjnie 34 chorych. Materiał kontrolny pochodził od 20 zdrowych wolontariuszy bez cukrzycy.

Badania prowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Nr KB/172/2005

3.1. Kryteria włączenia chorych do badań

Kryteria włączenia chorych do badań to:

- zdiagnozowana cukrzyca typu 2 z ustabilizowanym farmakologicznie poziomem cukru,
- owrzodzenie stopy w stadium 3 klasyfikacji Wagnera bez klinicznych objawów zapalenia wokół owrzodzenia,
- podstawowe parametry morfologiczne i biochemiczne krwi:
 - leukocytoza w normie (4000-10000 leukocytów w 1mm³ krwi),
 - OB (Odczyn Biernackiego) w normie (w zależności od płci i wieku poniżej 8-20 mm/h),
 - określenie stężenia hemoglobiny glikowanej HbA1c (dobra kontrola glikemii- HbA1c ≤7%),
 - określenie stężenia białka CRP (norma 0-10 mg/l),
- indeks kostkowo/ramienny (ABI) potwierdzający lub wykluczający zaburzenia przepływu krwi w stopie- u chorych z niedokrwieniem ABI<0,9 (norma: 0,9-1,2),
- badania dla potwierdzenia/wykluczenia zmian w unerwieniu czuciowym:
 - badanie obecności neuropatii autonomicznej - neuropad,
 - badanie czucia wibracji- neurotensjometr,
 - badanie czucia ucisku - monofilament Semmesa-Weinsteina.

Do grupy niedokrwiennej przypisano chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienneą i mieszaną/neuroniedokrwienneą. Podział ten opublikowany został wcześniej przez Gałkowska i wsp. [46]. Chorzy ze stopą mieszaną cechowali się bardzo znacznym niedokrwieniem, które stanowiło dominującą komponentę przyczyniającą się do rozwoju owrzodzenia.

Grupy chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienneą nie różniły się istotnie wiekiem (średnia odpowiednio 55 i 61 lat), czasem trwania cukrzycy (16,9 i 15,6 lat) oraz parametrami laboratoryjnymi takimi jak: poziom leukocytów we krwi obwodowej, stężenie białka CRP, stężenie glikowanej hemoglobiny HbA1c. Badane grupy różniły się

znamiennie indeksem kostkowo-ramiennym (ABI odpowiednio 1,17 i 0,61). Indeks stanowił główne kryterium podziału. Chorzy z wartościami $ABI < 0,9$ przypisani zostali do grupy chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną.

U 13 z 29 chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną zastosowano leczenie antybiotykowe przed pobraniem materiału do badań. Stosowane u chorych antybiotyki to głównie amoksycylina i karbapenemy, a także ciprofloksacyna, piperacylina i klidamycyna. Czas stosowania antybiotyków wynosił od 3 dni do 4 tygodni.

Ośmiu chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczono antybiotykami, u 13 chorych leczenie nie obejmowało antybiotykoterapii. Zastosowane antybiotyki to: ciprofloksacyna, amoksycylina i kindamycyna. Czas stosowania antybiotyków wynosił od 4 dni do 2 miesięcy.

Tabela 3. Demograficzne, kliniczne i laboratoryjne parametry chorych z cukrzycą

	Stopa cukrzycowa neuropatyczna	Stopa cukrzycowa niedokrwienna
Liczba chorych (n)	29	21
Średni wiek chorych (lata)	55±11*	61 ±11*
Liczba mężczyzn (n)	26 (89,6%)	13 (61,9%)
Czas trwania cukrzycy (lata)	16 ±8*	15 ± 12*
Wskaźnik kostkowo-ramienny (ABI)	1,17 ±0,22*	0,61 ± 0,12*↓
Stężenie białka C-reaktywnego (mg/l)	15,8 ±14,7*↑	22,0 ±24,0*↑
HbA1c (%)	8,0 ±1,7*↑	7,7 ±2,3*↑

*-odchylenie standardowe średniej

↑ wartość powyżej normy

↓ wartość poniżej normy

3.2. Podział grupy badanej

Miejsca pobrania materiału:

Tkanki do badań mikrobiologicznych pobierane były z trzech miejsc od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej po wykonaniu planowego zabiegu opracowania chirurgicznego rany:

- z wyskrobin z dna owrzodzenia [W],
- z biopsji skóry z brzegu owrzodzenia [SK],
- z wymazów z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej [MP].

Materiał kontrolny pochodził od 20 zdrowych wolontariuszy bez cukrzycy, od których pobierano wymazy z powierzchni międzypalcowej stopy.

Materiał od chorych został podzielony na dwie grupy:

- izolaty bakteryjne od pacjentów ze stopą cukrzycową neuropatyczną (46 izolatów)
- izolaty bakteryjne od pacjentów ze stopą cukrzycową niedokrwienną (29 izolatów)

Materiał kontrolny od wolontariuszy bez cukrzycy pobierany z wymazów z powierzchni stanowiły 23 izolaty.

Zbiorcze dane dotyczące izolatów od chorych zebrane są w Załączniku 1.

Zastosowane w badaniach zestawy i odczynniki przedstawione zostały w Załącznikach 2-7.

Zastosowane w badaniach startery reakcji PCR przedstawione zostały w Załącznikach 8-9.

4. Metody

Izolację szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* z materiału klinicznego, ich identyfikację i bankowanie, a także określanie oporności szczepów na antybiotyki oraz oporności wielolekowej szczepów MRSA i MRSE wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

4.1. Izolacja *S.aureus* i *S.epidermidis* z materiału klinicznego, identyfikacja i bankowanie

Wymazy i fragmenty tkanek pobrane od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej i od zdrowych ochotników transportowano w probówkach z podłożem transportowym. Kolejne etapy obejmowały inkubację pobranego materiału w płynnym podłożu BHI (nazwy producentów użytych odczynników i innych materiałów zebrano w Załącznikach nr 2-7) w 37°C przez 24 godziny, posiew redukcyjny na płytki z podłożem stałym wybiórczo-różnicującym Chapmana firmy Oxoid i inkubację w 37°C przez 24 godziny w celu wyodrębnienia bakterii rodzaju *Staphylococcus*.

Gronkowce różnicowano na podstawie zdolności rozkładu mannitolu w podłożu Chapmana. Podłoże to dodatkowo zawiera chlorek sodu hamujący wzrost innych mikroorganizmów, poza gronkowcami. Do szczepów rozkładających mannitol należą *S.aureus* i *S.saprophyticus*. Mannitolu nie rozkładają szczepy *S.epidermidis*.

W celu różnicowania szczepów *S.aureus* i *S.saprophyticus* zastosowano test oceniający zdolność do wytwarzania koagulazy- Slidex Staph-kit firmy bioMérieux. Bakterie *S.aureus* dają w teście wynik dodatni (koagulazododatnie), a *S.saprophyticus*- ujemny (koagulazoujemne).

Szczepy nie rozkładające mannitolu i dające wątpliwe wyniki w teście Slidex Staph-kit identyfikowano biochemicznie za pomocą mikrotestów API STAPH firmy bioMérieux. Testy wykonywane były według procedury do nich załączonej, a wyniki odczytywano w załączonej książce kodów.

Zidentyfikowane szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* przenoszono na podłoże Mueller-Hinton firmy Oxoid i inkubowano w 37°C przez 24 godziny, a następnie zamrożono w ampułkach Cryobank i przechowywano w temperaturze - 80° C [46].

4.2. Określanie oporności na antybiotyki oraz oporności wielolekowej szczepów MRSA i MRSE

Wysoki wskaźnik występowania MRSA i szczepów wieloopornych u chorych ambulatoryjnych odzwierciedla obecność szpitalnych szczepów MRSA w populacji, u których wielooporność jest bardziej powszechna niż w izolatach środowiskowych [53].

Szczepy klasyfikuje się jako wielooporne, gdy są odporne na 3 lub więcej różnych klas antybiotyków (wyłączając β -laktamy). W obecnych badaniach bazowano na wrażliwości na erytromycynę (antybiotyk makrolidowy), gentamycynę (antybiotyk aminoglikozydowy), klindamycynę (antybiotyk linkozamidowy), lewofloksacynę (fluorochinolon), tetracyklinę (antybiotyk tetracyklinowy) i kotrimoksazol (zawiera sulfonamid). W przypadku wyizolowanych bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis* sprawdzano oporność na następujące antybiotyki: penicylinę, kotrimoksazol, gentamycynę, erytromycynę, klindamycynę, tetracykliny, minocyklinę, wankomycynę, teikoplaninę, ryfampicynę, chinoliny, lewofloksacynę, kwas fusydowy, nitrofurantoinę, oksacylinę, chinuprystynę/dalfoprystynę.

Wrażliwość na antybiotyki badano przy zastosowaniu komercyjnego testu ATB-STAPH 5 zgodnie z metodyką producenta (bioMérieux). Wyniki odczytywano przy pomocy programu komputerowego ATB STAPH.

W 0,85% NaCl przygotowywano zawiesinę badanego szczepu odpowiadającą zmętnieniu 0,5 jednostki w skali McFarlanda (1 jednostka McFarlanda odpowiada $2,5-3 \times 10^5$ CFU (jednostka tworzące kolonię)). Zawiesinę przenoszono na półpłynne podłoże ATB. Po wymieszaniu nakraplano do studzienek w płytce zawierających standardowe stężenia antybiotyków. Po 18 godzinach inkubacji odczytywano wynik przy użyciu czytnika. Spadek stopnia zmętnienia wskazywał na działanie leku. Podłoże przezroczyste oznaczało zahamowanie wzrostu bakterii.

4.3. Izolacja DNA i wykrywanie obecności genów kodujących czynniki wirulencji szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis*

Ponowna hodowla zamrożonych bakterii prowadzona była w celu izolacji DNA oraz na potrzeby rozdziału DNA przy zastosowaniu elektroforezy PFGE.

Podłoże BHI rozlewano po 40 ml do kolbek o pojemności 100ml i sterylizowano w autoklawie. Izolaty przenoszono z ampułek Cryobank do kolbek, gdzie wzrastały przez 24 godziny w wyrząsarce w temperaturze 37°C. Następnie wykonywano posiew redukcyjny na podłoże Chapmana i stałe podłoże BHI w celu sprawdzenia, czy nie uległy

one zakażeniu. Hodowle przenoszono do probówek typu Falcon i wirowano przez 10 minut przy RCF 6010×g (Relative Centrifugal Force = względna siła odśrodkowa, g-przyspieszenie ziemskie, 9,80665 m/s²) w 4°C. Supernatant usuwano, a osad komórek bakteryjnych rozpuszczano w 2 ml buforu stanowiącego dogodne środowisko dla aktywności enzymu lizostafiny (50 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl, pH 7,5). Zawartość przelewano do probówek typu Eppendorf. Następnie do 0,5 ml zawiesiny dodawano 20 µl enzymu lizostafiny firmy Sigma (1mg/ml), energicznie wytrząsano i wstawiano do inkubatora do 37°C na 1 godzinę [46].

4.3.1. Izolacja genomowego DNA

Izolację DNA przeprowadzano przy użyciu zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit firmy Roche Applied Science.

Do mieszaniny bakteryjnej z lizostafyną dodawano 200 µl buforu wiążącego (Binding Buffer), 40 µl Proteinazy K i inkubowano w 70°C przez 40 min. Następnie zawartość wirowano przy RCF 6010×g przez 4 min., aby osiadły resztki ścian komórkowych i do osadu dodawano 100 µl izopropanolu. Zawartość przenoszono na kolumny ze złożem krzemionkowym wiążącym DNA, wirowano przy RCF 11363×g przez 2 min., nadsącze po kolejnych wirowaniach zbierano do nowych probówek. Kolejne etapy obejmowały dodawanie 500 µl buforu usuwającego inhibitor (Inhibitor Removal Buffer), wirowanie przy RCF 11363×g przez 2 min, dwukrotne dodawanie 500 µl buforu płuczącego (Wash Buffer) i wirowanie przy RCF 11363×g przez 2 min. Po usunięciu nadsącza kolumny wirowano przy RCF 11363×g przez 2 min., przenoszono do probówek typu Eppendorf, dodawano 100 µl buforu elucyjnego (Elution Buffer) w celu wymycia DNA. Stężenie i czystość DNA mierzono spektrofotometrycznie przy zastosowaniu urządzenia NanoDrop (Baylor College of Medicine Microarray Core Facility) [46]. Próbkę charakteryzującą się dużym zanieczyszczeniem białkami oczyszczane były metodą fenolową.

Do próbek z wyizolowanym DNA dodawano 400 µl buforu do elucji, pochodzącego z zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit firmy Roche Applied Science oraz 500 µl mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (25:24:1), całość dokładnie mieszano i następnie wirowano przy RCF 10000×g przez 3 minuty. Górną fazę przenoszono do nowych probówek i ponownie dodawano 500 µl mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (25:24:1). Po dokładnym wymieszaniu wirowano próbki przy RCF 10000×g przez 3 minuty. Górną fazę przenoszono do nowych probówek i dodawano 1 ml alkoholu etylowego (96%) oraz 100 µl 3M octanu sodu. Próbkę

inkubowano w temperaturze -12°C przez 30 minut. Po inkubacji próbki wirowano przy RCF 10000×g przez 10 minut. Powstały osad DNA przemywano 1 ml 70% etanolu. Próbkę wstrząsnęto kilka razy i wirowano przy RCF 11000×g przez 3 minuty. Usuwano supernatant, a pozostały osad suszono w komorze z laminarnym przepływem powietrza. DNA rozpuszczano w 100 μl jałowej wody.

4.3.2. Wykrywanie obecności genów kodujących czynniki wirulencji przy zastosowaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy to technika powielania fragmentów DNA. Mieszanina reakcyjna zawiera termostabilną polimerazę, oligonukleotydowe startery, wolne deoksynukleotydy trifosforanu (dNTPy). Wymaga także optymalnego pH (8,3-8,4) i stężenia magnezu (2 mM). Kopie wyjściowej cząsteczki DNA są określane amplikonami. Do najważniejszych parametrów reakcji PCR należą odpowiednio dobrane sekwencje starterów, a także temperatury ich przyłączenia [98].

Reakcję amplifikacji wykonywano z zastosowaniem specyficznych starterów, wyprodukowanych przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (Załącznik 9), uzyskując następujące produkty (Tabela 4).

Tabela 4. Produkty amplifikacji genów *fnbA*, *eta*, *cna*, *icaAB*, *atlE*, *IS256* oraz funkcje kodowanych przez nie białek

Gatunek bakterii	Nazwa genu	Długość produktu amplifikacji [kpz]	Funkcje białka	Piśmiennictwo
<i>S.aureus</i>	<i>fnbA</i>	1362	adhezja do fibronektyny	[99]
	<i>cna</i>	zmienna (1739, 1179, 619)	adhezja do kolagenu	[99]
	<i>eta</i>	190	złuszczenie naskórka	[58]
	<i>etd</i>	376	złuszczenie naskórka	[140]
	<i>edin</i>	625	hiperplazja naskórka	[58]
<i>S.epidermidis</i>	<i>atlE</i>	682	adhezja do witronektyny	[39]
	<i>icaAB</i>	546	tworzenie biofilmu	[39]
	<i>IS256</i>	1102	zdolność do wytwarzania biofilmu	[144]

Skład mieszaniny PCR dla genów *fnbA*, *cna*, *eta*, *icaAB*, *atlE*

Mieszanina PCR zawierała: bufor Taq DNA Polymerase Buffer (10X) 2,5 μl , antyinhibitor PCR 0,5 μl , mieszaninę deoksynukleotydów (stężenie wyjściowe 200 μM)

0,5 µl, polimerazę (1U/µl, DNA polymerase, Roche Applied Science) 1 µl, GC-Rich 5 µl; 2,5 µl (25 pmol) każdego startera, wodę sterylną- do objętości 20 µl oraz 5 µl matrycy DNA.

Modyfikacje w składzie mieszaniny PCR dla genu **IS256** obejmowały zastosowanie polimerazy RedAllegroTaq DNA polymerase, Novazym w ilości 0,4 µl (2,5 U/µl). Mieszaninę reakcyjną dodatkowo wzbogacono o 5xGC-Rich. DNA bakteryjne zawiera duże ilości heterocyklicznych zasad: guaniny (G) i cytozyny (C), a w skład mieszaniny deoksynukleotydów wchodzi cztery zasady w równych ilościach. Dodatek 5xGC-rich zapewnił właściwe proporcje poszczególnych zasad w celu prawidłowego przebiegu reakcji PCR.

Warunki reakcji PCR zostały przedstawione w Załączniku 11.

Amplifikacja PCR prowadzona była przy użyciu MJ Research PTC-200 DNA Thermal Cycler.

Kolejnym etapem była elektroforeza w 2% żelu agarozowym.

Produkt reakcji PCR, w ilości 15 µl, został umieszczony w żelu agarozowym.

Parametry elektroforezy:

- napięcie prądu- 60 mV
- czas elektroforezy- 60 minut

Fragmety DNA uwidaczniane były przy zastosowaniu 0,5% bromku etydy. Wyniki wizualizowano przy użyciu UV light box Gene Genius z oprogramowaniem Gene Shop (Syngen).

4.3.2.1. Wykrywanie obecności genu kodującego oporność na metycylinę (*mecA*)

Obecność genu kodującego oporność na metycylinę (*mecA*) określano w oparciu o reakcję PCR z zastosowaniem specyficznych starterów (Załącznik 9) uzyskując produkty (Tabela 5).

Tabela 5. Produkty amplifikacji genów *mecA*, *PVL*, *Staph756* oraz funkcje kodowanych przez nie białek

Gatunek bakterii	Nazwa genu	Długość produktu amplifikacji [kpz]	Funkcja białka	Piśmienictwo
<i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	<i>mecA</i>	310	Odpowiedzialne za oporność na metycylinę	[84]
	<i>staph756</i>	756	potwierdzenie, że szczep należy do gronkowców	
	<i>PVL</i>	433	cytotoksyna	

Mieszanka PCR zawierała: bufor Taq DNA Polymerase Buffer (10X) 2,5 µl, antyinhibitor PCR 0,5 µl, mieszaninę deoksynukleotydów (200µM) 0,5 µl, polimerazę (1U/µl, DNA polymerase, Roche) 1µl, GC-Rich 5 µl; 1,5 µl (15 pmol) każdego startera, wodę sterylną- 1,5 µl oraz 5 µl matrycy DNA.

Warunki reakcji PCR zostały przedstawione w Załączniku 11.

4.3.2.2. Warunki reakcji PCR dla genu *etd* i *edin*

W celu uzyskania specyficzności reakcji PCR przeprowadzono optymalizację temperatury przyłączania się starterów do matrycy.

Sprawdzano temperatury:

- dla genu ***etd*** 35°C; 36,7°C; 40,5°C; 46,7°C; 51,8°C; 55°C

- dla genu ***edin*** 45°C; 46,7°C; 50,5°C; 56,7°C; 61,8°C; 65°C.

Jako matrycy użyto DNA kilku losowo wybranych szczepów od chorych z cukrzycą.

Mieszanka PCR zawierała: bufor Taq DNA Polymerase Buffer (10X) 2,5 µl, antyinhibitor PCR 0,5 µl, mieszaninę deoksynukleotydów (200µM) 0,5 µl, polimerazę (2,5 U/µl, RedAllegroTaq DNA polymerase, Novazym) 0,4 µl; GC-Rich 5 µl; 3 µl (30 pmol) każdego startera, wodę sterylną- 5,1 µl oraz 5 µl matrycy DNA.

Tabela 6. Warunki reakcji PCR-GRADIENT dla genów *etd* i *edin*

Gen	Etap PCR	Temperatura	Czas	Liczba cykli
<i>etd</i> , <i>edin</i>	wstępna denaturacja	95°C	5 minut	35
	denaturacja w cyklu	94°C	1 minuta	
	przyłączanie starterów	<i>etd</i> : 35°C; 36,7°C; 40,5°C; 46,7°C; 51,8°C; 55°C <i>edin</i> : 45°C 46,7°C; 50,5°C; 56,7°C; 61,8°C; 65°C	1 minuta	
	wydłużanie	72°C	1 minuta	
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut	

Najbardziej optymalną temperaturą przyłączania się starterów okazała się temp. **35°C** (dla genu *etd*) i **46,7°C** (dla genu *edin*).

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie z zastosowaniem 2% żelu agarozowego. Fragmenty DNA wizualizowano przy użyciu 0,5% bromku etydyny i UV light box Gene Genius z oprogramowaniem Gene Shop (Syngen).

Dla wszystkich szczepów pochodzących od pacjentów z cukrzycą przeprowadzono reakcję PCR-*etd* i PCR-*edin* w zoptymalizowanych warunkach (zgodnie z Tabelą 6).

4.4. Badanie ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji szczepów *S.aureus* przy zastosowaniu techniki RT-PCR

Badanie miało na celu sprawdzenie, czy badane geny wirulencji ulegają ekspresji.

4.4.1. Izolacja RNA

Zasada działania zastosowanego zestawu do izolacji RNA firmy A&A Biotechnology opierała się na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego [24].

Pierwszy etap obejmował lizę komórek i inaktywację endogennych RNA-z za pomocą odczynnika o nazwie Fenozol wchodzącego w skład zestawu do izolacji RNA. Koagulant ten stanowił mieszaninę soli chaotropowych i fenolu.

Kolejny etap uwzględniał rozdział RNA i DNA. Do mieszaniny dodawano chloroform i odwirowano przy RCF 11363×g przez 2 min. W górnej warstwie pozostawało RNA, dolną warstwę zajmowały DNA i białka. Górną warstwę poddawano działaniu izopropanolu i наносzono na minikolumnę ze złożem krzemionkowym, na którym osadzało się RNA.

W ostatnim etapie oczyszczone RNA wmywano z mikrokolumny wodą wolną od RNAz.

4.4.1.1. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Podłoże BHI rozlewano po 40 ml do kolbek o pojemności 100 ml i sterylizowano w autoklawie.

Izolaty przenoszono z ampułek Cryobank do kolbek, które następnie umieszczano w wytrząsarce w 37°C na 24 godziny. W kolejnym etapie wykonywano posiew redukcyjny na podłoże Chapmana i stałe podłoże BHI, w celu sprawdzenia, czy izobaty nie uległy zakażeniu. Hodowle przenoszono do próbek typu Falcon i wirowano w 4°C przy RCF 6010×g przez 10 minut. Supernatant usuwano, a osad komórek bakteryjnych używano do dalszej analizy.

Do 1,5 ml bakteryjnej zawiesiny dodawano 0,8 ml Fenozolu. Zawartość mieszano dokładnie przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek bakteryjnych. Mieszaninę inkubowano w 50°C przez 5 min., dodawano 0,2 ml chloroformu, mieszano delikatnie i pozostawiano w temp. pokojowej na 3 min. Całość wirowano przy RCF 11363×g przez 10 min. Górną (wodną) warstwę przenoszono do nowej próbówki o pojemności 1,5 ml,

dodawano 0,25 ml izopropanolu, energicznie mieszano i przenoszono na minikolumnę ze złożem wiążącym RNA. Następnie wirowano przy RCF 11363×g przez 1 min., przenoszono minikolumnę z osadem do nowej próbówki, dodawano 0,7 ml roztworu płuczającego A1. Zawartość ponownie wirowano przy RCF 11363×g przez 1 min., minikolumnę z osadem przenoszono do nowej próbówki, dodawano 0,2 ml roztworu płuczającego A1, wirowano przy RCF 11363×g przez 2 min.. Minikolumnę kolejny raz przenoszono do nowej próbówki o pojemności 1,5 ml, dodawano 100 µl jałowej wody. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 min. i wirowano przy RCF 11363×g przez 1 minutę. Całkowite RNA wmywano ze złożeń do nowej próbówki.

4.4.2. Odwrotna transkrypcja

W reakcji odwrotnej transkrypcji RNA ulega przepisaniu na jednoniciowe komplementarne DNA (cDNA), które wykorzystuje się w kolejnym etapie (PCR) jako matrycę do syntezy z użyciem specyficznych starterów. Powstałe cDNA charakteryzuje się większą stabilnością niż RNA.

Odwrotna transkryptaza cechuje się bardzo dużą czułością i termostabilnością. Możliwa jest synteza długich fragmentów DNA (do 14 tys. pz) w temp. do 65°C. Transkryptaza posiada aktywność RNazy H, która degradowuje RNA w hybrydach RNA:DNA. Nie jest zatem konieczna czasochłonna inkubacja z RNazą H. Przyczynia się to do redukcji czasu reakcji i ponoszonych kosztów. Mieszanina starterów oligo(dT) zawiera oligomery tymidylanu i jest wykorzystywana do wybiórczego przepisywania jedynie mRNA — posiadającego na jednym końcu powtórzenia deoksyadenyланu, zwane ogonem poli (A).

Zestaw First Strand cDNA Synthesis Kit firmy Roche Applied Science służył przepisaniu informacji genetycznej z RNA na cDNA.

Całkowite RNA (1 µg/µl), random hexamer primer (600 pmol/ µl) i jałowa woda (9,5 µl) mieszano na lodzie, a następnie inkubowano w 65°C przez 10 min. Procedura ta zapewniła denaturację struktury drugorzędowej RNA. Następnie do mieszaniny dodawano bufor transkrypcyjny (Transcriptor RT Reaction Buffer), inhibitor RNaz (Protector RNase Inhibitor), mieszaninę deoksynukleotydów (Deoxynucleotide Mix) i odwrotną transkryptazę (Transcriptor Reverse Transcriptase), mieszano przez pipetowanie, inkubowano kolejno w 25°C przez 10 min., w 55 °C przez 30 min. i w 85 °C przez 5 min.

Otrzymane cDNA wykorzystywano jako matrycę w reakcji PCR.

4.4.3. PCR dla genów *eta*, *fnbA*, *cna*

Powstałe jednoniciowe cDNA amplifikowano w reakcji PCR ze specyficznymi starterami (sekwencje w Załączniku 8).

PCR mix zawierał: bufor Taq DNA Polymerase Buffer (10X) 2,5 µl, antyinhibitor PCR 0,5 µl, mieszaninę deoksynukleotydów 0,5 µl (200µM), polimerazę (1U/µl; RedAllegroTaq DNA polymerase firmy Novazym) 0,4 µl, GC-Rich 5 µl; 2,5 µl (25 pmol) każdego startera, wodę jałową 6,1 µl, oraz 3 µl matrycy RNA.

Warunki reakcji PCR dla genów wirulencji przedstawiono w Załączniku 10.

Kolejny etap obejmował rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym według procedury opisanej w rozdziale 4.3.2. Fragmenty DNA wizualizowano przy zastosowaniu 0,5% bromku etydyny i UV light box.

4.5. Badanie podobieństwa genetycznego szczepów techniką elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)

Technika PFGE (elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym) stanowi obecnie „złoty standard” wśród molekularnych metod służących do badań epidemiologicznych. Jej głównymi zaletami są: wysoka zdolność różnicującą (siła dyskryminacji), rozdzielczość, powtarzalność, możliwość oceny faktycznego pokrewieństwa między szczepami oraz możliwość porównywania wyników pomiędzy różnymi ośrodkami.

Do wad techniki PFGE należy czasochłonność i subiektywna interpretacja wyników.

W technice PFGE wyizolowany cały materiał genomowy drobnoustroju poddaje się trawieniu rzadko tnącymi endonukleazami. Otrzymuje się 10-30 dużych fragmentów, charakterystycznych dla danego mikroorganizmu, o długości od 20-30 pz do 1000 kpz. Elektroforeza polega na wymuszonej zmianie kierunku migracji cząsteczek DNA i ich rozdziale zależnym od wielkości, pod wpływem zmieniającego się pola elektrycznego.

Pole elektryczne jest włączane i wyłączane w krótkich odstępach czasu. Kiedy pole elektryczne jest włączone, cząsteczki migrują zgodnie ze swoją wielkością, a gdy zostaje wyłączone, mają tendencję do relaksacji i zwijania się w przypadkowe pętle. Czas wymagany do relaksacji jest wprost proporcjonalny do długości łańcucha cząsteczki. Następnie kierunek pola elektrycznego jest zmieniany o 90 lub 180 stopni w stosunku

do poprzedniego. Dłuższe cząsteczki poruszają się wówczas wolniej niż krótsze. Powtarzające się zmiany kierunku pola powodują rozdzielanie się cząsteczek.

Analizę podobieństwa otrzymanych wzorów genetycznych szczepów, z minimalną liczbą 10 prążków w rozdziale elektroforetycznym, można przeprowadzić wizualnie według kryteriów Tenovera [134]. Szczepy, które nie wykazują różnic w liczbie i układzie prążków określa się jako identyczne (izolat pochodzi z epidemii).

Szczepy uznaje się za blisko spokrewnione, jeśli między wzorami występuje różnica najwyżej 3 prążków (izolat prawdopodobnie pochodzi z epidemii). Zalicza się je wówczas do tego samego podtypu i oznacza takim samym symbolem literowym wraz z cyframi arabskimi.

Wzory uznaje się za należące do tego samego typu (izolaty prawdopodobnie spokrewnione), gdy między wzorami jest różnica od 4 do 6 prążków; oznacza się je takim samym symbolem literowym, ale różnymi cyframi arabskimi.

Wzory różniące się większą niż 6 liczbą prążków oznacza się różnymi literami (izolaty niespokrewnione, izolaty nie pochodzą z epidemii) [86].

Badania techniką PFGE wykonywano wg metody opracowanej przez deLencastre [26] i zmodyfikowanej przez E. Młodzińską i R. Izdebskiego z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie.

Zamrożone w ampułkach Cryobank bakterie poddawano hodowli z wytrząsaniem w próbkach typu Eppendorf w 37°C przez 20 godzin. Po odwirowaniu zawiesiny bakteryjnej przy RCF 6010×g przez 5 min. i usunięciu supernatantu, wykonywano posiew redukcyjny na płytce z agarem sojowym Trypticase i inkubowano w 37°C przez 20 godzin. Bakterie zawieszano w 0,9% roztworze chlorku sodu do uzyskania gęstości optycznej 3,5 jednostki w skali McFarlanda.

Do próbek typu Eppendorf przenoszono 1,5 ml zawiesiny, wirowano przy RCF 6010×g przez 2 min., odrzucano supernatant, a osad zawieszano w 150 μl buforu PIV. Do zawiesiny bakteryjnej dodawano 150 μl ochłodzonego do temp. 50°C roztworu zawierającego 0,1 g agarozę, 5 ml TE (Tris-EDTA) i 0,05 ml SDS (sodium dodecyl (lauryl) sulfate). Całość dokładnie mieszano i наносzono w postaci kropli o objętości 20 μl na płytkę szklaną, powleczonej parafilmem i odtłuszczonej etanolem. Naniesione krople przykrywano odtłuszczonymi szkiełkami podstawowymi, w celu ich spłaszczenia, tak, aby przybrały kształt krążka. Płytkę z krążkami pozostawiano w temp. -20°C na 5 min. Krążki przenoszono do próbek jednorazowych o objętości 15 ml i dodawano 1 ml świeżo przygotowanego roztworu EC z 50 μg/ml RNAzy firmy Sigma, 100 μg/ml lizozymu firmy Sigma i 50 μg/ml lizostafiny firmy Sigma. RNAza, lizostafyna i lizozym były dodawane

do buforu bezpośrednio przed użyciem. Całość inkubowano w temp. 37°C przez 4 godziny.

W kolejnym etapie odrzucono roztwór EC, a krążki zalewano 1 ml roztworu ESP z dodatkiem 1 mg/ml proteiny K firmy Sigma. Proteinazę dodawano do buforu bezpośrednio przed użyciem. Krążki inkubowano w buforze w temp. 50°C przez noc.

Po odrzuceniu roztworu ESP krążki zalewano 10 ml roztworu TE i płukano z wytrząsaniem w temp. pokojowej przez 15 min.. Po usunięciu roztworu TE płukanie powtarzano jeszcze 2 razy. Następnie odrzucano roztwór TE, a krążki umieszczano w 1ml buforu TE z dodatkiem 0,1 M PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu). Próbówki inkubowano w temp. pokojowej przez 15 min. Następnie płukano krążki w roztworze TE (3-krotnie), przenoszono do próbówki typu Eppendorf i zalewano 1 ml roztworu TE. Krążki przechowywano w temp. 4°C.

W kolejnym etapie jeden krążek przenoszono do nowej próbówki typu Eppendorf, dodawano 100 µl buforu Yellow Tango firmy Roche (10×stężony) i inkubowano w temp. pokojowej przez 15 min. Po usunięciu buforu krążek umieszczano w 50 µl buforu Yellow Tango z dodatkiem 10 U enzymu *SmaI* firmy Fermentas. Całość inkubowano w temp. pokojowej przez 3,5 godziny. Po usunięciu buforu krążek zalewano 250 µl roztworu TE.

Następnie krążki poddawano elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym w aparacie CHEF DR-III (BioRad). Krążki umieszczano w żelu agarozowym o stężeniu 1% (agarozą Pulsed Field Certified firmy Biorad). Skład żelu agarozowego: bufor TBE (Tris/kwas borowy/EDTA) i woda MQ (woda z aparatury MilliQ, najwyższej jakości do badań laboratoryjnych) w stosunku 1:1. W pierwszej studzience umieszczano wzorzec masy molekularnej DNA (50 µg/ml, Lambda Ladder PFG Marker firmy BioLabs). Elektroforeza prowadzona była w 0,5×stężonym buforze TBE. Parametry elektroforezy:

- temperatura- 11°C
- napięcie prądu- 6V/cm
- początkowy czas pulsu- 1 sek.
- końcowy czas pulsu- 30 sek.
- czas elektroforezy- 22 godziny

Po zakończeniu elektroforezy żel barwiono w 0,5 % bromku etydyliny przez 30 min., a następnie odbarwiano przez 30 min. w buforze, który był wykorzystywany wcześniej w elektroforezie. Wyniki wizualizowano w UV light box.

Podobieństwo genetyczne szczepów określano technikami komputerowymi (GeneDirectory, Syngen; procent tolerancji- 5%, współczynnik podobieństwa- Dice, dendrogram typu UPGMA) wg kryteriów Tenovera [134].

4.6. Metody statystyczne

Znamienność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami była oceniana przy pomocy programu Statistica 7,0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Dla analizy proporcji przy ocenie częstości występowania genów wirulencji zastosowano test Chi-kwadrat i dokładny test Fischera. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

5. Wyniki

5.1. Flora bakteryjna chorych leczonych ambulatoryjnie i w warunkach szpitalnych

Wyizolowane szczepy pochodziły od 50 chorych z zespołem stopy cukrzycowej, w tym 29 chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i 21 chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną. 34 osoby leczono w przychodni przyszpitalnej, a 16 w szpitalu.

Wyizolowano 56 szczepów *S.aureus* z różnych miejsc. Jedenaście szczepów (19,6%) pochodziło od chorych leczonych szpitalnie, a 45 (80,4%) od pacjentów ambulatoryjnych. Opornością na metycylinę charakteryzowało się 54,5% izolatów szpitalnych oraz 44,4% izolatów ambulatoryjnych.

Wyizolowano 20 szczepów *S.epidermidis* z różnych miejsc. Pięć szczepów (25%) pochodziło od osób hospitalizowanych, a 15 (75%) od pacjentów ambulatoryjnych. W obu grupach odsetek szczepów opornych na metycylinę był bardzo wysoki (odpowiednio 100% i 93,3%).

Wyizolowano również 37 szczepów innych gatunków. Od chorych leczonych szpitalnie pochodzą szczepy gronkowców koagulazoujemnych: *S.capitis*- 3, *S.hominis*- 2, *S.haemolyticus*-1 i *S.luteus*- 1. Od chorych leczonych ambulatoryjnie wyizolowano gronkowce koagulazoujemne: *S.xylosum*-9, *S.capitis*- 6, *S.simulans*-4, *S.sciuri*-1, *S.chromogenes*-1, *S.cohnii*-1, a także inne bakterie: *Pseudomonas* spp. -3, *Enterococcus faecalis*-2, *Proteus* spp.-2 i *Klebsiella pneumoniae*-1.

Zbiorcze dane przedstawione są w Tabeli 7.

Tabela 7. Flora bakteryjna chorych leczonych szpitalnie i ambulatoryjnie

	Szczepy od chorych leczonych szpitalnie	Szczepy od chorych leczonych ambulatoryjnie
<i>S.aureus</i>	11	45
<i>S.epidermidis</i>	5	15
<i>S.capitis</i>	3	6
<i>S.hominis</i>	2	-
<i>S.haemolyticus</i>	1	-
<i>S.luteus</i>	1	-

<i>S.xylosus</i>	-	9
<i>S.sciuri</i>	-	1
<i>S.simulans</i>	-	4
<i>S.chromogenes</i>	-	1
<i>S.cohnii</i>	-	1
<i>E.faecalis</i>	-	2
<i>K.pneumoniae</i>	-	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	3
<i>Proteus spp.</i>	-	2

5.2. Flora bakteryjna chorych z cukrzycą oraz zdrowych ochotników. Uwzględnienie rodzaju stopy cukrzycowej i miejsca pobrania materiału do badań

Wszyscy chorzy ze stopą cukrzycową

Flora bakteryjna różnych miejsc pobrania materiału od chorych

S.aureus przeważał wśród bakterii izolowanych od chorych z cukrzycą z wyskrobin z dna owrzodzenia- 19/38 szczepów (50%), z biopsji z brzegu owrzodzenia – 18/35 szczepów (51,4%) i z wymazów z powierzchni międzypalcowej 19/39 szczepów (48,7%).

S.epidermidis występował częściej w wymazach z powierzchni międzypalcowej pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej (11/39 szczepów), co stanowiło 28,2% .

Wśród 14 szczepów obecnych w wyskrobinach z dna owrzodzenia występują: *S.xylosus*-3, *S.simulans*-2, *S.capitis*-2, *Pseudomonas spp.*-2, *E.faecalis*-2, *Proteus spp.*-1, *S.sciuri*-1, *K. pneumoniae*-1.

Ze skóry z brzegu owrzodzenia wyizolowano 13 szczepów: *S.capitis*-5, *S.xylosus*-3, *S.simulans*-1, *S.cohnii*-1, *S.hominis*-1, *Pseudomonas spp.*-1, *Proteus spp.*-1, *K. pneumoniae*-1.

W wymazach z powierzchni międzypalcowych dominowały: *S.capitis*-2, *S.xylosus*-2, *S.simulans*-1, *S.chromogenes*-1, *S.hominis*-1, *S.haemoliticus*-1, *S.luteus*-1.

Zbiorcze wyniki przedstawione są w Tabeli 8.

Tabela 8. Częstość występowania szczepów bakteryjnych u chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) w zależności od miejsca pobrania materiału

Liczba szczepów izolowanych z miejsca pobrania	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	Inne bakterie
wyskrobiny z dna owrzodzenia chorych z ZSC (n=38)	19 (50%)	5 (13,2%)	14 (36,8%)
biopsja z brzegu owrzodzenia chorych z ZSC (n=35)	18 (51,4%)	4 (11,5%)	13 (37,1%)
wymazy z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC (n=39)	19 (48,7%)	11 (28,2%)	9 (23,1%)
wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników (n=17)	10 (58,9%)	3 (17,6%)	4 (23,5%)

Flora bakteryjna od chorych ze stopą cukrzycową z podziałem na stopę neuropatyczną i niedokrwienną

Stopa cukrzycowa neuropatyczna

Od 29 chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną wyhodowano 69 szczepów gronkowcowych. Szczepy *S.aureus* stanowiły 57% izolatów, *S.epidermidis* - 13%, a inne gronkowce koagulazoujemne - 30% szczepów wyizolowanych gronkowców. Wśród gronkowców koagulazoujemnych przeważały: *S.xylosum*- 8 izolatów, *S.capitis*- 6, *S.hominis*- 2, *S.haemolyticus*- 1, *S.sciuri*- 1, *S.chromogenes*- 1, *S.cohnii*- 1, i *S.luteus*- 1. W biopsji skóry z brzegu owrzodzenia występowało 9 szczepów gronkowców koagulazoujemnych (*S.xylosum*-4, *S.capitis*-3, *S.hominis*-1, *S.cohnii* -1), w wyskrobinach z dna owrzodzenia- 5 szczepów (*S.xylosum*- 2, *S.capitis*-1, *S.sciuri*-1, *S.simulans*-1), w wymazach z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej- 7 szczepów (*S.xylosum*- 2, *S.capitis*- 1, *S.hominis*-1, *S.chromogenes*-1, *S.luteus* -1, *S.haemolyticus*- 1).

Wśród szczepów pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną *S.aureus* stanowił 64,7%, *S.epidermidis* 5,9%, a inne gronkowce koagulazoujemne 29,4%. W skórze z brzegu owrzodzenia potwierdzono obecność *S.aureus*- 50% szczepów, *S.epidermidis*- 12,5%, innych gronkowców koagulazoujemnych- 37,5%. W wymazach z powierzchni międzypalcowych dominował *S.aureus*- 57,1% szczepów, poza tym obecne były szczepy *S.epidermidis*- 17,9% i inne gronkowce koagulazoujemne- 25%.

Stopa cukrzycowa niedokrwienna

Z materiału pochodzącego od 21 chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną wyhodowano 36 szczepów gronkowców. Szczepy *S.aureus* stanowiły 47% izolatów, *S.epidermidis*- 30%, a inne gronkowce koagulazoujemne - 23% szczepów wyizolowanych gronkowców. Wśród gronkowców koagulazoujemnych przeważały: *S.capitis*- 3 izolaty, *S.simulans*- 3 izolaty i *S.xylosum*- 2 izolaty. Dodatkowo potwierdzono obecność innych bakterii: *Pseudomonas* – 3 szczepy, *Proteus*- 3 szczepy, *Enterococcus faecalis*- 2 szczepy i *Klebsiella pneumoniae*- 1 szczep. W biopsji skóry z brzegu owrzodzenia występowało 5 szczepów: 3 szczepy gronkowców koagulazoujemnych (*S.xylosum*-1, *S.capitis*-1, *S.simulans*-1) oraz po 1 szczepie *Pseudomonas* i *Proteus spp.*, w wyskrobinach z dna owrzodzenia- 9 szczepów (3 szczepy CoN- *S.xylosum*-1, *S.capitis*-1, *S.simulans*-1), po 2 szczepy *Pseudomonas* i *E.faecalis* oraz po 1 szczepie *Klebsiella pneumoniae* oraz *Proteus spp.*, w wymazach z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej- 2 szczepy gronkowców koagulazoujemnych: *S.capitis* i *S.simulans*.

Wśród szczepów pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną *S.aureus* stanowił 53%, *S.epidermidis* 27%, a inne gronkowce koagulazoujemne 20%. W skórze z brzegu owrzodzenia wykazano obecność szczepów *S.aureus*- 60%, *S.epidermidis*- 10%, innych gronkowców CoN- 30%. W wymazach z powierzchni międzypalcowych przeważał *S.epidermidis*- 54,5%. Ponadto wyizolowano szczepy *S.aureus*- 27,3% i inne gronkowce koagulazoujemne- 18,2%.

Grupa kontrolna

Od 20 osób z grupy kontrolnej wyizolowano 17 szczepów bakteryjnych, 3 posiewy nie wykazały obecności bakterii. Obecność *S.aureus* potwierdzono w 10 przypadkach (58,9%), *S.epidermidis* w 3 przypadkach (17,6%), a inne gronkowce koagulazoujemne w 4 przypadkach (23,5%, 2 razy *S.cohnii*, *S.sciuri* i *S.saprophyticus*).

Zbiorcze wyniki przedstawione są w Tabeli 9.

Tabela 9. Klasyfikacja szczepów izolowanych od chorych z zespołem stopy cukrzycowej i zdrowych ochotników

	Stopa cukrzycowa neuropatyczna			Stopa cukrzycowa niedokrwienne			Zdrowi ochotnicy
	Wyskrobiny z dna owrzodzenia	Biopsje z brzegu owrzodzenia	Wymazy z powierzchni międzypalcowej	Wyskrobiny z dna owrzodzenia	Biopsje z brzegu owrzodzenia	Wymazy z powierzchni międzypalcowej	Wymazy z powierzchni międzypalcowej
gronkowce	17	24	28	15	10	11	17
<i>S.aureus</i>	11 (64,7%)	12 (50%)	16 (57,1%)	8 (53,3%)	6 (60%)	3 (27,3%)	10 (58,9%)
MRSA	4 (36,4%)	4 (33,3%)	10 (62,5%)	3 (37,5%)	3 (50%)	3 (100%)	0 (0%)
<i>S.epidermidis</i>	1 (5,9%)	3 (12,5%)	5 (17,9%)	4 (26,7%)	1 (10%)	6 (54,5%)	3 (17,6%)
inne gronkowce	5 (29,4%)	9 (37,5%)	7 (25%)	3 (20%)	3 (30%)	2 (18,2%)	4 (23,5%)
MRSE	0 (0%)	3 (100%)	5 (100%)	4 (100%)	1 (100%)	5 (83,3%)	0 (0%)

MRSA-metycylinooporny *S.aureus*, MRSE-metycylinooporny *S.epidermidis*

5.3. Oporność na metycylinę i oporność wielolekowa szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis*

Oporność na metycylinę

Oporność na metycylinę, oceniana testem ATB-STAPH 5, przeważała wśród szczepów *S.aureus* izolowanych z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z wyskrobiny z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia (68,4%, 36,8% i 38,9%, odpowiednio). Metycylinooporne szczepy *S.epidermidis* przeważały wśród wszystkich izolatów tego gatunku pochodzących od chorych niezależnie od miejsca pochodzenia: wyskrobiny z dna owrzodzenia, biopsje z brzegu owrzodzenia i wymazy z powierzchni międzypalcowej (odpowiednio 80%, 100% i 91%). Szczepy MRSA i MRSE były nieobecne u zdrowych ochotników. Zbiorcze wyniki przedstawione są w Tabeli 10.

Tabela 10. Częstość występowania oporności na metycylinę u szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* izolowanych z owrzodzeń stopy cukrzycowej z różnych miejsc pobrania

Miejsce pobrania	Liczba szczepów <i>S.aureus</i>		Liczba szczepów <i>S.epidermidis</i>	
	MRSA	MSSA	MRSE	MSSE
wyskrobiny z dna owrzodzenia chorych z ZSC	7 (36,8%)	12	4 (80%)	1
biopsja z brzegu owrzodzenia chorych z ZSC	7 (38,9%)	11	4 (100%)	0
wymazy z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC	13 (68,4%)	6	10 (91%)	1
wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników	0 (0%)	11	0 (0%)	3

ZSC-zespół stopy cukrzycowej, MRSA- metycylinooporny *S.aureus*, MSSA- metycylinowrażliwy *S.aureus*, MRSE- metycylinooporny *S.epidermidis*, MSSE- metycylinowrażliwy *S.epidermidis*

Oporność wielolekowa

Wśród szczepów MRSA pochodzących od chorych (n=27) zaobserwowano w porównaniu do szczepów MSSA (n=29) zwiększony odsetek szczepów opornych na inne antybiotyki: gentamycynę (odpowiednio 74% i 17,2%), erytromycynę (85% i 31%), klindamycynę (77,7% i 37,9%), tetracyklinę (74% i 37,9%), norfloksacynę (70,3% i 27,5%), lewofloksacynę (55,5% i 13,7%). Szczepy MSSA pochodzące od ochotników z grupy kontrolnej charakteryzowała wysoka oporność na penicylinę (90%), erytromycynę (40%) i tetracyklinę (20%).

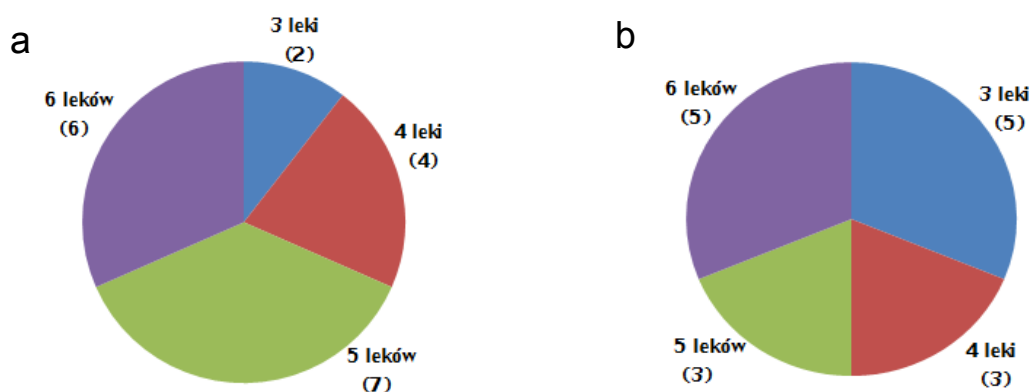
Szczepy MRSE pochodzące od chorych odznaczały się w porównaniu do izolatów z grupy kontrolnej wysoką opornością na kotrimoksazol (odpowiednio 60% i 33,3%), gentamycynę (55% i 0%), erytromycynę (95% i 33,3%), klindamycynę (80% i 0%) oraz tetracyklinę (75% i 33,3%).

Zarówno szczepy MRSA, jak również MRSE izolowane od chorych z ZSC wykazały oporność wielolekową (odpowiednio 70,3% i 88,8%). Oporność na trzy grupy antybiotyków była ponad trzy razy wyższa u szczepów MRSE niż u szczepów MRSA [40].

Wyniki przedstawiono w Tabeli 11 i na Rycinie 3. Opornością wielolekową charakteryzuje się 19 z 27 szczepów MRSA (Rycina 3a) oraz 16 z 18 szczepów MRSE (Rycina 3b).

Tabela 11. Oporność wielolekowa szczepów MRSA i MRSE izolowanych od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej

Liczba zastosowanych klas antybiotyków	Liczba szczepów opornych na metycylinę i na dane grupy antybiotyków	
	MRSA n=19 (% wszystkich szczepów <i>S.aureus</i>)	MRSE n=16 (% wszystkich szczepów <i>S.epidermidis</i>)
0-2	8 (29,7)	2 (11,1)
3	2 (7,4)	5 (27,8)
4	4 (14,8)	3 (16,7)
5	7 (25,9)	3 (16,6)
6	6 (22,2)	5 (27,8)



Rycina 3. Oporność wielolekowa szczepów MRSA (a) i MRSE (b) izolowanych od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej

5.4. Obecność genów kodujących czynniki wirulencji oraz częstość ich występowania

Obecność wybranych genów wirulencji bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis* przedstawiono na Rycinach 23-30 (dla *S.aureus*) i Rycinach 31-33 (dla *S.epidermidis*) oraz zbiorczo w Tabelach 12 i 13. Wszystkie zamieszczone Ryciny obrazują rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym i umieszczone są w Załączniku 12.

Tabele przedstawiające obecność genów wirulencji u szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzących od osób chorych i zdrowych ochotników umieszczone są w Załącznikach 13 i 14.

5.4.1. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSA i MSSA pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową z podziałem na stopę neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwienną (SCNied.)

U chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną obecność genu *eta* była częściej związana ze szczepami MRSA niż MSSA (44,4% i 23,8% odpowiednio; $p < 0,05$), natomiast u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną odwrotnie- częściej ze szczepami MSSA niż MRSA (50,0% i 22,2%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Obecność genu *fnbA* była bardziej związana ze szczepami MSSA niż MRSA u chorych z SCNied. (75,0% i 33,3%, odpowiednio; $p < 0,05$).

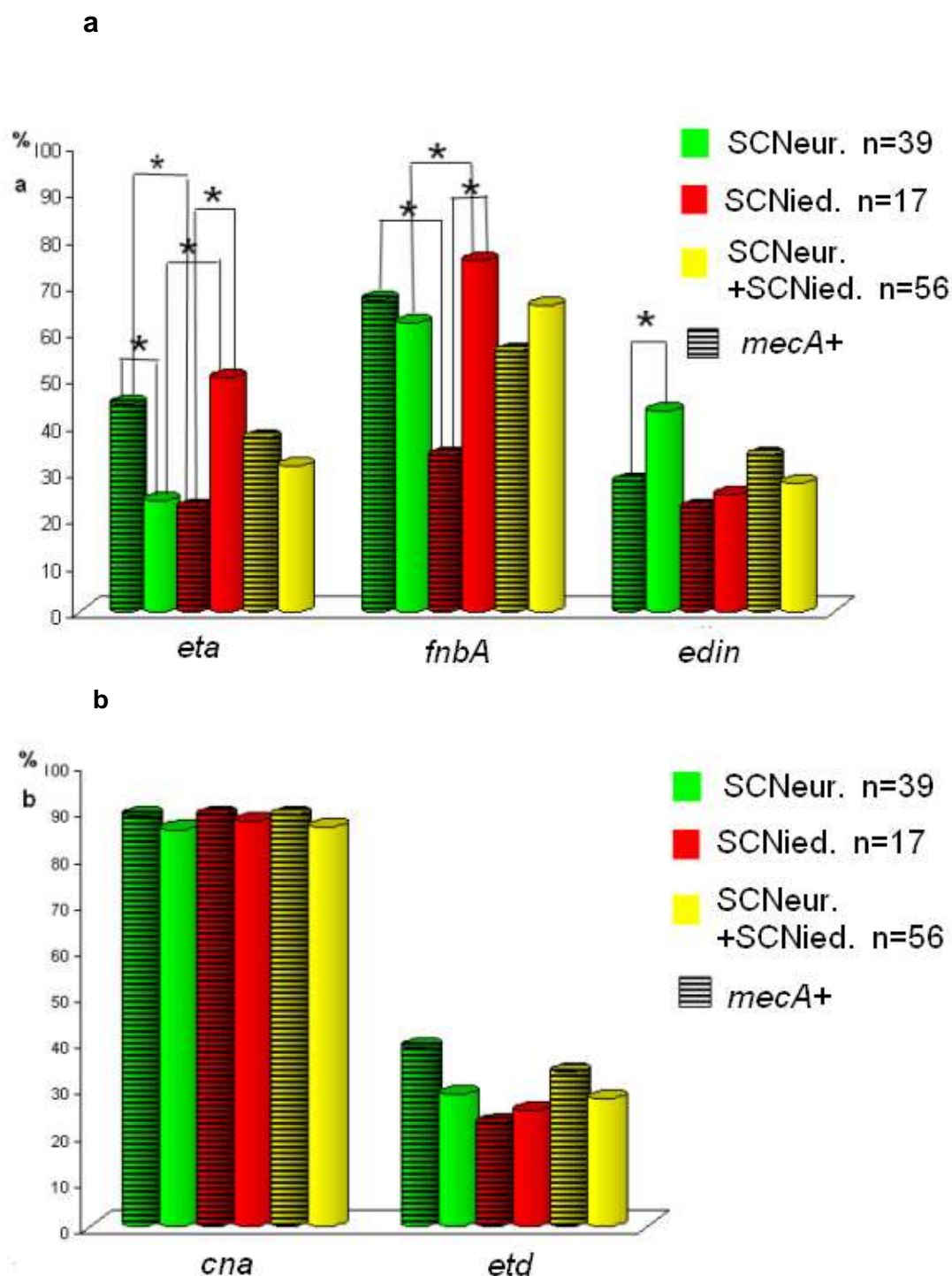
Gen *edin* nieco częściej występował u szczepów MSSA niż MRSA u chorych z SCNeur. (42,8% i 27,7%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Częstość występowania pozostałych genów była porównywalna u chorych z SCNeur. i SCNied.

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genów *cna* i *etd* w badanych szczepach.

Wyniki zbiorczo przedstawiono w Tabeli 12 oraz na Rycinie 4 (a,b). Wykresy oznaczone literą **a** obrazują częstość występowania genów wirulencji *eta*, *fnbA* i *edin*, a wykresy oznaczone literą **b** obrazują częstość występowania genów wirulencji dla genów *cna* i *etd*.

Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości określające obecność określonych czynników w badanej grupie.



Rycina 4. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSA w porównaniu ze szczepami MSSA pochodzącymi od chorych z SCNeur. i SCNied.

Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości określające obecność określonych czynników w badanej grupie.

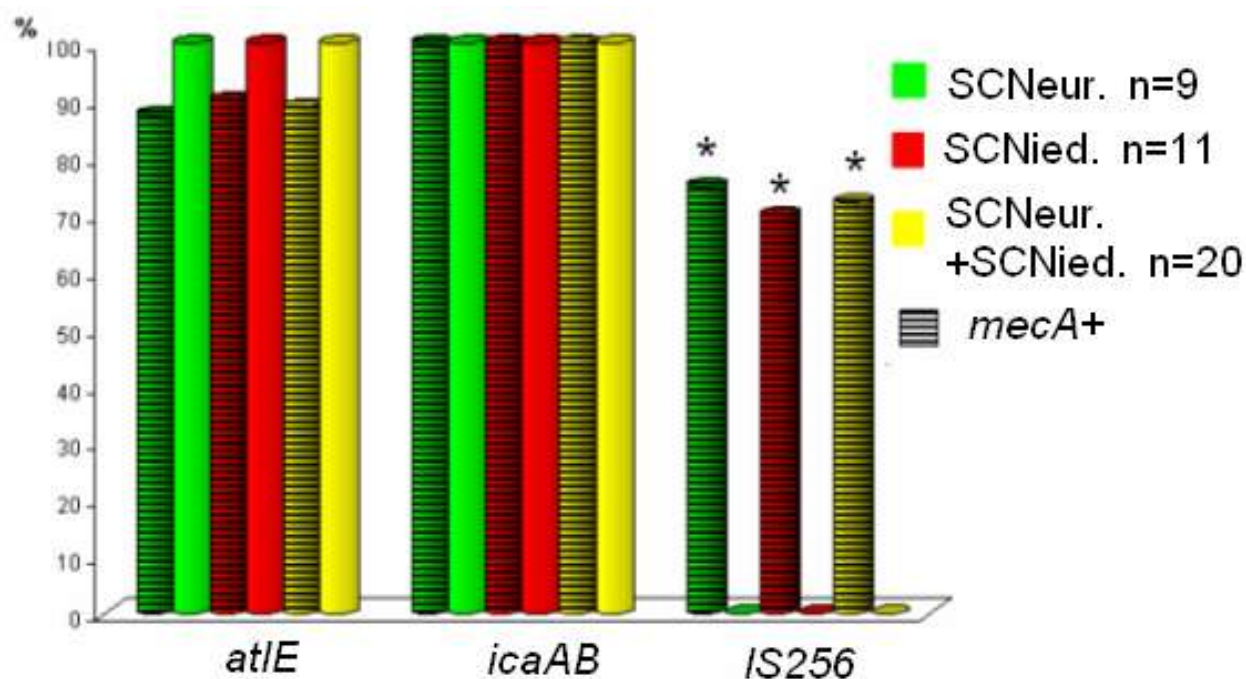
Pary oznaczone * wykazywały różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna; SCNied.- stopa cukrzycowa niedokrwienna, SCNeur.+ SCNied.- wszyscy chorzy z cukrzycą, *mecA+* gen oporności na metycylinę.

5.4.2. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSE i MSSE pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową z podziałem na neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwienną (SCNied.)

Częstość występowania sekwencji insercyjnej *IS256* była znacząco wyższa u szczepów MRSE w porównaniu ze szczepami MSSE, zarówno u chorych z SCNeur. (75,0% i 0%, odpowiednio, $p < 0,05$), jak również u chorych z SCNied. (70,0% i 0%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Częstość występowania genów *atIE* i *icaAB* była bardzo wysoka i porównywalna, zarówno u chorych z SCNeur., jak również z SCNied, a także pomiędzy wszystkimi szczepami MRSE i MSSE. Wyniki przedstawiono zbiorczo w Tabeli 12 i na Rycinie 5.



Rycina 5. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSE i MSSE pochodzących od chorych z SCNeur. i SCNied.

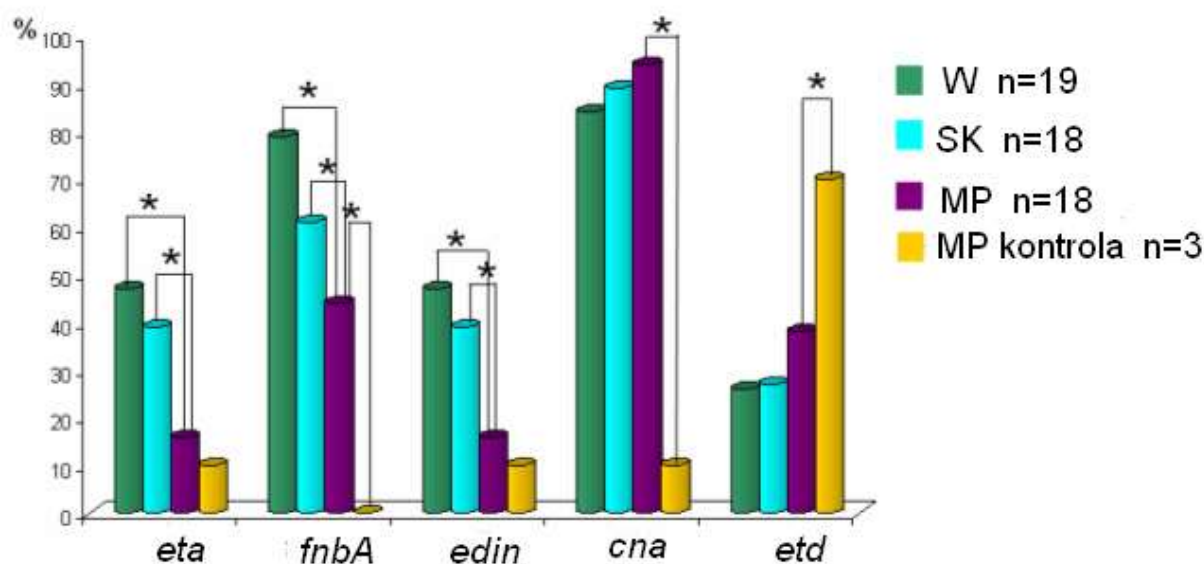
Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości obecności określonych czynników w badanej grupie.

Pary oznaczone * wykazywały różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna; SCNied.- stopa cukrzycowa niedokrwienna, SCNeur.+ SCNied.- wszyscy chorzy z cukrzycą, *mecA+* gen oporności na metycylinę.

5.4.3. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* od chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) i zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału

Występowanie genów *eta*, *fnbA* i *edin* było częstsze u szczepów *S.aureus* pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia (47,4%, 78,9% i 47,4%, odpowiednio; $p < 0,05$) i biopsji z brzegu owrzodzenia (38,9%, 61,1% i 38,9%, odpowiednio; $p < 0,05$) niż u szczepów z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC (16,7%, 44,4% i 16,7%, odpowiednio; $p < 0,05$), co przedstawia Tabela 13 i Rycina 6. Częstość występowania innych genów (*cna* i *etd*) była porównywalna w badanych grupach.



Rycina 6. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* izolowanych z różnych miejsc pobrania od chorych z ZSC i zdrowych ochotników

Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości obecności określonych czynników w badanej grupie.

Pary oznaczone * wykazywały różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W-wyskrobin z dna owrzodzenia, SK-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej, MP kontrola -wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej zdrowych ochotników.

5.4.4. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną (SCNeur.) oraz niedokrwinną (SCNied.) w zależności od miejsca pobrania materiału

Częstość występowania genów *fnbA* i *cna* była znacząco wyższa u szczepów pochodzących z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC (44,4% i 94,0%, odpowiednio; $p < 0,05$) w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami (0% i 10,0%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Przeciwnie, gen *etd* występował znacznie częściej u szczepów *S.aureus* pochodzących z wymazów z przestrzeni międzypalcowej zdrowych ochotników (70,0% vs. 38,8%; $p < 0,05$).

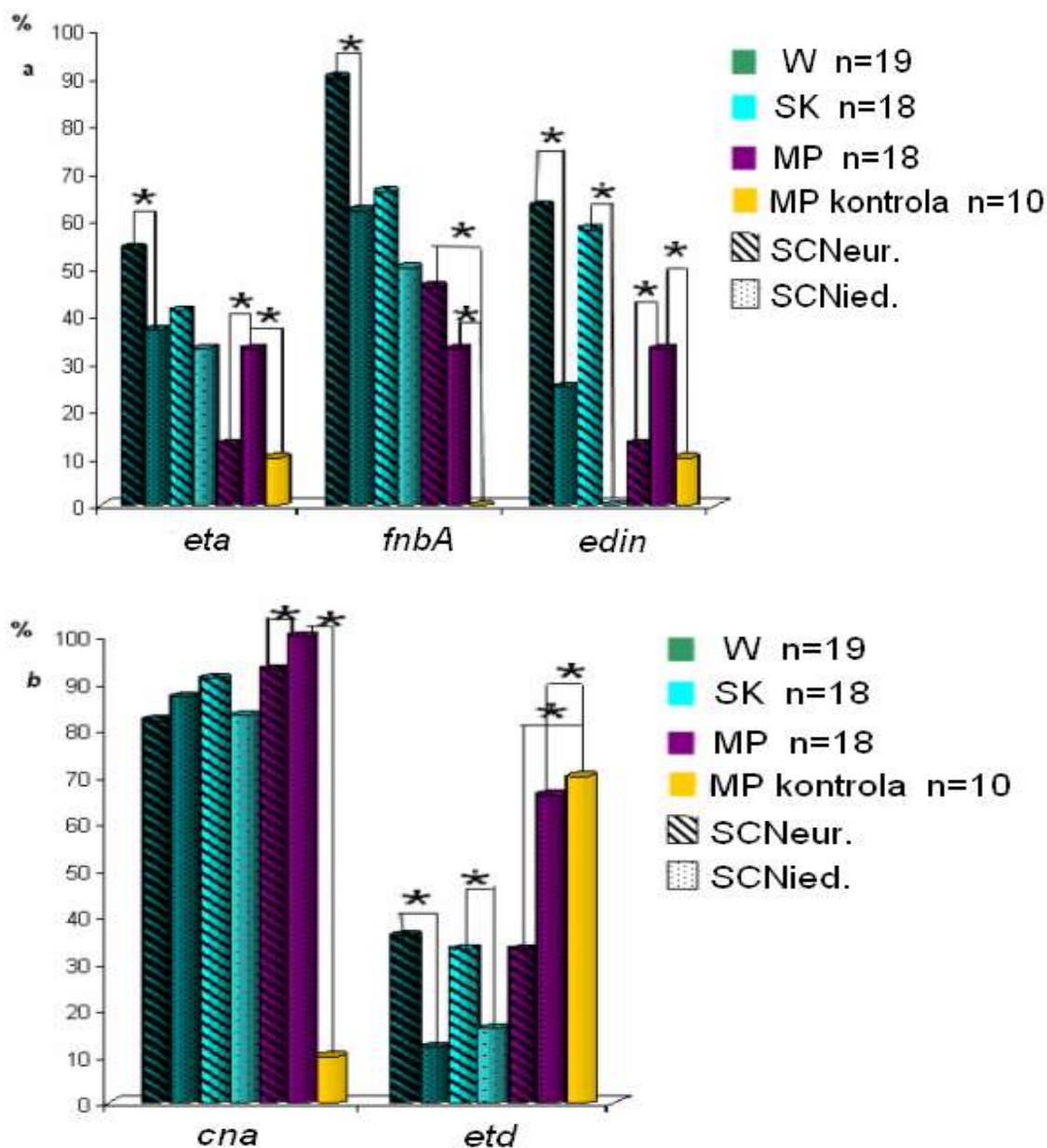
Przewaga genów *eta*, *fnbA*, *etd* i *edin* występowała w wyskrobinach z dna owrzodzenia chorych z SCNeur. (54,5%, 90,9%, 36,4% i 63,6%, odpowiednio; $p < 0,05$) w porównaniu z SCNied. (37,5%, 62,5%, 12,5% i 25,0%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Dla izolatów pochodzących z biopsji skóry częstość występowania dwóch genów (*etd* i *edin*) była znacząco wyższa u bakterii *S.aureus* pochodzących od chorych z SCNeur. (33,3% i 58,3%, odpowiednio; $p < 0,05$) w porównaniu z SCNied. (16,7% i 0%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Geny *eta*, *etd* i *edin* występowały znacznie częściej u szczepów pochodzących z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z SCNied. (33,3%, 66,7% i 33,3%, odpowiednio; $p < 0,05$) w porównaniu z SCNeur. (13,3%, 33,3% i 13,3%, odpowiednio; $p < 0,05$).

Szczepy pochodzące od zdrowych ochotników charakteryzowały się niską częstością występowania badanych genów, z wyjątkiem genu *etd* (70,0%).

Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* izolowanych od chorych z SCNeur. w porównaniu z chorymi z SCNied. i zdrowymi ochotnikami przedstawia Tabela 13 i Rycina 7.



Rycina 7. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* izolowanych od chorych z SCNeur. w porównaniu z chorymi z SCNied. i zdrowymi ochotnikami

Wykresy oznaczone literą **a** obrazują częstość występowania genów wirulencji *eta*, *fnbA* i *edin*, a wykresy oznaczone literą **b** obrazują częstość występowania genów wirulencji dla genów *cna* i *etd*.

Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości obecności określonych czynników w badanej grupie.

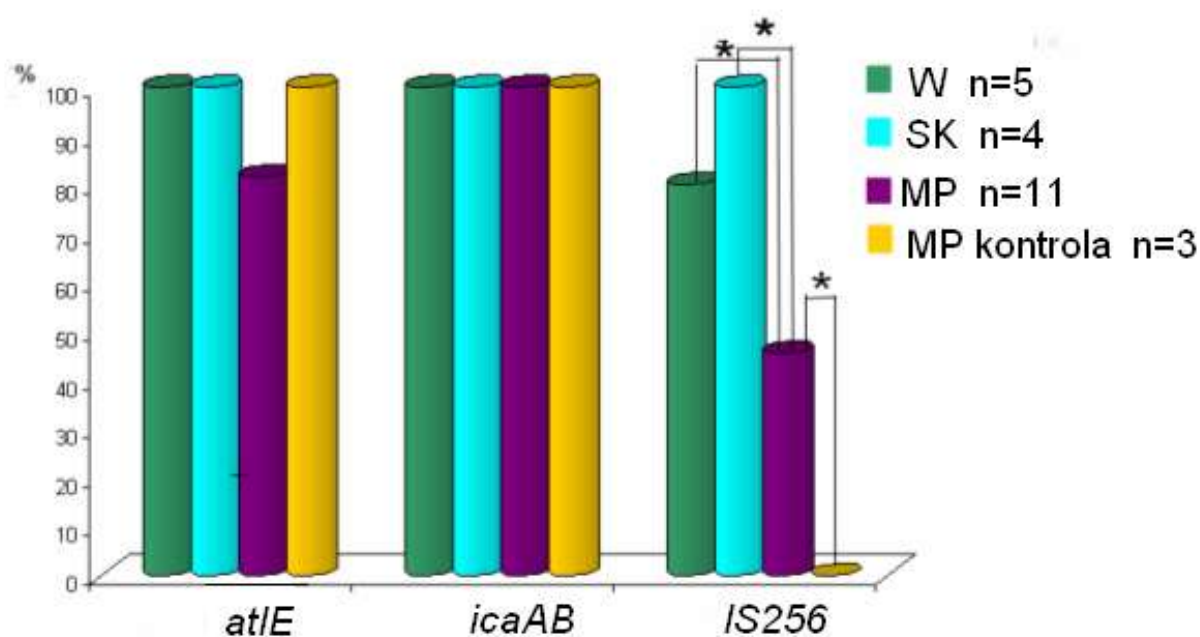
Pary oznaczone * wykazywały różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W-wyskrobiny z dna owrzodzenia, SK-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej, MP kontrola -wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej zdrowych ochotników, SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna; SCNied.- stopa cukrzycowa niedokrwienna.

5.4.5. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.epidermidis* od chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) i zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału

Częstość występowania sekwencji insercyjnej *IS256* była znacząco wyższa u szczepów pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia (80%) i biopsji z brzegu owrzodzenia (100%) w porównaniu z wymazami z powierzchni międzypalcowej (45%) chorych z ZSC. Szczepy pochodzące od zdrowych ochotników nie posiadały sekwencji insercyjnej *IS256*, co przedstawia Tabela 13 i Rycina 8.

Częstość występowania innych genów (*atIE* i *icaAB*) była wysoka i porównywalna pomiędzy izolatami pochodzącymi z różnych miejsc pobrania.



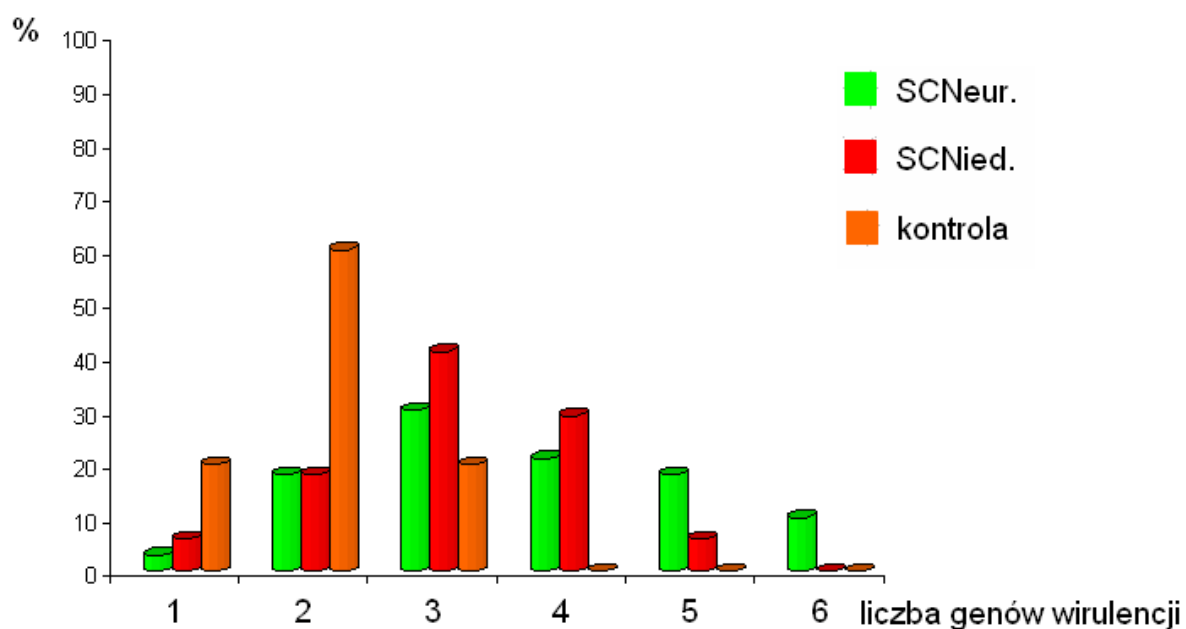
Rycina 8. Obecność genów wirulencji u szczepów *S.epidermidis* izolowanych z różnych miejsc pobrania od chorych z ZSC i zdrowych ochotników

Przedstawione wyniki stanowią procentowe wartości obecności określonych czynników w badanej Pary oznaczone * wykazywały różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$

W-wyskrobiny z dna owrzodzenia, SK-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej, MP kontrola -wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej zdrowych ochotników

5.4.6. Analiza szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pobranych od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną (SCNeur.) i niedokrwienną (SCNied.) oraz od zdrowych ochotników pod kątem częstości występowania genów wirulencji

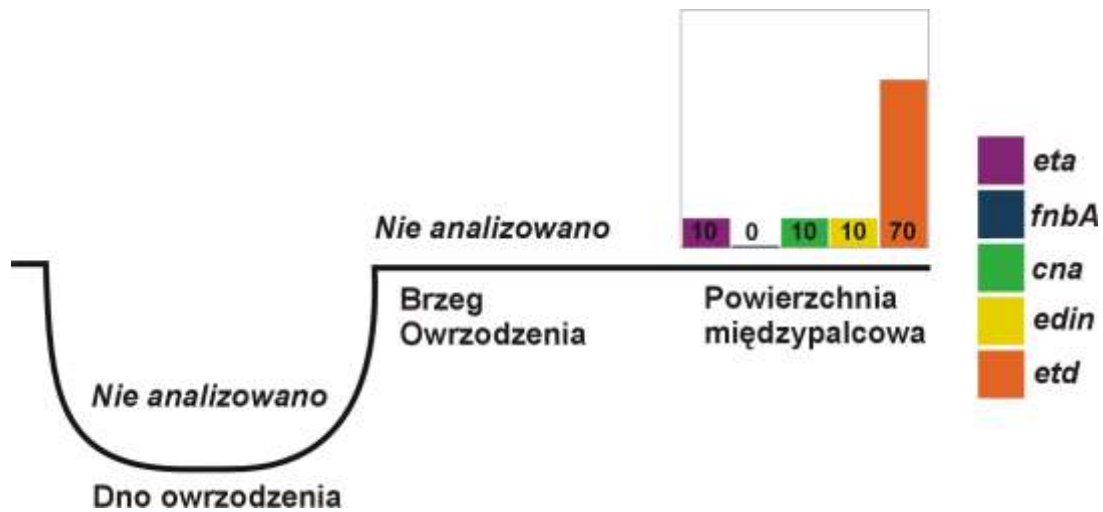
Szczepy pochodzące od chorych z SCNeur. charakteryzowały się obecnością 4 do 5 badanych genów wirulencji w porównaniu do chorych z SCNied. i zdrowych ochotników. Szczepy pochodzące od zdrowych ochotników wykazywały tylko 1 do 2 badanych genów wirulencji. Częstość współwystępowania genów wirulencji pomiędzy szczepami *S.aureus* przedstawia Rycina 9. Zbiorcze wyniki przedstawione są na Rycinach 10-19 i w Tabelach 12, 13 i 14.



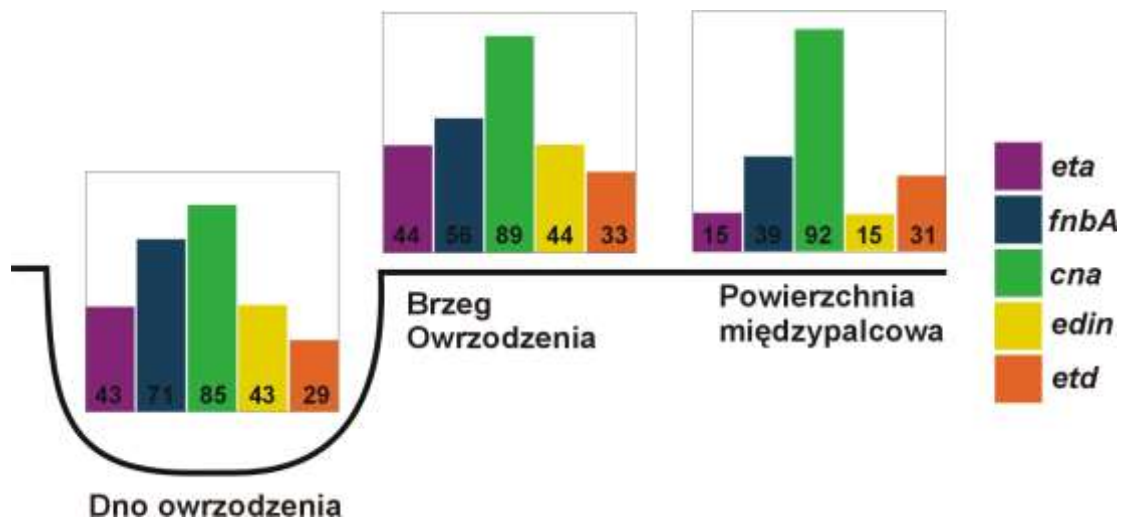
Rycina 9. Częstość współwystępowania genów wirulencji pomiędzy szczepami *S.aureus*.

Na osi Y oznaczono procent szczepów posiadających określoną liczbę genów wirulencji

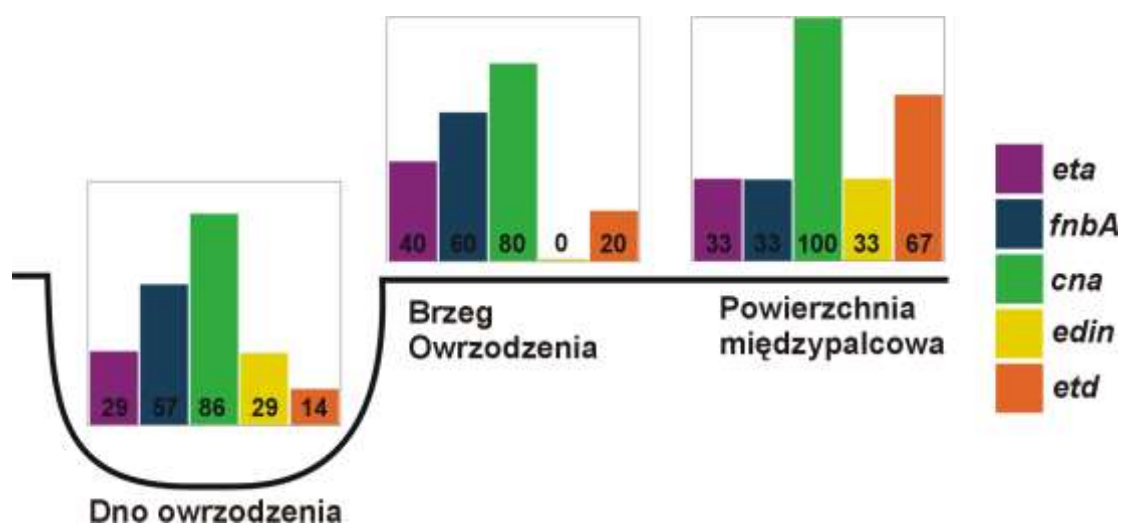
SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna; SCNied.- stopa cukrzycowa niedokrwienna



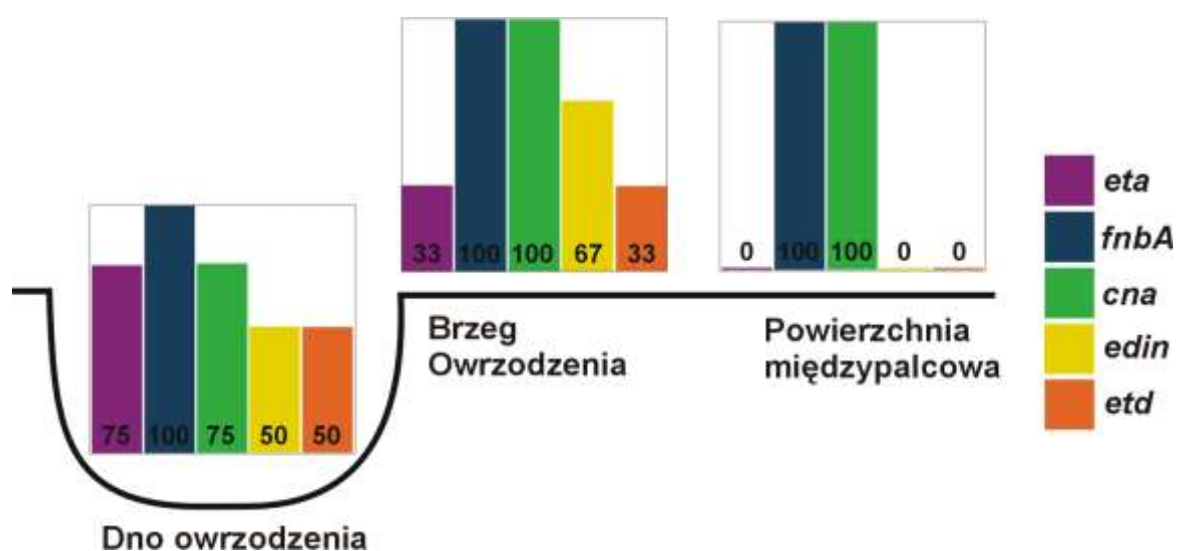
Rycina 10. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.aureus* u zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



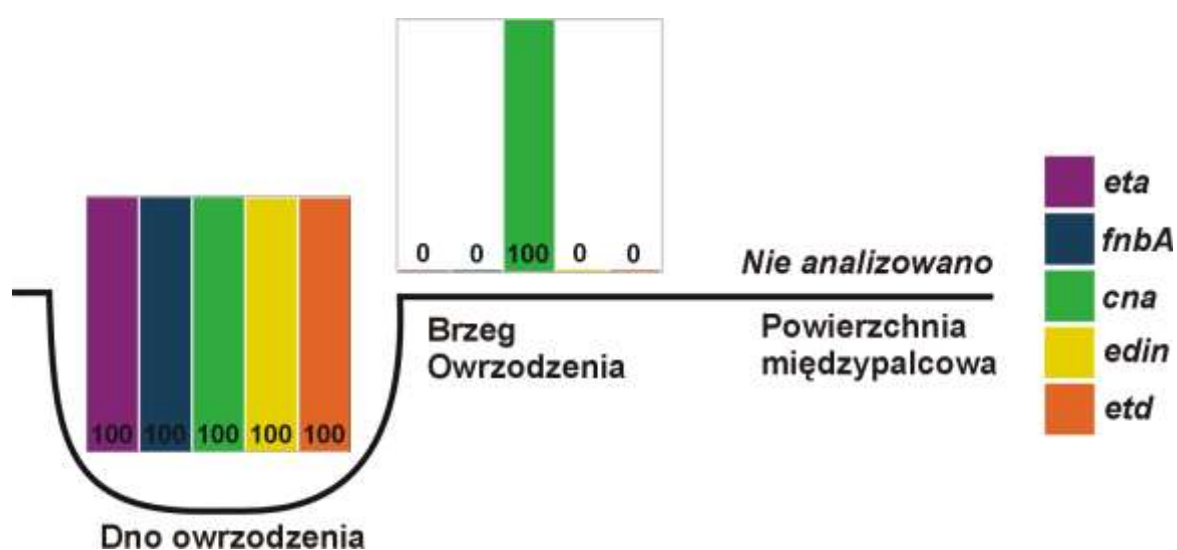
Rycina 11. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.aureus* u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



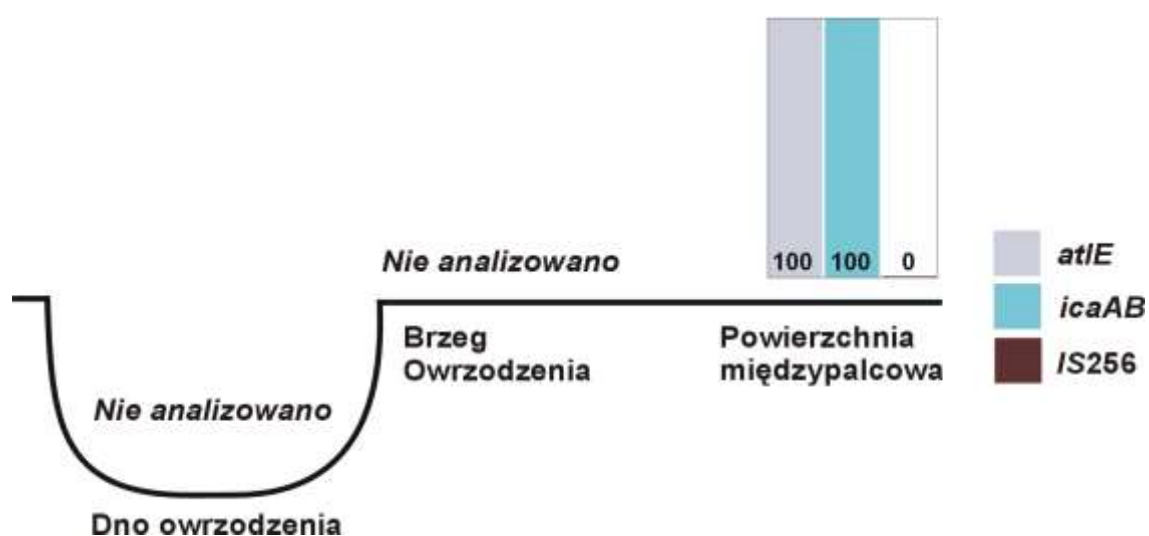
Rycina 12. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S. aureus* u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



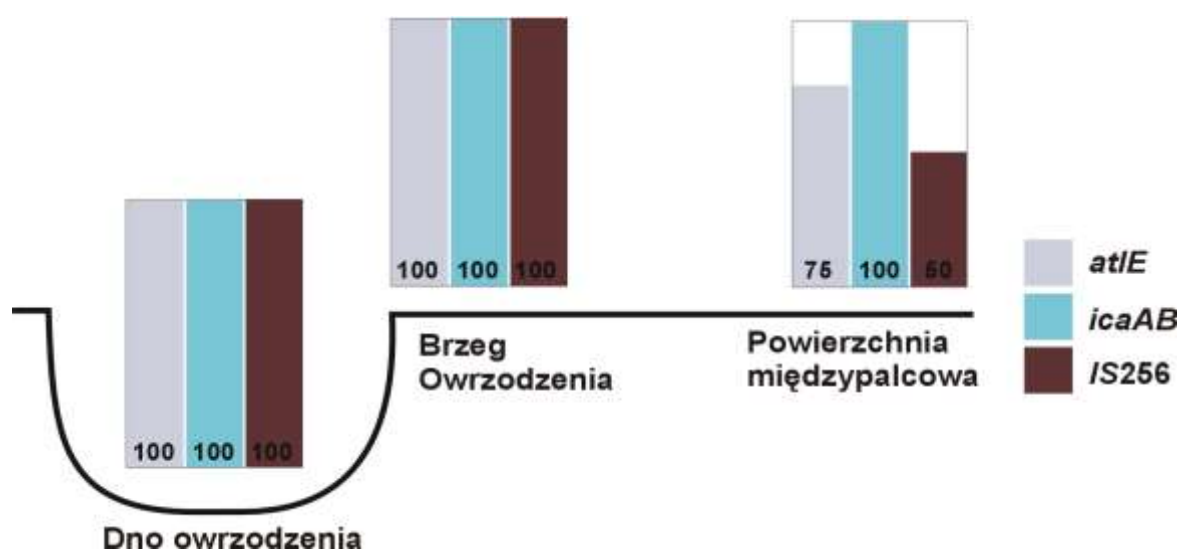
Rycina 13. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S. aureus* u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



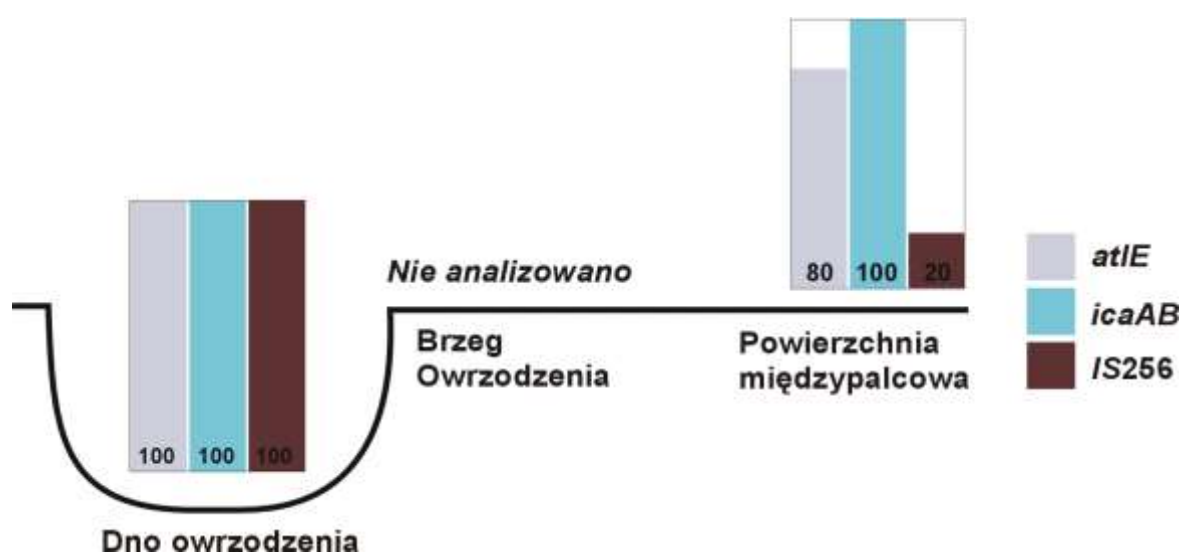
Rycina 14. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S. aureus* u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



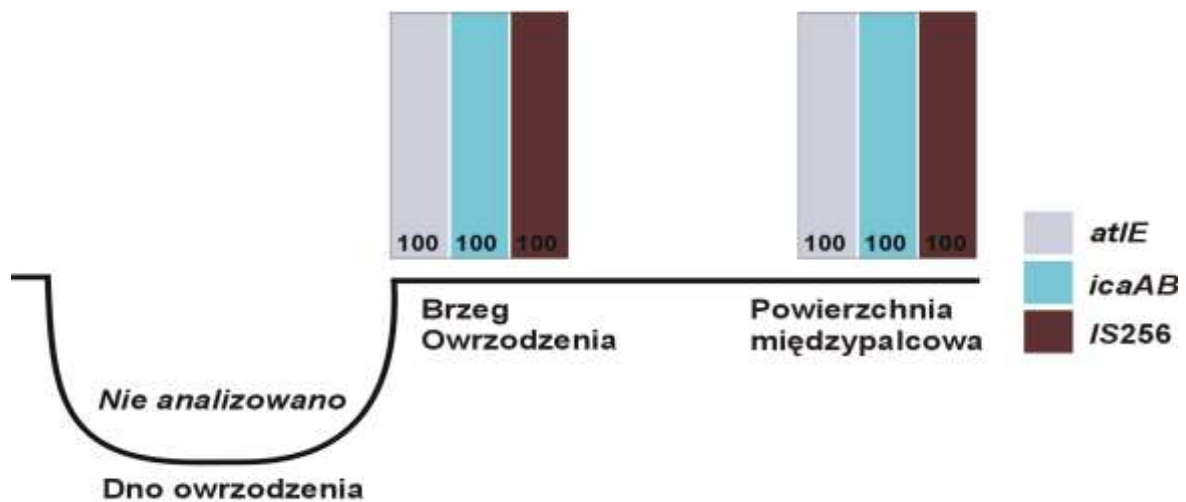
Rycina 15. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S. epidermidis* u zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



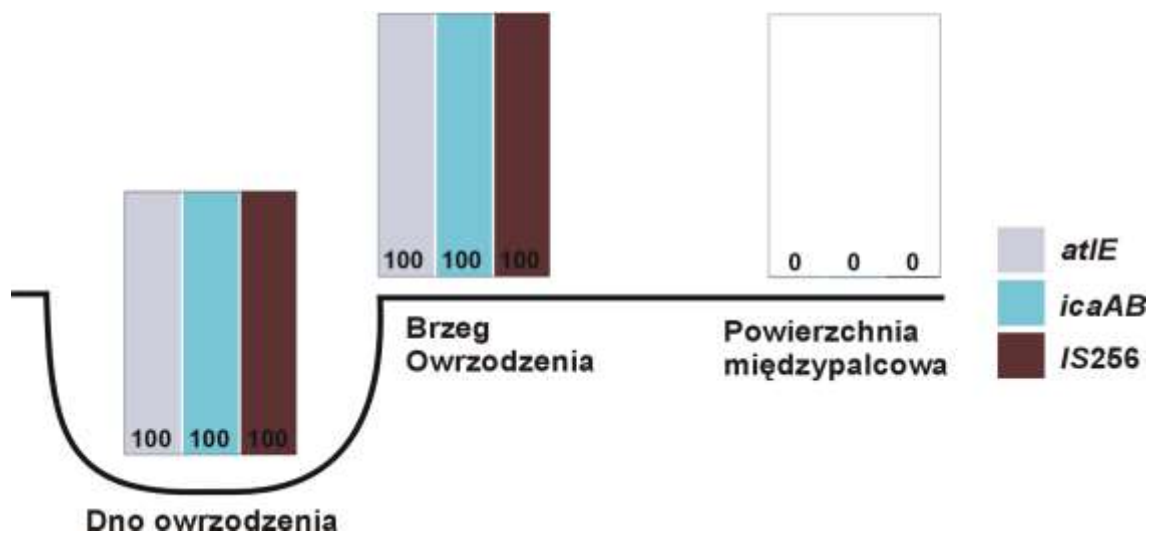
Rycina 16. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.epidermidis* u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



Rycina 17. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.epidermidis* u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



Rycina 18. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.epidermidis* u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)



Rycina 19. Częstość występowania genów wirulencji szczepów *S.epidermidis* u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%)

Tabela 12. Częstość występowania genów wirulencji u metycylinowrażliwych i metycylinoopornych szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzących od chorych z SCNeur. i SCNied.

<i>S.aureus</i>	SCNeur. (%)		SCNied. (%)		Wszyscy chorzy (%)	
	n=39		n=17		n=56	
gen	<i>mecA+</i> (n=18)	<i>mecA-</i> (n=21)	<i>mecA+</i> (n=9)	<i>mecA-</i> (n=8)	<i>mecA+</i> (n=27)	<i>mecA-</i> (n=29)
<i>fnbA</i>	66,6	61,9	33,3 * *	75,0 *	55,5	65,5
<i>cna</i>	88,8	85,7	88,8	87,5	88,8	86,2
<i>eta</i>	44,4 *	23,8	22,2 * *	50,0 *	37,0	31,0
<i>etd</i>	38,8	28,5	22,2	25,0	33,3	27,5
<i>edin</i>	27,7 *	42,8	22,2	25,0	25,9	37,9
<i>S.epidermidis</i>	n=9		n=11		n=20	
gen	<i>mecA+</i> (n=8)	<i>mecA-</i> (n=1)	<i>mecA+</i> (n=10)	<i>mecA-</i> (n=1)	<i>mecA+</i> (n=18)	<i>mecA-</i> (n=2)
<i>atlE</i>	87,5	100,0	90,0	100,0	88,8	100,0
<i>icaAB</i>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>IS256</i>	75,0 *	0	70,0 *	0	72,2 *	0

* $p < 0,05$ *mecA+* vs. *mecA-* (test Chi-kwadrat, test Fischera)

* $p < 0,05$ SCNied. *mecA+* vs. SCNeur. *mecA+* (test Chi-kwadrat)

* $p < 0,05$ SCNied. *mecA-* vs. SCNeur. *mecA-* (test Chi-kwadrat, test Fischera)

Tabela 13. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* izolowanych z tkanki owrzodzenia i wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC oraz zdrowych ochotników

Częstość występowania (%)				
<i>S.aureus</i>	Chorzy z ZSC			Wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników n=10
	Wyskrobiny z dna owrzodzenia n=19	Biopsje z brzegu owrzodzenia n=18	Wymazy z powierzchni międzypalcowej n=18	
<i>fnbA</i>	78,9 *	61,1*	44,4	0*
<i>cna</i>	84,2	88,9	94,0	10,0*
<i>eta</i>	47,4 *	38,9 *	16,7	10,0
<i>etd</i>	26,3	27,8	38,8	70,0*
<i>edin</i>	47,4 *	38,9 *	16,7	10,0
<i>S.epidermidis</i>	Chorzy z ZSC			Wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników n=3
	Wyskrobiny z dna owrzodzenia n=5	Biopsje z brzegu owrzodzenia n=4	Wymazy z powierzchni międzypalcowej n=11	
<i>atlE</i>	100,0	100,0	81,8	100
<i>icaAB</i>	100,0	100,0	100,0	100
<i>IS256</i>	80,0 *	100,0 *	45,5	0*

*p< 0,05 biopsje i wyskrobiny vs wymazy z powierzchni międzypalcowej (test Chi-kwadrat)

*p<0,05 wymazy z powierzchni międzypalcowej chorych vs wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników (test Chi-Kwadrat, test Fischera)

Tabela 14. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* izolowanych od chorych z SCNeur. i SCNied. oraz od zdrowych ochotników

Gen	Źródło izolatów						Wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych (n=10)
	Chorzy z ZSC						
	Wyskrobiny z dna owrzodzenia		Biopsje z brzegu owrzodzenia		Wymazy z powierzchni międzypalcowej		
	SCNeur. (n=11)	SCNied. (n=8)	SCNeur. (n=12)	SCNied. (n=6)	SCNeur. (n=15)	SCNied. (n=3)	
<i>fnbA</i>	90,9 *	62,5	66,7	50,0	46,7 *	33,3 *	0
<i>cna</i>	81,8	87,5	90,9	83,3	93,3 *	100,0 *	10,0
<i>eta</i>	54,5 *	37,5	41,7	33,3	13,3 *	33,3	10,0
<i>etd</i>	36,4 *	12,5	33,3 *	16,7	33,3 * *	66,7	70,0
<i>edin</i>	63,6 *	25,0	58,3 *	0	13,3 *	33,3 *	10,0

*p< 0,05 SCNeur. vs SCNied. (test Chi-kwadrat, test Fischera)

*p<0,05 wymazy z powierzchni międzypalcowej chorych vs wymazy z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników (test Chi-kwadrat, test Fischera)

5.5. Ekspresja genów kodujących czynniki wirulencji szczepów *S.aureus*

Spośród 61 szczepów *S.aureus* ekspresję genów wirulencji badano jedynie u szczepów z potwierdzoną obecnością poszczególnych genów wirulencji.

Ekspresję genów wirulencji obserwowano u różnej liczby szczepów: dla - *fnbA* (64,7%), *cna* (49%), a dla genu *eta* (15,8%), podczas gdy obecność genów wirulencji wynosiła dla *fnbA* (61,8%), *cna* (89,1%), *eta* (34,5%).

Częstość ekspresji genów wirulencji *fnbA*, *cna* i *eta* w Tabelach 15, 16 i 17 dotyczy jedynie szczepów, które posiadają powyższe geny wirulencji.

Tabela 15. Obecność i ekspresja genów wirulencji u szczepów *S.aureus*

Wynik analizy	<i>fnbA</i>		<i>cna</i>		<i>eta</i>	
	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji (n=34)	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji (n=49)	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji (n=19)
obecność	34 (61,8%)	22 (64,7%)	49 (89,1%)	24 (49%)	19 (34,5%)	3 (15,8%)
brak	21 (38,2%)	12 (35,3%)	6 (10,9%)	25 (51%)	36 (65,5%)	16 (84,2%)

Ekspresja genu *fnbA* przeważała w wyskrobinach z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia w porównaniu do wymazów z powierzchni międzypalcowej (78,9% i 61,1% vs 44,4%)..

Ekspresja genu *cna* we wszystkich trzech miejscach pobrania materiału nie różniła się, dla genu *eta* zaobserwowano ekspresję jedynie dla nieznacznej ilości izolatów pochodzących z wyskrobin i biopsji z brzegu owrzodzenia (22,2% i 14,3%)

Zbiorcze wyniki przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Ekspresja genów wirulencji u szczepów *S.aureus* w zależności od miejsca pobrania materiału

Gen	Źródło izolatów					
	<i>fnbA</i>		<i>cna</i>		<i>eta</i>	
	Obecność genu wirulencji (n=34)	Ekspresja genu wirulencji (n=22)	Obecność genu wirulencji (n=49)	Ekspresja genu wirulencji (n=24)	Obecność genu wirulencji (n=19)	Ekspresja genu wirulencji (dla n=3)
Wyskrobiny z dna owrzodzenia (n=19)	15 (78,9%)	11 (73,3%)	16 (84,2%)	9 (56,3%)	9 (47,4%)	2 (22,2%)
Biopsje z brzegu owrzodzenia (n=18)	11 (61,1%)	7 (63,6%)	16 (84,2%)	7 (43,8%)	7 (38,9%)	1 (14,3%)
Wymazy z powierzchni międzypalcowej (n=18)	8 (44,4%)	4 (50%)	17 (94,4%)	8 (47,1%)	3 (16,7%)	0 (0%)

Ekspresja genu *fnbA* przeważała u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną w porównaniu do chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną (72% vs 44,4%). Dla genów *cna* i *eta* nie zaobserwowano różnic w częstości ekspresji genów wśród chorych z różnym rodzajem stopy cukrzycowej (Tabela 17).

Tabela 17. Ekspresja genów wirulencji u szczepów *S.aureus* w zależności od rodzaju stopy cukrzycowej

	Źródło izolatów					
	<i>fnbA</i>		<i>cna</i>		<i>eta</i>	
	Obecność genu wirulencji (n=34)	Ekspresja genu wirulencji (n=22)	Obecność genu wirulencji (n=49)	Ekspresja genu wirulencji (n=24)	Obecność genu wirulencji (n=19)	Ekspresja genu wirulencji (dla n=3)
SCNeur. (n=38)	25 (65,8%)	18 (72%)	34 (89,5%)	17 (50%)	13 (34,2%)	2 (15,4%)
SCNied. (n=17)	9 (52,9%)	4 (44,4%)	15 (88,2%)	7 (46,7%)	6 (35,3%)	1 (16,7%)

Częstość ekspresjonowania genów wirulencji wśród wszystkich szczepów *S.aureus* (posiadających i pozbawionych genów wirulencji *fnbA*, *cna*, *eta*) przedstawia Tabela 18.

Ekspresja genów *fnbA* i *cna* była bliska 40%, dla genu *eta* jedynie 5,4%. Najczęściej obserwowano ekspresję genu *fnbA* w wyskrobinach z dna owrzodzenia (57,9%). Ekspresja bliska 40% wystąpiła również w biopsjach z brzegu owrzodzenia dla genu *fnbA* i we wszystkich trzech miejscach pobrania materiału dla genu *cna*.

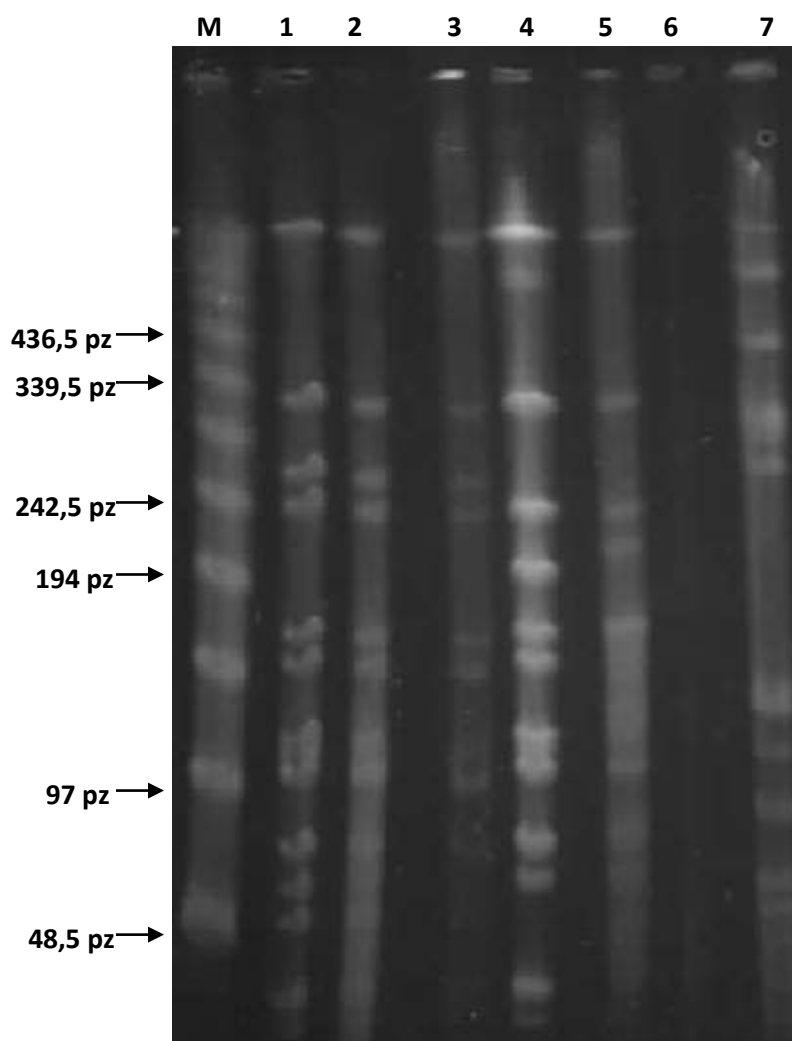
Podział chorych ze względu na rodzaj stopy cukrzycowej pokazuje, że ekspresja genu *fnbA* przeważa (47,4%) w stopie cukrzycowej neuropatycznej. Ekspresja genu *cna* kształtuje się na podobnym poziomie w obydwu badanych grupach chorych (ok. 40%).

Ekspresja genu *eta* jest bardzo niska w każdej z badanych grup chorych i w każdym miejscu pobrania materiału do badań (0%-10,5%).

Tabela 18. Ekspresja genów wirulencji u szczepów *S.aureus*

Wynik analizy	<i>fnbA</i>		<i>cna</i>		<i>eta</i>	
	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji	Obecność genu wirulencji	Ekspresja genu wirulencji
Obecność (dla n=55)	34 (61,8%)	22 (40%)	49 (89,1%)	24 (43,6%)	19 (34,5%)	3 (5,4%)
Brak (dla n=55)	21 (38,2%)	33 (60%)	6 (10,9%)	31 (56,4%)	36 (65,5%)	52 (94,6%)
Wyskrobiny z dna owrzodzenia (n=19)	15 (78,9%)	11 (57,9%)	16 (84,2%)	9 (47,4%)	9 (47,4%)	2 (10,5%)
Biopsje z brzegu owrzodzenia (n=18)	11 (61,1%)	7 (38,9%)	16 (84,2%)	7 (38,9%)	7 (38,9%)	1 (5,5%)
Wymazy z powierzchni międzypalcowej (n=18)	8 (44,4%)	4 (22,2%)	17 (94,4%)	8 (44,4%)	3 (16,7%)	0 (0%)
SCNeur. (n=38)	25 (65,8%)	18 (47,4%)	34 (89,5%)	17 (44,7%)	13 (34,2%)	2 (5,3%)
SCNied. (n=17)	9 (52,9%)	4 (23,5%)	15 (88,2%)	7(41,2%)	6 (35,3%)	1 (5,9%)

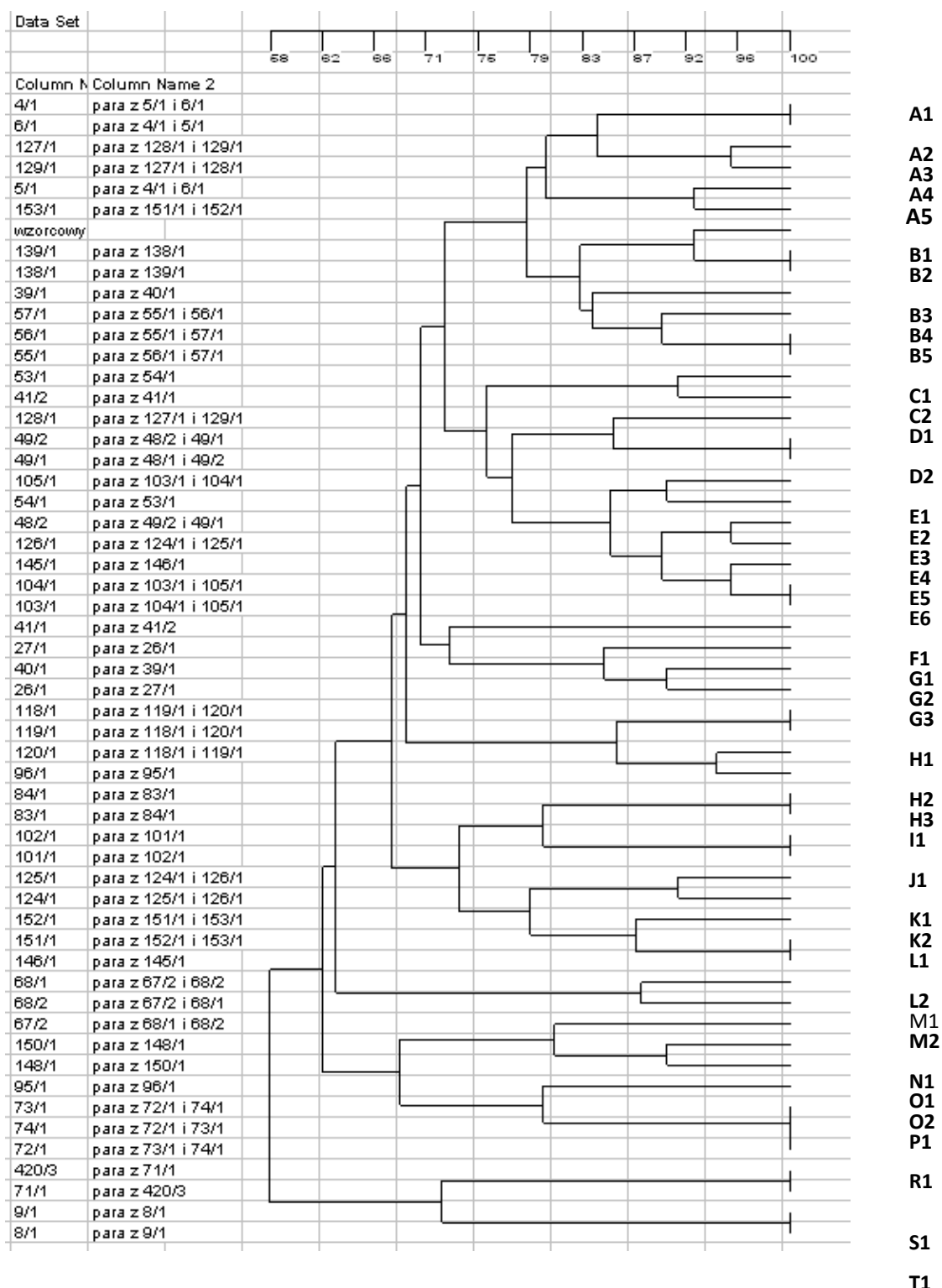
5.6. Badanie podobieństwa genetycznego szczepów techniką PFGE



Rycina 20. *Podobieństwo genetyczne szczepów zbadane przy zastosowaniu techniki PFGE. Ścieżki 1, 2 i 3- szczepy identyczne; ścieżka 4 i 5 – szczepy potencjalnie spokrewnione; ścieżka 7- szczep niespokrewniony*

Przy zastosowaniu techniki PFGE zbadano 54 szczepy *S.aureus*. Przykładowy wynik badania podobieństwa szczepów techniką PFGE przedstawia Rycina 20. Porównanie w obrębie szczepów pochodzących od poszczególnych chorych (2 lub 3 szczepy z różnych miejsc pobrania od jednego chorego) wykazało 100% podobieństwa dla 25 szczepów i ponad 80% podobieństwa dla 15 szczepów, co łącznie stanowi 40 szczepów (74% wszystkich szczepów). Porównanie podobieństwa genetycznego szczepów od wszystkich pacjentów wskazało na ponad 80% podobieństwo u 37 szczepów (stanowi to 68,5% wszystkich szczepów). Pozostałe szczepy były różne (cechowały się

podobieństwem mniejszym niż 80%). Dendrogram pokazujący podobieństwo genetyczne izolatów *S.aureus* przedstawia Rycina 21.



Rycina 21. Dendrogram pokazujący podobieństwa między szczepami *S.aureus* w badanej populacji chorych

Bakterie pochodzące z różnych miejsc pobrania od tego samego chorego podczas badania podobieństwa techniką PFGE cechowały się w większości identycznym lub bardzo podobnym wzorem prążkowym na żelu. Obraz dendrogramu pokazuje te szczepy jako identyczne lub blisko spokrewnione (czyli mające $\geq 80\%$ podobieństwo). Przykładowo na dendrogramie są to szczepy 4/1, 5/1 i 6/1; 127/1 i 129/1; 138/1 i 139/1; 55/1, 56/1 i 57/1.

Badane szczepy *S.aureus* należą do 19 typów (A-T). Typy stanowią szczepy blisko spokrewnione. Wyróżniono 12 podtypów: A1, B2, B5, D2, E6, H1, I1, J1, L2, R1, S1, T1, do którego należą 2 lub 3 szczepy identyczne (tu: pochodzące od tego samego chorego z różnych miejsc pobrania). Szczepy A1-A5, B1-B5, C1-C2, D1-D2, E1-E6, G1-G3, H1-H3, K1-K2, L1-L2, M1-M2, O1-O2 cechują się podobieństwem $\geq 80\%$ w obrębie odpowiedniego typu (A-O).

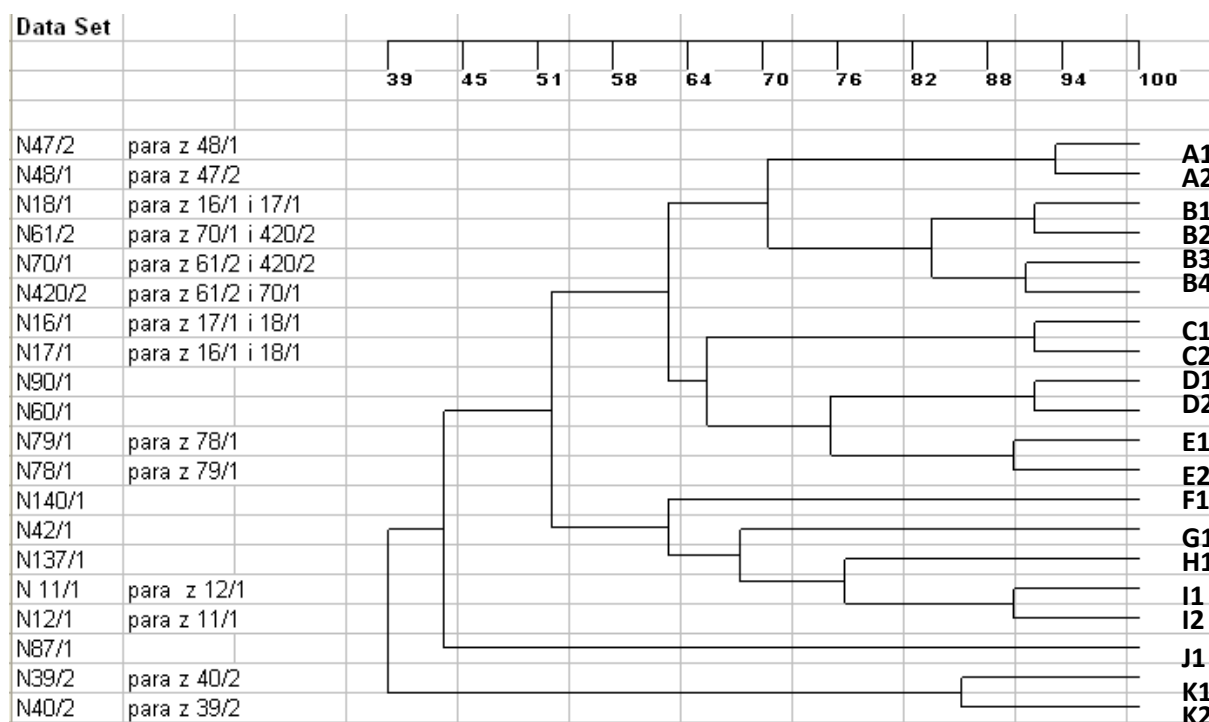
Porównanie w obrębie szczepów *S.aureus* pochodzących od poszczególnych chorych leczonych szpitalnie wykazało ponad 80% podobieństwa w parach lub trójkach dla wszystkich 7 szczepów; porównanie szczepów od wszystkich chorych wskazuje, że szczepy nie są spokrewnione (podobieństwo mniejsze niż 80%).

Badanie podobieństwa szczepów *S.aureus* u chorych leczonych ambulatoryjnie wskazuje na bliskie spokrewnienie ($>80\%$ podobieństwa) u 28 z 47 szczepów (59,6%) tworzących dwójki lub trójki u poszczególnych chorych. Porównanie w obrębie szczepów *S.aureus* pochodzących od wszystkich chorych pokazuje, że 13 z 47 szczepów (27,7%) cechuje się podobieństwem $>80\%$ jedynie w obrębie poszczególnych chorych, od których pochodzą. U pozostałych 34 z 47 szczepów (72,3%) potwierdzono podobieństwo przewyższające 80% do szczepów pochodzących od różnych chorych.

Zbadano 20 szczepów *S.epidermidis*, z których 14 szczepów pochodziło z różnych miejsc pobrania od poszczególnych chorych (2 lub 3 szczepy z różnych miejsc pobrania od jednego chorego) oraz 6 szczepów, które występowały pojedynczo u chorych.

Porównanie w obrębie szczepów pochodzących od poszczególnych chorych, które tworzą pary lub trójki wykazało $> 80\%$ podobieństwa dla 13 z 14 szczepów (93%). Porównanie podobieństwa genetycznego szczepów od wszystkich pacjentów wskazało na ponad 80% podobieństwo u 6 szczepów (stanowi to 30% wszystkich szczepów).

Dendrogram pokazujący podobieństwo genetyczne izolatów *S.epidermidis* przedstawia Rycina 22.



Rycina 22. Dendrogram pokazujący podobieństwa między szczepami *S.epidermidis* w badanej populacji chorych

Szczepy blisko spokrewnione na dendrogramie: 47/2 i 48/1, 61/2, 70/1 i 420/2, 16/1 i 17/1, 78/1 i 79/1, 11/1 i 12/1, 39/2 i 40/2.

Badane szczepy *S.epidermidis* należą do 11 typów (A-K). Typy stanowią szczepy blisko spokrewnione (czyli mające $\geq 80\%$ podobieństwo). Szczepy A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, D1, D2, E1, E2, I1, I2, K1, K2 cechują się podobieństwem $\geq 80\%$ i stanowią podtypy w obrębie odpowiedniego typu (A-K).

Badanie podobieństwa szczepów *S.epidermidis* u chorych leczonych ambulatoryjnie wskazuje na bliskie spokrewnienie ($>80\%$ podobieństwa) u wszystkich 15 szczepów tworzących dwójki lub trójki u poszczególnych chorych. Określenie podobieństwa w obrębie szczepów *S.epidermidis* pochodzących od wszystkich chorych pokazuje, że 13 z 15 szczepów (86,7%) wykazuje podobieństwo $>80\%$ do szczepów pochodzących od różnych chorych.

Określenie podobieństwa pomiędzy szczepami *S.epidermidis* pochodzącymi od poszczególnych chorych leczonych szpitalnie wskazuje, że większość szczepów (80%) charakteryzuje się podobieństwem powyżej 80% w obrębie par lub trójek, nie stwierdzono przemieszczania się szczepów pomiędzy chorymi.

6. Podsumowanie wyników

S.aureus przeważał wśród gronkowców izolowanych z wyskrobin z dna, z brzegu owrzodzenia i z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) oraz w izolatach z wymazów z powierzchni międzypalcowej zdrowych ochotników (50-64,7%).

Szczepy MRSA i MRSE były nieobecne u zdrowych ochotników.

Szczepy MRSA u pacjentów ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną były częściej izolowane z wymazów z powierzchni międzypalcowej (62,5% i 100%) w porównaniu z wyskrobinami z dna owrzodzenia (36,4% i 37,5%) i z biopsji z brzegu owrzodzenia (33,3% i 50%).

U chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną obecność genów *eta* i *fnbA* była częściej związana ze szczepami MRSA niż MSSA. Częstość występowania pozostałych genów u szczepów *S.aureus* pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną była porównywalna.

Zaobserwowano znaczącą przewagę genów *eta*, *fnbA* i *edin* pomiędzy szczepami pochodzącymi z owrzodzenia (wyskrobin i biopsji) w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC.

Częstotliwość występowania szczepów *S.epidermidis* pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną była znacząco wyższa w porównaniu z chorymi ze stopą cukrzycową neuropatyczną (26,7% vs 5,9%).

S.epidermidis przeważał w izolatach pochodzących z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami.

Szczepy MRSE u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną przeważały we wszystkich źródłach pobrania (83,3-100%), poza wyskrobinami z dna owrzodzenia.

Częstość występowania sekwencji insercyjnej *IS256* była znacząco wyższa u szczepów MRSE w porównaniu ze szczepami MSSE, zarówno u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną, jak również u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną.

Częstość występowania genów *atlE* i *icaAB* była wysoka i porównywalna pomiędzy izolatami pochodzącymi z różnych miejsc pobrania od chorych z ZSC.

Sekwencja insercyjna *IS256* przeważała u szczepów pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia. Sekwencja występowała rzadziej u szczepów pochodzących z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC.

Szczepy pochodzące od zdrowych ochotników nie posiadały sekwencji insercyjnej *IS256*.

Ekspresję genów określano jedynie u szczepów z potwierdzoną obecnością poszczególnych genów wirulencji. Wykazano ekspresję genów u różnej liczby szczepów: *fnbA* (64,7%), *cna* (49%), *eta* (15,8%).

Ekspresja genu *fnbA* przeważała w wyskrobinach z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia w porównaniu do wymazów z powierzchni międzypalcowej.

Dla genu *eta* zaobserwowano ekspresję u jedynie nieznacznej ilości izolatów pochodzących z wyskrobin i biopsji z brzegu owrzodzenia.

Podział chorych ze względu na rodzaj stopy cukrzycowej pokazał, że ekspresja genu *fnbA* w stopie cukrzycowej neuropatycznej wynosiła 47,4% i przeważała w porównaniu do chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną (23,5%).

Ekspresja genu *eta* była bardzo niska w każdej z badanych grup chorych i w każdym miejscu pobrania materiału do badań.

Porównanie w obrębie szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzących od poszczególnych chorych leczonych szpitalnie wykazało, że każdy chory posiadał swój własny klon *S.aureus* i *S.epidermidis*, a szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzące od poszczególnych chorych leczonych szpitalnie nie są spokrewnione. Świadczy to o braku występowania zakażeń krzyżowych w badanej grupie chorych.

Szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* wyizolowane od chorych leczonych ambulatoryjnie wykazują bliskie spokrewnienie w odniesieniu do różnych miejsc pobrania materiału od poszczególnych chorych, jak również w odniesieniu do wszystkich chorych. Może to świadczyć o przemieszczaniu się szczepów między chorymi w ambulatorium.

7. Dyskusja

7.1. Czynniki wirulencji bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis*

W toku prowadzonych badań oceniono częstość występowania genów wirulencji u szczepów *S.aureus* (*eta*, *fnbA*, *cna*, *etd*, *edin*) i *S.epidermidis* (*atlE*, *icaAB*, *IS256*) pochodzącymi od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej. Oceny dokonano u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną, a także pomiędzy szczepami MRSA i MSSA. Zbadano także wielooporność bakterii *S.aureus* na antybiotyki. Przeprowadzone badania służyły też próbie wykazania, iż istnieje różnica w zasiedlaniu przez gronkowce owrzodzeń u chorych ze stopą cukrzycową, przy podziale na stopę neuropatyczną i niedokrwienną, a bakterie obecne w ranie, jej brzegu i na powierzchni skóry różnią się co do obecności i ekspresji czynników wirulencji. Może to wpływać w różnym stopniu na wydłużenie czasu gojenia się tych dwóch typów owrzodzeń.

7.1.1. Obecność genów wirulencji *S.aureus* u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej

Problematyka dotycząca genów wirulencji gronkowców jest często poruszana w literaturze. Ten rodzaj bakterii jest bardzo rozpowszechniony na świecie i może być przyczyną zakażeń praktycznie wszystkich tkanek.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano genom *fnbA* (kodującym białko wiążące fibronektynę) i *cna* (białko wiążące kolagen). Geny powyższe uczestniczą w wiązaniu się bakterii do składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Inicjują w ten sposób adhezję bakterii *S.aureus* do komórek gospodarza oraz inwazję komórek gospodarza. Procesy te przyczyniają się do opóźnienia gojenia owrzodzeń [46].

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że występowanie genu *fnbA* było częstsze u szczepów *S.aureus* pochodzących z wyskrobin pobranych z dna owrzodzenia i z biopsji pochodzącej z brzegu owrzodzenia w porównaniu ze szczepami wyizolowanymi z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC. Jednocześnie geny *fnbA* i *cna* przeważały u szczepów wyizolowanych z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami.

Uwzględniając miejsce pobrania materiału do badań oraz rodzaj stopy cukrzycowej wykazano wyższą częstość występowania genu *cna* w porównaniu

z genem *fnbA* we wszystkich trzech miejscach pobrania próbek zarówno u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną, jak również niedokrwienną.

Odmienne wyniki uzyskali Arciola i wsp. [8], którzy zbadali bakterie *S.aureus* różnego pochodzenia. Wyniki wskazały, że 89,7% szczepów, bez względu na źródło, posiada zdolność wiązania się do fibronektyny (gen *fnbA*), a tylko 20,1% izolatów charakteryzuje się obecnością genu *cna* (wiązanie się do kolagenu). Arciola i wsp. potwierdzili obecność genu *fnbA* u większości szczepów *S.aureus* powiązanych z zakażeniami ortopedycznymi [8]. Co więcej gen *fnbA* obecny był u 100% szczepów izolowanych z zakażeń protez biodrowych i stawów kolanowych. Również Zmantar i wsp. [145] wykazali, że gen *fnbA* obecny był u 96,6% szczepów pochodzących z implantów ortopedycznych powiązanych z zakażeniami. Podobne wyniki uzyskali Kouidhi i wsp. [76], którzy potwierdzili obecność genu *fnbA* u 100% szczepów izolowanych z zakażeń protez kolan i stawów kolanowych. Autorzy badali szczepy różnego pochodzenia z wykluczeniem chorych cukrzycowych.

Wyniki uzyskane w obecnej pracy doktorskiej - 82-100% obecność genu *cna* u wszystkich szczepów pochodzących od chorych z ZSC -wskazują na większe znaczenie diagnostyczne obecności genu *cna* u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej niezależnie od jej typu i miejsca pobrania. Zdolność do wiązania się do kolagenu izolowanych bakterii może być też niekorzystnym czynnikiem prognostycznym powikłań w postaci zapaleń kości.

Obecność genu *cna* nie jest powszechna u szczepów pochodzących od chorych z ZSC i waha się w przedziale 38-56% pozytywnych wyników. U zdrowych ochotników u bakterii obecnych w jamie nosowej wykazano obecność genu *cna* w 48% przypadków [140]. Według Zmantar i wsp. [153] gen *cna* obecny był u 56,5% szczepów pochodzących od chorych z infekcjami uszu. Podobne wyniki uzyskali Peacock i wsp. [103], którzy zaobserwowali 52% szczepów pozytywnych dla tego genu u osób z różnymi schorzeniami. Według Wiśniewskiej i wsp. [140] geny *fnbA* i *fnbB* obecne są w 85% badanych szczepów, a *cna* w 54%. Autorzy ci potwierdzili ponadto statystycznie istotne różnice pomiędzy szczepami *S.aureus* metycylinoopornymi i metycylinowrażliwymi. Geny *fnbA*, *fnbB* i *cna* występowały odpowiednio u 90%, 90% i 63% szczepów MRSA i odpowiednio u 67%, 67% i 24% szczepów MSSA. W zależności od miejsca pobrania materiału do badań, szczepy posiadające gen *cna* stanowiły od 25% szczepów izolowanych z krwi do 69% szczepów izolowanych z nosa, gardła i oczu.

Obecność genu *edin* (inhibitor różnicowania się komórek naskórka) powiązana jest ze zdolnością bakterii *S.aureus* do inwazji komórek gospodarza. Występowanie genu *edin* sprzyja zakażeniom głębokim tkanek miękkich, a toksyna Edin hamuje proces gojenia się ran na poziomie komórek śródbłonka [94].

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano przewagę występowania genu *edin* w wyskrobinach z dna owrzodzenia chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną (63,6%) w porównaniu ze stopą cukrzycową niedokrwienną (25%). Ponadto gen *edin* przeważał w tej grupie chorych w izolatach pochodzących z biopsji skóry. Gen *edin* jest powiązany głównie z zakażeniami dna owrzodzeń u chorych leczonych szpitalnie.

Częstość występowania genu *edin* u szczepów *S.aureus* jest różna w poszczególnych krajach i plasuje się w przedziale 4-15%. W populacji niemieckiej wśród genów *edin* przeważa *edin-B* (ok. 80% wszystkich pozytywnych wyników dla obecności genu *edin*). Badania sprawdzające częstość występowania genów *etd* i *edin-B* nie wykazały różnic pomiędzy szczepami szpitalnymi i kolonizującymi (odpowiednio 10% i 9%) [38]. Po raz pierwszy Messad i wsp. [89] wskazali, że 71,4% szczepów *S.aureus* *edin*-pozytywnych było powiązanych ze średnimi i poważnymi zakażeniami (stopień 3 i 4 klasyfikacji IDSA) porównując z 28,6% *edin*-pozytywnych szczepów powiązanych z niskim stopniem zakażenia. Większość szczepów posiadała gen *edin-B* (86,7%). Obecność genu *edin* może być wskazaniem do wdrożenia wielospecjalistycznego leczenia u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej.

Do toksyn gorączkotwórczych odpowiedzialnych za zakażenia skóry u ludzi zaliczane są eksfoliatyny *eta* i *etd*. Eksfoliatyna *eta* przyczynia się do złuszczenia naskórka i powstawania pęcherzy. Ułatwia w ten sposób wnikanie bakterii do głębszych warstw naskórka [2].

Przeprowadzone badania pokazują, że występowanie genów *eta* i *etd* było częstsze u szczepów *S.aureus* pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną oraz w wymazach z powierzchni międzypalcowej u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną. Zaobserwowano również bardzo częste występowanie genu *etd* (70%) u szczepów *S.aureus* pochodzących z wymazów z przestrzeni międzypalcowej zdrowych ochotników. Obecność genu *etd* w wymazach z powierzchni międzypalcowych może być powiązana z kolonizacją grzybami.

Częste występowanie genów *fnbA*, *cna*, *edin* i *eta* u szczepów *S.aureus* pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia i skóry z brzegu owrzodzenia u chorych z ZSC wskazuje, że szczepy wirulentne przeważają w owrzodzeniu. To potwierdza teorię „fitness”, szybkiej adaptacji bakterii do szczególnych warunków owrzodzeń stopy cukrzycowej i warunkuje ich inwazyjność.

Otrzymane w pracy wyniki są zgodne z uzyskanymi przez innych badaczy. Peacock i wsp. [103] zaobserwowali, że geny *fnbA*, *cna* i *eta* są powszechne w izolatach

inwazyjnych. Autorzy wykazali, że 98% szczepów inwazyjnych i 87% szczepów od osób zdrowych posiadało gen *fnbA*.

Przedstawione badania wykazały również, że rozkład częstości występowania genów wirulencji w zależności od miejsca pobrania materiału był inny w grupie chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną. Geny wirulencji *eta*, *fnbA* i *edin* przeważały w izolatach pochodzących z wyskrobin i skóry chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną w porównaniu do chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną. W przypadku szczepów izolowanych z powierzchni międzypalcowych powyższe geny wirulencji przeważały u chorych z niedokrwieniem.

U chorych ze stopą neuropatyczną owrzodzenia najczęściej poddaje się leczeniu dopiero, gdy stają się bardzo rozległe i głębokie. Wirulentne bakterie mają więcej czasu na przemieszczenie się do wnętrza owrzodzenia i przystosowanie do warunków bytowania. Czynnikiem selekcyjnym może być też długotrwała antybiotykoterapia.

U chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną zauważalne były różnice w częstości występowania niektórych genów wirulencji u szczepów opornych na metycylinę i wrażliwych na metycylinę. Geny *eta*, *fnbA* i *edin* dominowały w izolatach metycylinoopornych u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną oraz w izolatach metycylinowrażliwych u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną.

Postępowanie lecznicze powinno zatem uwzględniać różnice w obu grupach chorych. Zamiast przewlekłej antybiotykoterapii być może bardziej celowe będzie zastosowanie w grupie chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną wczesnego leczenia chirurgicznego, które poprawi ukrwienie i zapobiegnie dalszemu rozwojowi owrzodzenia oraz amputacji.

Wyniki badań przedstawionych w dysertacji potwierdzają, że szczepy *S.aureus* pochodzące od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną znacznie częściej wykazują obecność kilku genów wirulencji. W grupie tych chorych 18% wymienionych szczepów posiadało 4 geny wirulencji, w porównaniu do 6% szczepów w grupie chorych ze stopą niedokrwienną. Obecność 5 genów wirulencji obserwowano jedynie u bakterii wyizolowanych od chorych z owrzodzeniem cukrzycowym neuropatycznym.

Może to sugerować, że bakterie towarzyszące neuropatycznemu owrzodzeniu potrzebują większej liczby czynników wirulencji, aby zasiedlać i funkcjonować w środowisku takiej rany. Niedokrwienie, któremu towarzyszy niedotlenienie, stwarza dogodne środowisko życia bakteriom o mniejszej wirulentności. Dane te świadczą, że środowisko owrzodzenia decyduje o preferencyjnej kolonizacji i późniejszej inwazji bakterii.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień dotyczących różnic częstości występowania genów wirulencji *eta*, *fnbA*, *cna*, *edin* i *etd* u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną lub niedokrwienną.

Sotto i wsp. [129] badali obecność 5 genów wirulencji (*sea*, *sei*, *lukDE*, *hlgv* i *cap8*) uznanych za różnicujące chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej zarówno w obecności zakażenia, jak również bez zakażenia. *Sea* i *sei* to geny związane z produkcją enterotoksyn, *lukDE* – z wytwarzaniem leukocydyn, *hlgv* – z produkcją hemolizyn, *cap8* – z wytwarzaniem otoczek. Wyniki badaczy wykazały, że jedynie 2 badane geny (*lukDE* i *hlgv*) mogą służyć jako markery rozróżniające oba rodzaje owrzodzeń.

7.1.2. Obecność genów wirulencji *S.epidermidis* u chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej

Bakterie *S. epidermidis* charakteryzują się zdolnością do kolonizowania powierzchni, również implantacyjnych materiałów. *S.epidermidis*, jako patogen oportunistyczny produkujący biofilm, może przyczyniać się do rozwoju zakażeń, zwłaszcza u chorych z zastawkami serca, implantami ortopedycznymi i protezami naczyniowymi. Zdolność do tworzenia biofilmu i oporność na antybiotyki przyczyniają się do występowania opóźnionego gojenia owrzodzeń. Ponadto warstwa biofilmu chroni bakterie przed odpowiedzią układu immunologicznego.

Pierwotne przyleganie bakterii, które zapoczątkowuje tworzenie biofilmu, możliwe jest dzięki obecności głównej autolizyny powierzchniowej *atlE*. Operon *icaADBC* koduje międzykomórkową adhezynę polisacharydową PIA związaną z formowaniem biofilmu.

W prezentowanych w dysertacji badaniach wykazano, że częstość występowania genów *atlE* i *icaAB* była bardzo wysoka i porównywalna wśród chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną, a także pomiędzy szczepami opornymi i wrażliwymi na metycylinę. Nie zaobserwowano różnic w powszechności występowania powyższych genów w izolatach pochodzących z różnych miejsc pobrania materiału.

Dane te odpowiadają wynikom uzyskanym przez Frebourga i wsp. [43]. Powszechne występowanie genu *atlE* może wynikać z faktu, że kodowane przez niego białka, poza uczestnictwem w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S.epidermidis*, pełnią również istotne funkcje w wielu procesach fizjologicznych bakterii.

Szczepy nie posiadające operonu *icaADBC* są traktowane jako populacja awirulentnych *S.epidermidis*. Jednakże dwa niezależne badania wykazały brak różnic w wirulencji szczepów posiadających i pozbawionych operonu *icaADBC*. Rohde i wsp. [118]

udowodnili, że szczepy *S.epidermidis* mogą wywoływać trwałe, powiązane z biofilmem zakażenia, np. zakażenia protez stawowych, także przy braku obecności operonu *icaADBC*.

Ostatnie dane sugerują, że operon *icaADBC* może stanowić marker wirulencji gronkowcowych szczepów klinicznych pochodzących z zakażeń biomateriałów. Arciola i wsp. [8] wskazali, że operon ten przeważa u szczepów *S.epidermidis* otrzymanych z zakażeń cewników, w porównaniu do izolatów ze skóry lub błon śluzowych osób zdrowych i personelu szpitala. Frebourg i wsp. [43] wykazali obecność operonu *icaADBC* u 37,5% szczepów pochodzących od zdrowych ochotników.

Według części badaczy operon *icaADBC* jest szeroko rozpowszechniony w szczepach klinicznych *S.aureus* i znacznie częściej występuje w szczepach inwazyjnych w porównaniu ze szczepami kolonizującymi skórę [113]. Inne spostrzeżenia mają Rohde i wsp. [118], którzy wskazują na znaczną przewagę obecności operonu *icaADBC* w komensalnych szczepach *S.epidermidis* w porównaniu do szczepów inwazyjnych. W różnych badaniach operon *icaADBC* obecny był w 43–88% szczepów od zdrowych ochotników [60].

Ekspresja operonu *icaADBC* i formowanie biofilmu różnią się między klinicznymi szczepami gronkowcowymi. Ziebuhr i wsp. [151] zbadali, że 87% szczepów klinicznych może produkować biofilm, podczas gdy tylko 11% szczepów ze skóry posiada tę zdolność. Fitzpatrick i wsp. [37] sugerują natomiast, że obecność operonu *icaADBC* nie jest wystarczająca dla formowania biofilmu.

Ocena zdolności *S.epidermidis* do tworzenia biofilmu jako markera patogenności bakterii jest kontrowersyjna, ponieważ właściwość ta jest zależna od czynników środowiskowych. Zmienione warunki wzrostu w środowisku mogą także odgrywać rolę w patogenezie zakażeń związanych z biomateriałami [30, 52].

Adhezyna PIA, syntetyzowana przez białka kodowane przy udziale operonu *icaADBC*, jest niezbędna w procesie tworzenia biofilmu, który odgrywa kluczową rolę w kolonizacji ciał obcych przez bakterie *S.epidermidis* oraz powstawaniu zakażeń [30, 52]. Eftekhar i wsp. [33] wykazali, że warunki wzrostu odgrywają dużą rolę w formowaniu biofilmu poprzez mechanizmy inne niż ekspresja polisacharydowej adhezyny międzykomórkowej PIA [33]. Produkcja PIA i tworzenie biofilmu *in vitro* są rzadziej spotykane i obserwowane jedynie w ściśle określonych warunkach, m.in. przy niskim poziomie tlenu u szczepów *S.aureus* w porównaniu do szczepów *S.epidermidis* [39].

Arciola i wsp. [8] wskazują, że ok. 60% szczepów *S.aureus* z zakażeń ortopedycznych posiada geny *icaA* i *icaD*. W badaniach przeprowadzonych przez Zmantar i wsp. [153] spośród szczepów, u których potwierdzono obecność powyższych genów, 26 szczepów produkowało śluz, a 10 nie posiadało tej cechy.

Analiza klinicznych szczepów *S.aureus* izolowanych z zakażonych protez i cewników oraz od chorych z bakteriami pokazuje obecność operonu *icaADBC* w większości izolatów [35]. Arciola i wsp. [8] potwierdzili istnienie biofilmu u ok. 50% klinicznych szczepów *S.epidermidis*. Jednocześnie udowodnili, że wszystkie saprofityczne szczepy *S.epidermidis* pochodzące ze skóry i błon śluzowych nie produkują biofilmu i nie posiadają genu *icaADBC* [121]. W innych badaniach Ziebuhr i Arciola zaobserwowali jednakże obecność genu *icaADBC* u odpowiednio 6% i 11,5% saprofitycznych szczepów *S.epidermidis* izolowanych od personelu medycznego. Satorres i wsp. [121] dostrzegli obecność operonu *icaADBC* u większości szczepów gronkowcowych izolowanych od chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi. Według Cafiso i wsp. [22] istnieje ścisły związek pomiędzy obecnością operonu *icaADBC* i genu *mecA*. Ekspresja obydwu grup genów wzmacnia zdolność bakterii do przetrwania w organizmie gospodarza, mogąc stanowić ważne markery wirulencji w klinicznie istotnych izolatach gronkowcowych [61].

Nie wszystkie szczepy *S.epidermidis* kodują operon *icaADBC*. Operon posiadają głównie szczepy pochodzące od osób objętych opieką zdrowotną w szpitalach i chorych z zakażeniami implantów medycznych. Izolaty pobrane ze skóry zdrowych ochotników znacznie rzadziej charakteryzują się obecnością operonu *icaADBC* [115]. Pacjenci szpitalni częściej są nosicielami opornych, *icaADBC*-pozytywnych szczepów *S.epidermidis*, w porównaniu z osobami nie mającymi kontaktu ze szpitalem. Hospitalizacja indukuje zmiany w strukturze populacji kolonizujących bakterii *S.epidermidis*, co skutkuje ekspansją szczepów lepiej adaptujących się do środowiska szpitalnego [131].

Operon *icaAB* obecny był we wszystkich zbadanych w niniejszej pracy szczepach *S.epidermidis* pochodzących od chorych na cukrzycę i zdrowych ochotników. Podobne spostrzeżenia odnotowali także badacze, potwierdzając powszechne występowanie operonu w szczepach chorobotwórczych oraz szczepach komensalnych [61].

Obecność operonu *icaADBC* budzi pewne wątpliwości w aspekcie potencjalnego markera patogenności bakterii. Wynika to z regulacji operonu *icaADBC* przez inne geny, których funkcje zależą od warunków środowiskowych. W toku przeprowadzonych badań zauważono, że geny *atlE* i *icaAB* występowały zarówno w szczepach MRSE, jak również MSSE. Spostrzeżenia te potwierdzają również wyniki innych autorów [55]. Wymienione geny wirulencji prawdopodobnie nie mogą służyć rozróżnieniu szczepów *S.epidermidis* inwazyjnych i kolonizujących.

Sekwencja insercyjna *IS256* wpływa na ekspresję operonu *icaADBC* oraz tworzenie biofilmu. Ponadto sekwencja *IS256* ułatwia bakteriom adaptowanie się do warunków środowiska.

Sekwencja *IS256* stanowi charakterystyczny element w genomie wieloopornych szpitalnych szczepów *S.epidermidis* [77]. W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano wyższą częstość występowania sekwencji insercyjnej *IS256* u szczepów MRSE w porównaniu ze szczepami MSSE, zarówno u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną, jak również u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną. Ponadto częstość występowania sekwencji była znacząco wyższa u szczepów pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia, w porównaniu z wymazami z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC. Szczepy pochodzące od zdrowych ochotników nie posiadały sekwencji *IS256*.

Otrzymane wyniki są zgodne z otrzymanymi przez innych badaczy [91,59] i sugerują, że sekwencja insercyjna *IS256* może być brana pod uwagę jako molekularny marker inwazyjności szczepu.

Gu i wsp. [52] proponują stosowanie sekwencji insercyjnej *IS256* jako markera patogenności różnicującego szczepy *S.epidermidis* komensalne i inwazyjne. Również badania przeprowadzone przez Kozitskaya i wsp. [77] pokazują, że dystrybucja *IS256* różni się pomiędzy szczepami inwazyjnymi i komensalnymi.

Szczególną uwagę należy zwrócić na pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej, u których występuje koinfekcja grzybicza. Zdolność do tworzenia biofilmu przez różne gatunki grzybów została potwierdzona w wielu pracach. Pammi M. i wsp. [102] zaobserwowali podwyższoną autolizę *Staphylococcus epidermidis* w układzie quorum sensing z *Candida albicans*. Pozakomórkowe DNA uwalniane przez bakterie stymulowało wytwarzanie biofilmu przez grzyby.

7.1.3. Oporność na antybiotyki bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis*

W toku przeprowadzonych w niniejszej pracy badań oporność na metycylinę określono dwiema metodami: testem ATB STAPH 5 oraz techniką PCR sprawdzającą obecność genu oporności *mecA*. Przy zastosowaniu testu ATB-STAPH 5 zauważono przewagę występowania oporności na metycylinę wśród szczepów *S.aureus* izolowanych z wymazów z powierzchni międzypalcowej w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z wyskrobin z dna owrzodzenia i z biopsji z brzegu owrzodzenia.

Szczepy pochodzące z powierzchni międzypalcowych mają największy kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i szczepami metycylinoopornymi, od których mogą nabywać geny oporności na drodze horyzontalnego transferu genów. Przeważająca liczba szczepów metycylinoopornych w tym miejscu może także wynikać z zastąpienia szczepów własnych pacjenta przez odporne szczepy szpitalne lub środowiskowe.

Szczepy MRSA pochodzące z wyskrobin z dna owrzodzenia chorych z cukrzycą cechują się współwystępowaniem genów wirulencji *fnbA*, *cna*, *eta*, *edin* i *etd*. Zaobserwowano 100% częstość występowania genów *fnbA*, *cna*, *eta* u metycylinoopornych szczepów pochodzących z wyskrobin od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej neuropatycznej leczonych szpitalnie i ambulatoryjnie oraz od chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych szpitalnie. Obecność wirulentnych szczepów bakteryjnych w głębi owrzodzenia może świadczyć o słabej penetracji antybiotyku do wnętrza rany, wynikającej z obecności niedokrwienia i neuropatii.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że metycylinooporne szczepy *S.epidermidis* dominują wśród izolatów pobranych ze wszystkich trzech miejsc od chorych: wyskrobin z dna owrzodzenia, biopsji z brzegu owrzodzenia i wymazów z powierzchni międzypalcowej.

W pracy Jones'a i wsp. [100] przedstawiono raport dotyczący oporności na antybiotyki różnych gatunków bakterii izolowanych w 21 krajach europejskich. Występowanie szczepów MRSA wahało się od 0,9% w Szwecji do 60% w Portugalii i na Słowacji. W Polsce zanotowano ok. 25%, średnia dla Europy wynosiła 31%, podczas gdy średnia dla MRSE to 1,1%.

Przez wiele lat bakterie *S.epidermidis* i inne koagulazujemne gronkowce nie były traktowane jak szczepy potencjalnie patogenne. Uważano je za mikroorganizmy komensalne, kolonizujące organizm człowieka. Obecnie coraz częściej spotyka się szczepy MRSE, co może wynikać z szerokiego rozpowszechnienia się szczepów *S.epidermidis* zarówno w środowisku szpitalnym, jak i poza nim. Szczepy *S.epidermidis* często nie przyczyniają się do wystąpienia objawów chorobowych, jednak stanowią rezerwuariusz genów oporności antybiotykowej, które mogą być przekazywane do szczepów MSSA i innych Gram-dodatnich bakterii poprzez horyzontalny transfer genów. W ten sposób mogą ułatwiać rozprzestrzenianie oporności antybiotykowej [122].

Znaczna liczba bakterii MRSA i MRSE wykazuje wielooporność na antybiotyki w zakażeniu. W ostatnich latach obserwuje się istotny wzrost zakażeń powodowanych przez odporne na metycylinę szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis*. W USA w owrzodzeniach przebiegających bez zapalenia kości poza szczepami MRSA, obserwuje się także szczepy MRSE. W niektórych częściach Europy szczepy MRSE stanowią aż 60-70% wszystkich szczepów *S.epidermidis* [495].

Wyjaśnienie różnic w inwazyjności i wirulencji pomiędzy szczepami MRSA/MSSA i MRSE/MSSE to zagadnienie wymagające dalszych badań. Nie istnieją dowody wskazujące, że szczepy MRSA są bardziej wirulentne niż MSSA. Fakty dotyczące długości

hospitalizacji chorych, wskaźnika śmiertelności i poniesionych kosztów leczenia sugerują jednak większy udział szczepów MRSA.

Transfer gronkowcowej kasety chromosomowej, która koduje gen *mecA*, pomiędzy szczepami *S.epidermidis* i *S.aureus* został już potwierdzony [139]. Bakterie, które nabyły oporność na metycylinę mogą przyczyniać się do poważnych problemów skórnych i zakażeń. Dlatego niezwykle istotne jest zapobieganie rozprzestrzenianiu się szczepów opornych na metycylinę w środowisku np. poprzez chirurgiczne oczyszczanie zakażonych owrzodzeń.

Niewyjaśnioną kwestią pozostaje, w jaki sposób chorzy z ZSC pozyskują szczepy MRSA i MRSE. Być może jest to związane z faktem, iż charakteryzują się oni wyższym wskaźnikiem kolonizacji skóry i błony śluzowej nosa bakteriami *S.aureus*, które na drodze transferu genów mogą przekształcić się w szczepy metycylinooporne. Ze względu na możliwość rozprzestrzeniania się szczepów MRSE w środowisku chorych wskazana może okazać się eradykacja miejscowego nosicielstwa gronkowców MRSE.

Nashev i wsp. [95] wykazali, że szczepy *S.aureus* stanowiące florę błony śluzowej nosa, odgrywają rolę w patogenezie nawracających zakażeń skóry. Szczepy te posiadają czynniki wirulencji m.in. adhezyny wiążące fibronektynę i kolagen, które przyczyniają się do zwiększonego ryzyka późniejszych zakażeń.

Szczepy *S.epidermidis* zwykle stanowią florę bakteryjną, która kolonizuje gospodarza. Bakterie znajdują się nie tylko na powierzchniach międzypalcowych, ale także na brzegu owrzodzenia i w wyskrobinach. Po nabyciu oporności przez szczepy MSSE lub ich zastąpieniu przez szczepy MRSE ze środowiska, szczepy oporne na metycylinę zastąpią naturalną florę bakteryjną i będą prawdopodobnie kolonizować zarówno owrzodzenie, jak i skórę. Podobne wyniki uzyskano u chorych z owrzodzeniem cukrzycowym neuropatycznym i niedokrwinnym. Nie zaobserwowano obecności szczepów MRSA i MRSE u zdrowych ochotników.

Część szczepów mogła wykazywać oporność na metycylinę, która nie wynika z obecności genu *mecA*, ale innych mechanizmów, np. produkcji penicylinazy kodowanej przez geny plazmidowe (oporność nabyta) lub mutacji w genach kodujących białko PBP2, co skutkuje zmniejszonym powinowactwem do β -laktamów.

Podobne różnice zaobserwowali także inni badacze. Araj i wsp. [6] potwierdzili obecność genu *mecA* jedynie w 13 szczepach *S.aureus* spośród 31, które wykazywały oporność na antybiotyki.

Profil antybiotykooporności szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzących od chorych hospitalizowanych i ambulatoryjnych był bardzo podobny.

Przeprowadzone badania pokazały, że oporności na metycylinę w grupie chorych na cukrzycę często towarzyszy oporność na inne antybiotyki: gentamycynę, erytromycynę, klindamycynę, tetracyklinę.

Zbadana w izolatach MRSA/MRSE wrażliwość drobnoustrojów na antybiotyki jest podstawą właściwej terapii. Zarówno szczepy MRSA, jak również MRSE izolowane od chorych z ZSC wykazały oporność wielolekową (odpowiednio 70,3% i 88,8% badanych szczepów). Oporność na trzy grupy antybiotyków (spośród sześciu badanych) była ponad trzy razy wyższa u szczepów MRSE niż u szczepów MRSA, zaś wszystkie szczepy odporne na metycylinę cechowały się podobną opornością na sześć grup antybiotyków.

W toku niniejszej pracy nie uwzględniono rodzaju i czasu trwania antybiotykoterapii stosowanej u chorych w czasie wcześniejszego, często wieloletniego leczenia w różnych placówkach medycznych, co wynika z braku dostępu do tego rodzaju danych, a często z braku możliwości uzyskania od chorych pełnej informacji o stosowanej wcześniej antybiotykoterapii.

Brak wrażliwości na antybiotyki szczepów *S.aureus* od bardzo dawna jest zjawiskiem powszechnym. Szczepy te bardzo szybko nabywają cechy oporności, zwłaszcza w środowisku szpitalnym. Także leczenie antybiotykowe przed hospitalizacją przyczynia się do zmiany flory bakteryjnej chorych na szczepy mniej wrażliwe na terapię antybiotykową.

7.2. Ekspresja wybranych czynników wirulencji

Zdolność do regulacji ekspresji genów umożliwia bakteriom odpowiadanie na zmiany zachodzące w otaczającym środowisku. Bakterie syntetyzują jedynie te produkty białkowe, które w danej chwili są niezbędne do ich funkcjonowania. Ekspresja genów może być kontrolowana poprzez zmiany w transkrypcji, lokalizacji i trwałości RNA. W literaturze brak jest doniesień na temat ekspresji badanych w obecnej pracy genów wirulencji. W obecnej pracy nie zauważono znaczących różnic w częstości ekspresjonowania genów wirulencji w zależności od miejsca pobrania materiału. Najczęściej obserwowano ekspresję genu *fnbA* w wyskrobinach z dna owrzodzenia u szczepów (57,9%). Ekspresja bliska 40% wystąpiła również w biopsjach z brzegu owrzodzenia dla genu *fnbA* i we wszystkich trzech miejscach pobrania materiału dla genu *cna*.

Ekspresja genu *fnbA* przeważała (47,4%) u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną w porównaniu do chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną. Ekspresja

genu *cna* kształtuje się na podobnym poziomie w obydwu badanych grupach chorych (ok. 40%). Ekspresja genu *eta* jest bardzo niska w każdej z badanych grup chorych i w każdym miejscu pobrania materiału do badań.

7.3. Podobieństwo genetyczne izolatów

Badanie podobieństwa genetycznego pokazuje, że izolaty są blisko spokrewnione u poszczególnych chorych w obrębie różnych miejsc pobrania materiału. Dotyczy to zarówno chorych leczonych szpitalnie, jak i ambulatoryjnie.

Podobieństwo wykazują szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzące od wszystkich chorych leczonych ambulatoryjnie. Natomiast szczepy izolowane od chorych leczonych szpitalnie nie wykazują podobieństwa większego niż 80%. Nie obserwuje się w tym przypadku przemieszczania szczepów pomiędzy chorymi, co może wynikać ze ścisłego przestrzegania reżimu sanitarnego w placówkach szpitalnych, m.in. stosowania jałowego sprzętu medycznego, narzędzi i materiałów opatrunkowych.

Badanie podobieństwa genetycznego szczepów *S.aureus* pochodzących od poszczególnych chorych (2 lub 3 szczepy z różnych miejsc pobrania od jednego chorego) wskazuje, że 74% szczepów jest blisko spokrewnionych, wykazując ponad 80% podobieństwo (szczepy blisko spokrewnione). Porównanie wszystkich szczepów wyizolowanych od chorych pokazuje, że blisko spokrewnionych jest 68,5% szczepów.

Badanie podobieństwa genetycznego przeprowadzone wśród izolatów *S.epidermidis* potwierdza, że szczepy pochodzące z różnych miejsc pobrania od poszczególnych chorych w większości (93%) charakteryzowały się podobieństwem genetycznym przekraczającym 80%.

Porównanie w obrębie wszystkich izolatów pokazuje, że szczepy nie przemieszczały się pomiędzy chorymi (jedynie 30% szczepów spokrewnionych).

7.4. Przydatność badań wirulencji bakterii u chorych z zespołem stopy cukrzycowej w postępowaniu terapeutycznym

Każde owrzodzenie w zespole stopy cukrzycowej wymaga oczyszczenia i usunięcia tkanek martwiczych. Wczesna interwencja chirurga naczyniowego niezbędna jest u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwioną, u których dotarcie antybiotyków do miejsca zakażenia jest znacznie ograniczone.

Stosowanie antybiotykoterapii w Polsce zależy zazwyczaj od konkretnego ambulatorium. Algorytm postępowania w przypadku zakażonej stopy cukrzycowej umieszczony został w Załącznikach (Załącznik 15). W przypadku poprawy stanu owrzodzenia zalecana jest ponowna ocena schematu leczenia antybakteryjnego, aby wybrać antybiotyk o węższym spektrum działania, tańszy i z wygodniejszą formą podania [74].

Zaleceniem Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego jest stosowanie u chorych z zespołem stopy cukrzycowej antybiotykoterapii empirycznej w początkowym etapie leczenia. W razie nieskuteczności leczenia empirycznego stosuje się antybiotykoterapię zgodną z wynikami antybiotykowrażliwości szczepów wyizolowanych z owrzodzeń. Łagodne zakażenia predystynują do stosowania antybiotyków o wąskim spektrum działania, w przypadku ciężkich zakażeń stosuje się antybiotyki o szerokim spektrum działania. W leczeniu owrzodzeń bez klinicznych cech zapalenia nie zawsze stosuje się antybiotykoterapię [27].

Algorytm postępowania terapeutycznego w przypadku zakażonej rany stopy cukrzycowej nie przewiduje zatem rozważenia oceny bakteriologicznej owrzodzenia.

Na podstawie badań opisanych w niniejszej pracy można wnioskować, że stosowanie empirycznej antybiotykoterapii może być nieskuteczne i prowadzić do selekcji szczepów opornych z uwagi na konstytutywną ekspresję genów wirulencji.

Wydaje się, iż przeprowadzenie badania mikrobiologicznego wraz z oceną gatunku i stopnia wirulencji bakterii obecnych w ranie umożliwi zastosowanie antybiotykoterapii celowanej o odpowiednio szerokim spektrum działania już na wstępnym etapie leczenia chorych z ZSC. Pozwoli to na uniknięcie długotrwałego stosowania nieskutecznej antybiotykoterapii empirycznej.

Przedstawione w dysertacji badania dotyczą nielicznej grupy 50 chorych. Wskazane jest potwierdzenie otrzymanych wyników na większej, bardziej reprezentatywnej grupie chorych. Przeprowadzenie takich badań umożliwi potwierdzenie słuszności tezy, wskazującej na konieczność indywidualnego postępowania terapeutycznego u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną, dostosowanego do rodzaju i rozległości zakażenia. Badania bakteriologiczne uwzględniające wirulencję bakterii powinny być brane pod uwagę. Jednoczesna obecność w owrzodzeniu wirulentnych bakterii, a także czynnika predysponującego do opóźnionego gojenia owrzodzeń (np. niedokrwienia) może sugerować konieczność bardziej intensywnego, celowanego leczenia. Pozwoli to na zmniejszenie odsetka amputacji u chorych z ZSC.

8. Wnioski końcowe

1. Obecność genu *cna* odróżnia chorych z zespołem stopy cukrzycowej od zdrowych ochotników, jest ważnym wskaźnikiem wirulencji bakterii i czynnikiem prognostycznym powikłań owrzodzeń niezależnie od typu ZSC.
2. Badanie obecności genów kodujących czynniki wirulencji: *eta*, *fnbA* i *edin* może być użyteczne dla rozróżnienia pomiędzy szczepami *S.aureus* inwazyjnymi i kolonizującymi.
3. Sekwencja insercyjna *IS256* może być użytecznym markerem inwazyjności szczepów *S.epidermidis*.
4. Wyniki badania podobieństwa genetycznego oparte na metodzie PFGE wskazują, że owrzodzenie i powierzchnie międzypalcowe poszczególnych chorych z cukrzycą są zasiedlane przez szczepy bakterii o takiej samej klonalności.
5. Porównanie wszystkich izolatów w obrębie *S.aureus* i *S.epidermidis* wykazuje wysoki polimorfizm genowy. Geny kodujące wybrane czynniki wirulencji mogą służyć jako markery inwazyjności szczepów. Zróżnicowanie genetyczne może zależeć od warunków środowiskowych i presji selekcyjnej.
6. Chorzy leczeni szpitalnie mieli na skórze własne klony *S.aureus* i *S.epidermidis*. Nie dochodziło do przemieszczania się szczepów między chorymi i zastępowania flory bakteryjnej chorego przez patogenne szczepy szpitalne.
7. Szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* wyizolowane od chorych leczonych ambulatoryjnie wykazywały bliskie spokrewnienie w odniesieniu do wszystkich chorych, jak również różnych miejsc pobrania materiału u poszczególnych chorych, co sugeruje, że może dochodzić do przemieszczania się szczepów między tymi chorymi.

9. Streszczenie

Cukrzyca jest skutkiem zaburzeń w wydzielaniu insuliny przez trzustkę, niewłaściwego działania insuliny lub obydwu tych czynników jednocześnie. Gdy ilość produkowanej insuliny jest zbyt niska, glukoza nie może być transportowana do tkanek i krąży w zwiększonej ilości we krwi, przyczyniając się do wystąpienia powikłań makroangiopatycznych: choroby wieńcowej, chorób naczyń mózgowych i kończyn dolnych, a także powikłań mikroangiopatycznych: nefropatii, retinopatii i neuropatii z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC).

ZSC, jedno z poważniejszych powikłań cukrzycy, obejmuje zakażenie, owrzodzenie i/lub destrukcję tkanek głębokich stopy w powiązaniu z zaburzeniami neurologicznymi oraz chorobami naczyń obwodowych o różnym stopniu nasilenia. Wyróżniamy stopę cukrzycową neuropatyczną, niedokrwienną oraz mieszaną.

Chorzy z cukrzycą charakteryzują się zwiększonym ryzykiem rozwoju zakażenia stopy cukrzycowej, w porównaniu do osób bez cukrzycy. U ok. 14-24% chorych z cukrzycą dokonuje się amputacji kończyny. Właściwa diagnoza, edukacja chorych i organizacja opieki nad chorymi mogą zmniejszyć ryzyko amputacji o 85%.

Owrzodzenia cukrzycowe są często zasiedlane przez bakterie, zwłaszcza Gram-dodatnie tj. *S.aureus*, *S.epidermidis* i paciorkowce. Patogenne bakterie w stopie cukrzycowej przyczyniają się do opóźnienia procesów gojenia owrzodzenia. Patogenność bakterii uzależniona jest od wrażliwości gospodarza oraz zdolności bakterii do produkcji czynników wirulencji włączonych w kolonizację i inwazję tkanek gospodarza. Czynniki te są: adhezyny, inwazy, zewnątrzkomórkowe enzymy i toksyny, elementy biofilmu.

Za większość hospitalizacji i amputacji związanych ze stopą cukrzycową odpowiadają zakażenia. Leczenie owrzodzeń obejmuje postępowanie chirurgiczne i antybiotykoterapię.

Celem pracy była ocena stopnia wirulencji bakterii *S.aureus* i *S.epidermidis* u chorych z zespołem stopy cukrzycowej oraz badanie podobieństwa genetycznego bakterii w celu określenia ryzyka przenoszenia się zakażenia pomiędzy chorymi.

Materiał do badań stanowiły izolaty bakteryjne od pacjentów ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną oraz pochodzące od zdrowych wolontariuszy bez cukrzycy. Izolaty pobierane były z trzech miejsc od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej: z wyskrobin z dna owrzodzenia, z biopsji skóry z brzegu owrzodzenia oraz z wymazów z powierzchni skóry okolicy międzypalcowej. Od zdrowych ochotników pobrano jedynie materiał pochodzący ze skóry z okolicy międzypalcowej.

Wykazano znamienne statystycznie różnice w częstości występowania genów wirulencji po podziale badanych szczepów bakteryjnych na pochodzące od chorych z owrzodzeniem neuropatycznym oraz niedokrwiennym oraz na szczepy metycylinowrażliwe i metycylinooporne.

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano znaczącą przewagę obecności genów wirulencji *eta*, *fnbA* i *edin* wśród szczepów *S.aureus* pochodzących z owrzodzenia (wyskrobin i biopsji) w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC.

U chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną obecność genów *eta* i *fnbA* była częściej związana ze szczepami MRSA niż MSSA, natomiast u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną odwrotnie.

Gen *edin* nieco częściej występował u szczepów MSSA niż MRSA u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną. Częstość występowania pozostałych genów była porównywalna u szczepów *S.aureus* pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną.

Szczepy MRSE przeważały we wszystkich źródłach pobrania poza wyskrobinami z dna owrzodzenia u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną.

Nie zaobserwowano szczepów MRSA i MRSE u zdrowych ochotników.

Częstość występowania genów *atlE* i *icaAB* była bardzo wysoka i porównywalna pomiędzy szczepami MRSE i MSSE pochodzącymi od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną, jak również pomiędzy wszystkimi szczepami MRSE i MSSE.

S.epidermidis przeważał w izolatach pochodzących z wymazów z powierzchni międzypalcowej pacjentów z ZSC w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami.

Sekwencja insercyjna *IS256* przeważała u szczepów MRSE pochodzących z wyskrobin z dna owrzodzenia i biopsji z brzegu owrzodzenia, w porównaniu z wymazami z powierzchni międzypalcowej chorych z ZSC. Nie zaobserwowano obecności sekwencji insercyjnej *IS256* u zdrowych ochotników.

Porównanie w obrębie szczepów *S.aureus* i *S.epidermidis* pochodzących od poszczególnych chorych leczonych ambulatoryjnie wykazało, że szczepy są spokrewnione. Mogło więc dochodzić do przemieszczania się szczepów pomiędzy chorymi w warunkach ambulatoryjnych.

Szczepy *S.aureus* i *S.epidermidis* wyizolowane od poszczególnych chorych leczonych szpitalnie nie były blisko spokrewnione. Nie dochodziło do przemieszczania się szczepów między chorymi.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że geny *fnbA*, *eta* i *edin* mogą być powiązane z inwazyjnością szczepów *S.aureus*. Sekwencja insercyjna *IS256* może być użytecznym markerem inwazyjności szczepów *S.epidermidis*.

W praktyce, w postępowaniu leczniczym nie uwzględnia się modyfikacji sposobu leczenia pacjenta z owrzodzeniem cukrzycowym w korelacji ze stopniem wirulencji obecnych w owrzodzeniu bakterii. Postuluje się wprowadzenie do algorytmu postępowania w zakażonej stopie cukrzycowej badania obecności genów wirulencji może umożliwić zastosowanie bardziej kompleksowego i ukierunkowanego sposobu leczenia. Leczenie to powinno stanowić połączenie odpowiednio wcześnie zastosowanej celowanej terapii antybiotykowej z leczeniem chirurgicznym oraz leczeniem dodatkowym (np. terapią hiperbaryczną).

9.1. Summary

Diabetes is the result of abnormalities in the secretion of insulin by the pancreas, improper insulin action or the simultaneous coexistence of both of these factors. When the amount of produced insulin is too low, glucose can not be transported to the tissues and circulates in increased amounts in the blood causing complications, including coronary heart disease, cerebrovascular disease, lower limb and microvascular complications: nephropathy, retinopathy, neuropathy with diabetic foot (DF).

The most common complication of diabetes is diabetic foot ulcer (DFU). Diabetic foot is an infection, ulceration and /or destruction of deep tissue of the lower limbs (below the ankle) with neurological disorders and peripheral vascular disease of varying severity. There are three forms of DF: neuropathic foot, ischemic foot and mixed form in which there are both features of neuropathic and ischemic foot.

Patients with diabetes have a greater risk of developing foot ulcers and infected ulcers than people without diabetes. About 14-24% of patients with diabetic foot ulcers require amputation. Proper diagnosis, patient education and organization of patient care can reduce the risk of amputation by as much as 85%.

Diabetic ulcers are often colonized by Gram-positive bacteria such as *S.aureus*, *S.epidermidis* and *Streptococcus*. Pathogenicity is the ability of microorganisms to cause disease in the host associated with the occurrence of clinically visible symptoms. Microbes express their pathogenicity for virulence. Pathogenicity of bacteria is dependent on the susceptibility of bacteria to produce the virulence factors involved in colonization and invasion of host tissues. These factors are: adhesins, invasins, extracellular enzymes, toxins and biofilm elements.

The majority of hospitalizations and amputations is associated with diabetic foot infections. Ulcer treatment involves surgical procedure and the use of antibiotics.

The aim of this study was to investigate the incidence of staphylococcal virulence genes in patients with diabetic foot ulceration and in the strains present in the skin of healthy individuals.

Differences in the results achieved were also observed when strains were divided from diabetic patients into neuropathic and ischemic strains and methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains.

The research revealed a significant prevalence of *eta*, *fnbA* and *edin* genes among *S.aureus* strains isolated from the ulcer base and skin biopsy when compared to the toe web of diabetic patients.

The frequency of *eta* and *fnbA* genes was significantly more often associated with MRSA than MSSA isolates from SCNeur. patients and with MSSA vs. MRSA strains from SCNied. patients.

All isolates yielded from toe web swabs of healthy volunteers were MSSA and MSSE (*mecA*-).

S.epidermidis strains were predominant in isolates yielded from toe web swabs of diabetic patients when compared to healthy volunteers.

The frequency of *atlE* and *icaAB* genes was very high and comparable between MRSE and MSSE strains yielded both from SCNeur. and SCNied. patients as well as between all MRSE and MSSE. The *edin* gene was significantly more frequent among MSSA than MRSA strains yielded from SCNeur. patients. The frequency of other genes was comparable between MRSA and MSSA strains from both SCNeur. and SCNied. patients.

In case of *S.epidermidis* isolates the frequency of *IS256* insertion element was significantly higher among MRSE vs. MSSE strains yielded from both SCNeur. and SCNied. patients, as well as among all studied *S.epidermidis* strains.

The frequency of the *IS256* insertion element was significantly higher among isolates yielded from ulcer curettage and skin biopsy than in toe web swabs of DFU patients. *S.epidermidis* isolates from healthy controls were *IS256* negative.

The ulcer base and toe web of DFU hospital patients are colonized by bacteria of the same or very similar clonality. In most hospital patients, they have their own clone of *S.aureus* and *S.epidermidis* on the skin surface. The number of transmissions of *S.aureus* and *S.epidermidis* strains between patients was low.

The results confirmed that *IS256* might be used as a molecular marker of invasiveness of *S.epidermidis* strains. Detection of *eta*, *fnbA* and *edin* genes can be useful to discriminate between diabetic foot ulcer invasive and skin colonizing *S.aureus* strains.

In practice, the treatment is not generally correlated with virulence of the bacteria. Meanwhile, investigation of virulence gene presence that contributes to the development of chronic infections, allows the use of a more comprehensive method of treatment, which is a combination antibiotic therapy with surgery (by-passes and endovascular procedures) and additional treatment (such as hyperbaric therapy to improve the flow of oxygen through the covered macrovascular disease dishes).

10. Spis rycin, tabel i załączników

10.1.Ryciny

Rycina 1. Wnikanie komórek bakteryjnych <i>S.aureus</i> do wnętrza komórek gospodarza.....	26
Rycina 2. Schemat budowy białka wiążącego kolagen.....	27
Rycina 3. Oporność wielolekowa szczepów MRSA i MRSE izolowanych od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej.....	58
Rycina 4. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSA w porównaniu ze szczepami MSSA pochodzącymi od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną.....	60
Rycina 5. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów MRSE i MSSE pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną.....	61
Rycina 6. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> izolowanych z różnych miejsc pobrania od chorych z zespołem stopy cukrzycowej i zdrowych ochotników.....	62
Rycina 7. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> izolowanych od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną w porównaniu z chorymi ze stopą cukrzycową niedokrwienną i zdrowymi ochotnikami.....	64
Rycina 8. Obecność genów wirulencji u szczepów <i>S.epidermidis</i> izolowanych z różnych miejsc pobrania od chorych z zespołem stopy cukrzycowej i zdrowych ochotników.....	65
Rycina 9. Częstość współwystępowania genów wirulencji pomiędzy szczepami <i>S.aureus</i>	66
Rycina 10. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> u zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	67
Rycina 11. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	67
Rycina 12. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	68
Rycina 13. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	68
Rycina 14. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.aureus</i> u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	69
Rycina 15. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.epidermidis</i> u zdrowych ochotników w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	69
Rycina 16. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.epidermidis</i> u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	70

Rycina 17. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.epidermidis</i> u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych ambulatoryjnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	70
Rycina 18. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.epidermidis</i> u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	71
Rycina 19. Częstość występowania genów wirulencji szczepów <i>S.epidermidis</i> u chorych ze stopą cukrzycową niedokrwienną leczonych szpitalnie w zależności od miejsca pobrania materiału (%).....	71
Rycina 20. Podobieństwo genetyczne szczepów zbadane przy zastosowaniu techniki PFGE.....	77
Rycina 21. Dendrogram pokazujący podobieństwo między szczepami <i>S.aureus</i> w badanej populacji chorych.....	78
Rycina 22. Dendrogram pokazujący podobieństwo między szczepami <i>S.epidermidis</i> w badanej populacji chorych.....	80
Rycina 23. Rozdział produktów reakcji <i>fnbA</i> -PCR w żelu agarozowym.....	121
Rycina 24. Rozdział produktów reakcji <i>cna</i> -PCR w żelu agarozowym.....	122
Rycina 25. Rozdział produktów reakcji <i>eta</i> -PCR w żelu agarozowym.....	122
Rycina 26. Optymalizacja warunków reakcji <i>etd</i> GRADIENT-PCR w żelu agarozowym.....	123
Rycina 27. Rozdział produktów reakcji <i>etd</i> -PCR w żelu agarozowym.....	123
Rycina 28. Optymalizacja warunków reakcji <i>edin</i> GRADIENT-PCR w żelu agarozowym.....	124
Rycina 29. Rozdział produktów reakcji <i>edin</i> -PCR w żelu agarozowym.....	124
Rycina 30. Rozdział produktów reakcji <i>mecAStaphPVL</i> -PCR w żelu agarozowym.....	125
Rycina 31. Rozdział produktów reakcji <i>atlE</i> -PCR w żelu agarozowym.....	125
Rycina 32. Rozdział produktów reakcji <i>icaAB</i> -PCR w żelu agarozowym.....	126
Rycina 33. Rozdział produktów reakcji <i>IS256</i> -PCR w żelu agarozowym.....	126

10.2. Tabele

Tabela 1. Objawy występujące u chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną.....	13
Tabela 2. Stadia zmian w przebiegu zespołu stopy cukrzycowej według klasyfikacji Wagnera.....	14
Tabela 3. Demograficzne, kliniczne i laboratoryjne parametry chorych z cukrzycą.....	38
Tabela 4. Produkty amplifikacji genów <i>fnbA</i> , <i>cna</i> , <i>eta</i> , <i>icaAB</i> , <i>atlE</i> , <i>IS256</i> oraz funkcje kodowanych przez nie białek.....	43
Tabela 5. Produkty amplifikacji genów <i>mecA</i> , <i>PVL</i> , <i>Staph756</i> oraz funkcje kodowanych przez nie białek.....	44
Tabela 6. Warunki reakcji PCR-GRADIENT dla genów <i>etd</i> i <i>edin</i>	45
Tabela 7. Flora bakteryjna chorych leczonych szpitalnie i ambulatoryjnie.....	53
Tabela 8. Częstość występowania szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> u chorych z zespołem stopy cukrzycowej (ZSC) w zależności od miejsca pobrania materiału.....	54
Tabela 9. Klasyfikacja szczepów izolowanych od chorych z zespołem stopy cukrzycowej i zdrowych ochotników.....	56
Tabela 10. Częstość występowania oporności na metycylinę u szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> izolowanych z różnych miejsc pobrania.....	57
Tabela 11. Oporność wielolekowa szczepów MRSA i MRSE izolowanych od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej.....	58
Tabela 12. Częstość występowania genów wirulencji u metycylinowrażliwych i metycylinoopornych szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> pochodzących od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną.....	72
Tabela 13. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> izolowanych z tkanki owrzodzenia i wymazów z powierzchni międzypalcowej chorych z zespołem stopy cukrzycowej oraz zdrowych ochotników.....	73
Tabela 14. Częstość występowania genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> izolowanych od chorych ze stopą cukrzycową neuropatyczną i niedokrwienną oraz od zdrowych ochotników.....	73
Tabela 15. Obecność i ekspresja genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i>	74
Tabela 16. Ekspresja genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> w zależności od miejsca pobrania materiału.....	75
Tabela 17. Ekspresja genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> w zależności od rodzaju stopy cukrzycowej.....	76
Tabela 18. Ekspresja genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i>	76

10.3. Załączniki

Załącznik 1. Zbiorcze dane dotyczące izolatów badanego materiału od chorych.....	115
Załącznik 2. Odczynniki i testy stosowane do izolacji bakterii z materiału klinicznego, ich identyfikacji i bankowania.....	117
Załącznik 3. Test stosowany do określania oporności szczepów <i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i> na antybiotyki oraz oporności wielolekowej szczepów MRSA i MRSE.....	117
Załącznik 4. Odczynniki i zestawy stosowane do izolacji DNA i wykrywania obecności genów kodujących wybrane czynniki wirulencji.....	118
Załącznik 5. Zestawy stosowane do badania ekspresji genów czynników wirulencji.....	118
Załącznik 6. Odczynniki stosowane do badania podobieństwa genetycznego szczepów techniką PFGE.....	118
Załącznik 7. Składy stosowanych buforów w technice PFGE.....	119
Załącznik 8. Obecność genów wirulencji u szczepów <i>S.aureus</i> pochodzących od osób chorych.....	119
Załącznik 9. Sekwencje zastosowanych w reakcji PCR starterów badanych genów wirulencji.....	120
Załącznik 10. Sekwencje zastosowanych w reakcji PCR starterów dla oporności gronkowcowej zdrowych ochotników.....	120
Załącznik 11. Warunki reakcji PCR dla genów wirulencji <i>fnbA</i> , <i>eta</i> , <i>cna</i> , <i>icaAB</i> , <i>atlE</i> , <i>IS256</i>	121
Załącznik 12. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.....	
Załącznik 13. Warunki reakcji PCR dla genów wirulencji <i>mecA</i> , <i>PVL</i> , <i>Staph756</i>	127
Załącznik 14. Obecność genów wirulencji u szczepów <i>S.epidermidis</i> pochodzących od osób chorych i zdrowych ochotników.....	130
Załącznik 15. Algorytm postępowania w przypadku zakażonej stopy cukrzycowej.....	131

11. Piśmiennictwo

1. **Alexiadou K.**, Doupis J.; Management of diabetic foot ulcers; *Diabetes Ther.*; 2012; 3(1):4
2. **Amagai M.**, Matusuyoshi N., Stanley A.J.R., Wang Z.H.; Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1; *Nature Medicine* 11; 2000; (6):1275-1277
3. **Andel M.**, Grzeszczak W., Michalek J., Medvescek M., Norkus A., Rasa I., Niewada M., Kamiński B., Kraml P., Madacsy L., DEPAC GroupA; Multinational, multi-centre, observational, cross-sectional survey assessing diabetes secondary care in Central and Eastern Europe (DEPAC Survey); *Diabet. Med.*; 2008; 25(10):1195-203
4. **Antunes L.C.**, Ferreira R.B., Buckner M.M.; Quorum sensing in bacterial virulence; *Finlay BBMicrobiology.*; 2010;156(Pt 8):2271-82
5. **Aparna M.S.**, Yadav S.; Biofilms: microbes and disease; 2008; 12(6):526-30
6. **Aragón-Sánchez J.**, Lázaro-Martínez J.L., Pulido-Duque J., Maynar M.; From the diabetic foot ulcer and beyond: how do foot infections spread in patients with diabetes?; *Diabet. Foot.Ankle.*; 2012; 3
7. **Araj G. F.**, Maasad M.J., Simaan C.J., Talhouk R.S.; Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; *International Journal of Antimicrobial Agents*; 1999; 1:(11)47-52
8. **Arciola C.R.**, Campoccia D., Gamberini S., Rizzi S., Donati M.E., Baldassarri L., Montanaro L.; Search for the insertion element *IS256* within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections; *Biomaterials*; 2004; 25(18):4117-25
9. **Arslan S.**, Ozkardes F.; Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; 2007;102(1):29-33
10. **Bala M.M.**, Płaczkiewicz-Jankowska E., Topór-Madry R., Leśniak W., Wiercińska E., Szczepaniak P., Jaeschke R., Sieradzki J., Grzeszczak W., Banasiak W.; ARETAEUS Study Group; Characteristics of patients with type 2 diabetes of short duration in Poland: Rationale, design and preliminary results of the ARETAEUS1 study; *Pol. Arch. Med. Wewn.*; 2009; 119(9):533-40
11. **Bader M.S.**; Diabetic foot infection. Review; *Am. Fam. Physician.*; 2008; 78(1):71-9
12. **Berberi E.F.**, Kowalski T.J., Osmon D.R.; Epidemiologia, leczenie i profilaktyka pozaszpitalnych zakażeń metycylooopornych szczepami *S.aureus*; *Medycyna po Dyplomie* 3; 2006; 15
13. **Biswas R.**, Voggu L., Simon U.K., Hentschel P., Thumm G., Götz F.; Activity of the major staphylococcal autolysin Atl; 2006; *FEMS Microbiol Lett.* 259(2):260-8
14. **Bjarnsholt T.**, Kirketerp-Møller K., Jensen P., Madsen K.G., Phipps R, Krogfelt K., Høiby N., Givskov M.; Wound Repair Regen; Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis; 2008;16(1):2-10
15. **Borys S.**, Koblik T.; Zakażenia w stopie cukrzycowej zagrożonej amputacją; *Zakażenia*; 2010; 113-120
16. **Boynukara B.**, Gulhan T., Guturk K., Alisarli M., Ogun E.; Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens; *J. Med. Microbiol.*; 2007; 56(10):1296-300
17. **Bowling F.L.**, Jude E.B., Boulton A.J.; MRSA and diabetic foot wounds: contaminating or infecting organisms?; *Curr. Diab. Rep*; 2009; 9(6):440-4
18. **Brady R.A.**, Leid J.G., Calhoun J.H., Costerton J.W., Shirtliff M.E.; Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 2008; 52(1):13-22

19. **Brem H.**, Sheehan P., Boulton A.J.; Protocol for treatment of diabetic foot ulcers; 2004; *Am J Surg.* 187(5A):1-10
20. **Brem H.**, Tomic-Canic M.; Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes; *The Journal of Clinical Investigation*; 2007; 117: 1219-1222
21. **Burke F.M.**, McCormack N., Rindi S., Speziale P., Foster T.J.; Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*; *BMC Microbiology*; 2010; 10:160
22. **Cafiso V.**, Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli M.G., Selan L., Artini M., Nicoletti G., Stefani S.; Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production; *Clin. Microbiol. Infect.*; 2004; 10: 1081–1088
23. **Cavanagh P.R.**, Lipsky B.A., Bradbury A.W., Botek G.; Treatment for diabetic foot ulcers; *Lancet.*; 2005; 366(9498):1725-35
24. **Chomczynski P.**, Sacchi N.; The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on; *Nat.Protoc.*; 2006; 1(2):581-5
25. **Citron D.M.**, Goldstein E.J., Merriam C. V., Lipsky B. A., Abramson M. A.; Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents; *J. Clin. Microbiol.*; 2007; 45(9):2819-28
26. **Chung M.**, de Lencastre H., Matthews P., Tomasz A., Adamsson I. i wsp.; Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains; *Microb. Drug Resist.*; 2000; 6(3):189-98
27. **Czech A.**, **Grzeszczak W.**; Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę; 2007; Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego; *Medycyna Praktyczna* 2007/04
28. **Czech A.**, Yamaguchi T., Bader L., Linder S., Kaminski K., Sugai M., Aepfelbacher M.; Prevalence of Rho- inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates; *J.Infect.Dis.*; 2001; 184: 785-788
29. **Dice B.**, Stoodley P., Buchinsky F., Metha N., Ehrlich G.D., Hu F.Z.; Biofilm formation by *ica*-positive and *ica*-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* in vitro; *Biofouling.*; 2009; 25(4):367-75
30. **Ducka B.**, Strojek K.; Rola diabetologa w zapobieganiu rozwojowi stopy cukrzycowej; *Przew. Lek.*; 2007; 4: 43-51
31. **Dzieciuchowicz Ł.**; Współczesne poglądy na patogenezę stopy cukrzycowej; *Polski Przegląd Chirurgiczny*; 2001; 73(5)476-481
32. **Edwards A.M.**, Potts J.R., Josefsson E., Massey R.C.; *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA; *PLoS Pathog.*; 2010; 24; 6(6):e1000964
33. **Eftekhari F.**, Speert D.P.; Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit; *J. Hosp. Infect.*; 2009; 71(2):112-6
34. **Falanga V.**; The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation; *Blood Cells, Molecules, and diseases*; 2004; 32; 88-94
35. **Fey P.D.**; Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections?; *Current Opinion in Microbiology*; 2010; 13:610-615
36. **Fey P.D.**, Olson M.E.; Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*; *Future Microbiol.* 2010; 5(6):917-33
37. **Fitzpatrick F.**, Humphreys H., O'gara J.P.; The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?; *Clin. Microbiol. Infect.*; 2005; 11: 967-973

38. **Flemming H.C.**, Wingender J.; The biofilm matrix; *Nat. Rev. Microbiol.*; 2010; 8(9):623-33
39. **Fluckiger U.**, Ulrich M., Steinhuber A., Döring G., Mack D., Landmann R., Goerke C., Wolz C.; Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesion synthesis by staphylococci in a device-related infection model; *Infection and Immunity*; 2005; 1811–1819
40. **Fluckiger U.**, Ulrich M., Steinhuber A. *et al.* ; Biofilm formation, *icaADBC* transcription and polysaccharide intercellular adhesion synthesis by staphylococci in a device-related infection model; *Infect. Immun.*; 2005; 73(3): 1811–1819
41. **Foka A.**, Chini V., Petinaki E., Kolonitsiou F., Anastassiou E.D., Dimitracopoulos G., Spiliopoulou I.; Clonality of slime-producing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital; *Clin. Microbiol. Infect.*; 2006; 12(12):1230-3
42. **Franke G.C.**, Böckenholt A., Sugai M., Rohde H., Aepfelbacher M.; Epidemiology, variable genetic organization and regulation of the EDIN-B toxin in *Staphylococcus aureus* from bacteraemic patients; *Microbiology*. 2010; 156(Pt 3):860-72
43. **Frebourg N.B.**, Lefebvre S., Baert S., Lemeland J.F.; PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains; *J.Clin. Microbiol.*; 2000; 38(2):877-80
44. **Galkowska H.**, Olszewski W.L., Wojewodzka U., Mijal J., Filipiuk E.; Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers; *Surgery*; 2003;134(2):213-20
45. **Galkowska H.**, Olszewski W.L., Wojewodzka U., Rosinski G., Karnafel W.; Neurogenic factors in the impaired healing of diabetic foot ulcers; *J.Surg.Res.*; 2006; 134(2):252-8
46. **Galkowska H.**, Podbielska A., Olszewski W.L., Stelmach E., Luczak M., Rosinski G., Karnafel W.; Epidemiology and prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in patients with diabetic foot ulcers: focus on the differences between species isolated from individuals with ischemic vs.. neuropathic foot ulcers; *Diabetes Res. Clin. Pract.*; 2009; 84(2):187-93
47. **Galkowska H.**, Wojewodzka U., Olszewski W.L.; Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers; *Wound Repair Regen.*; 2006; 14(5):558-65
48. **Galkowska H.**, Wojewodzka U., Olszewski W.L.; Low recruitment of immune cells with increased expression of endothelial adhesion molecules in margins of the chronic diabetic foot ulcers; *Wound Repair Regen.* 2005;13(3):248-54
49. **Ge Y.**, MacDonald D., Hait H., Lipsky B., Zasloff M., Holroyd K.; Microbiological profile of infected diabetic foot ulcers; *Diabet. Med.*; 2002; 19(12):1032-4
50. **Gershater M.A.**, Löndahl M., Nyberg P., Larsson J., Thörne J., Eneroth M., Apelqvist J.; Complexity of factors related to outcome of neuropathic and neuroischaemic/ischaemic diabetic foot ulcers: a cohort study; *Diabetologia*; 2009; 52(3):398-407
51. **Glenn F.P.**; Inflammation in nonhealing diabetic wounds. The space-time continuum does matter; *Am. J. Pathol.*; 2001; 159(2): 399–403
52. **Gu J.**, Li H., Li M., Vuong C., Otto M., Wen Y., Gao Q.; Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*; *J.Hosp. Infect.*; 2005; 61:342–348
53. **Hanssen A.M.**, Kjeldsen G., Sollid J.U.; Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?; *Antimicrob. Agents Chemother.*; 2004; 48(1):285-96
54. **Hauck Ch.R.**, Ohlsen K.; Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*; *Current Opinion in Microbiology*; 2006; (9):5-11

55. **Healy B.**, Freedman A.; ABC of wound healing; *Infections*; 2006; 332(7545): 838–841
56. **Hebel R.**; Współczesne poglądy na temat neuropatii cukrzycowej; *Medycyna po dyplomie*; 2002; 11(6) 132-137
57. **Hennig S.**, Ziebuhr W.; Characterization of the transposase encoded by *IS256*, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements; *Journal of Bacteriology*; 2010; 4153–4163
58. **Hook M.**, Mohamed N., Ross M., Teeters M. A.; Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to collagen under dynamic conditions; *Infection and Immunity*; 1999; (2):589-594
59. **Houston P.**, Rowe S.E., Pozzi C., Waters E.M., O'Gara J.P.; Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype; *Infect. Immun.*; 2011; 79(3):1153-65
60. **Iorio N.L.**, Lopes A.P., Schuenck R.P., Barcellos A.G., Olendzki A.N., Lopez G.L., dos Santos K.R.; A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures; *Microbiol. Immunol.*; 2011; 55(1):28-33
61. **Jaime E.**, Molina-Manso D., Spiliopoulou I., Cordero-Ampuero J., Fernández-Roblas R., Foka A., Gómez-Barrena E.; Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses; *Acta Orthopaedica*; 2010; 81 (6): 674–679
62. **Jain A.**, Agarwal A.J.; Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci; *Microbiol Methods*; 2009; 76(1):88-92
63. **Jarraud S.**, Mougél Ch., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F. *et al.*; Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease; *Infection and Immunity*; 2002; 70: 631-641
64. **Jaworski A.**, Serwecińska L., Stączek P.; Quorum sensing-komunikowanie się komórek w populacjach bakterii przy udziale chemicznych cząsteczek sygnałowych; *Postępy biologii komórki*; 2005; 32; 231-256
65. **Jeffcoate W.J.**, Harding K.G.; Diabetic foot ulcers; *Lancet.*; 2003; 361(9368):1545-51
66. **Jones R.N.**, Flonta M., Gurler N., Cepparulo M., Mendes R.E., Castanheira M.; Resistance surveillance program report for selected European nations; *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*; 2013; Epub ahead of print
67. **Juuti K.**; Surface protein PIs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- role in adhesion, invasion and pathogenesis, and evolutionary aspects; Helsinki; 2004
68. **Karukonda S.R.**, Flynn T.C., Boh E.E., McBurney E.I., Russo G.G., Millikan L.E.; The effects of drugs on wound healing: part 1; *Int. J. Dermatol.*; 2000; 39(4):250-7
69. **Kawalec P.**, Pilc A.; Koszty leczenia zespołu stopy cukrzycowej w Polsce; *Medycyna Metaboliczna* 2003; 7:11
70. **King-Ting Lim**, Yasmin Abu Hanifah, Mohd Yasim Mohd Yusof, Kwai-Lin Thon; Characterisation of the virulence factors and genetic types of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from patients and healthy individuals; *Indian J. Microbiol.*; 2012; 52(4): 593–600
71. **Kirketerp-Møller K.**, Jensen P.Ø., Fazli M., Madsen K.G., Pedersen J., Moser C., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T.; Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds; *J.Clin Microbiol.*; 2008; 46(8):2717-22
72. **Kmammash M.R.**, Khaled A. O.; Prevalence of ischemia in diabetic foot infection; *World J. Surgery*; 2003; 27; 797-799
73. **Knapp S.**; Diabetes and infection: Is there a link? – A mini-review; *Gerontology*; 2012; 1-6
74. **Koblik T.**; Algorytmy leczenia zespołu stopy cukrzycowej; *Klinika Chorób Metabolicznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie*

75. **Koblik T.**, Sieradzki J.; Zespół stopy cukrzycowej; Via Medica; Gdańsk; 2008
76. **Kouidhi B.**, Zmantar T., Hentati H., Bakhrouf A.; Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries; Microb. Pathog.; 2010; 49(1-2):14-22
77. **Kozitskaya S.**, Cho S-H, Dietrich K., Marre R., Naber K., Ziebuhr W.; The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides.; Infect. Immunity; 2004; 72: 1210- 1215
78. **Krukowski H.**, Szymankiewicz M., Lisowski A.; Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis; Pol.J. Microbiol.; 2008; 57(3):253-5
79. **Kumar J.D.**, Negi Y.K., Gaur A., Khanna D.; Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency; Int J Infect Dis.; 2009; 13(6):e450-5
80. **Labischinski H.**, Fujiwara T., Komatsuzawa H., Nishida T., Ohara M., Sugai M., Takahashi J., Yamada S., Yamagishi J.; Molecular characterization of an atl null mutant of *Staphylococcus aureus*; Microbiology and Immunology; 2002; 9:(46)601-612
81. **Li M.**, Wang X., Gao Q, Lu Y; Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China; Journal of Medical Microbiology; 2009; (58):456–461
82. **Liberto M.C.**, Matera G., Quirino A., Lamberti A.G., Capicotto R., Puccio R. Barreca G.S., Focà E., Cascio A., Focà A.; Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques; Microbiol Res.; 2009;164(5):522-8
83. **Lina G.**, Piemont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gaudchon V.; Involvement of Panton-Valentin leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia; Clin.Infect.Dis.; 1999; 29:1128-1132
84. **Los R.**, Sawicki R., Juda M., Stankevic M., Rybojad P., Sawicki M., Malm A., Ginalska G.; A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*; FEMS Microbiol .Lett.; 2010; (310):97–103
85. **Martin J.M.**, Zenilman J.M., Lazarus G.S.; Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing; J.Invest. Dermatol.; 2010; 130(1):38-48
86. **Mateo M.**, Maestre J.R.; Aguilar L., Giménez M.J., Granizo J.J., Prieto J.; Strong slime production is a marker of clinical significance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from intravascular catheters; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.; 2008; 27:311–314
87. **McCann M.T.**, Gilmore B.F., Gorman S.P.; *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management; J. Pharm. Pharmacol.; 2008; 60(12): 1551-71
88. **McClure J.A.**, Conly J.M., Lau V., Elsayed S., Louie T., Hutchins W., Zhang K.; Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci; J.Clin. Microbiol.; 2006; 44(3):1141-4
89. **Messad N.**, Landraud L., Canivet B., Lina G., Richard J.L., Sotto A., Lavigne J.P., Lemichez E.; Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers; Clin. Microbiol. Infect.; 2013; 19: 875–880
90. **Międzobrodzki J.**, Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprowicz A.; Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe; Postępy Hig. Med. Dosw. (online); 2008; 62: 322-327
91. **Montanaro L.**, Campoccia D., Pirini V., Ravaioli S., Otto M., Arciola C.R.; Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and ica genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections; J. Biomed. Mater Res. A.; 2007; 1;83(3):813-8
92. **Morris D.K.**; Heel ulcerations in the diabetic patient, Wounds 2001; 14(6):212-216

93. **Munro P.**, Benchetrit M., Nahori M.A., Stefani C., Clément R., Michiels J.F., Landraud L., Dussurget O., Lemichez E.; The *Staphylococcus aureus* epidermal cell differentiation inhibitor toxin promotes formation of infection foci in a mouse model of bacteremia; *Infect. Immun.*; 2010; 78(8):3404-11
94. **Munro P.**, Clément R., Lavigne J.P., Pulcini C., Lemichez E., Landraud L.; High prevalence of edin-C encoding RhoA-targeting toxin in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*; *Eur.J.Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 2011; 30(8):965-72
95. **Nashev D.**, Toshkova K., Salasia S.I., Hassan A.A., Lämmle C, Zschöck M.; Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers; *FEMS Microbiol Lett.*; 2004; 233(1):45-52
96. **Nayak N.**, Satpathy G., Nag H.L., Venkatesh P., Ramakrishnan S., Nag T.C., Prasad S.; Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant-related infections; *J. Hosp. Infect.*; 2011; 77(2):153-6
97. **O'Gara J.**; *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*; *FEMS Microbiol. Lett.*; 2007; 270(2):179-88
98. **O'Leary J.**; *Advanced Diagnostic Methods in Pathology*; 2002; Saunders 136-194
99. **O'Neill E.**, Pozzi C., Foster T., Humphreys H., O'Gara J.; A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB; *Journal of Bacteriology*; 2008; 3835–3850
100. **Onuma K.**, Tanabe T., Sato H.; Development of a high-expression system for staphylococcal exfoliative toxin genes; *J. Vet. Med. Sci.*; 2011; 73(8):1051-7
101. **Otto M.**; *Staphylococcal Biofilms*; *Curr Top Microbiol Immunol.*; 2008; 322: 207–228
102. **Pammi M.**, Liang R., Hicks J., Mistretta T.A., Versalovic J.; Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*; *BMC Microbiol.*; 2013; 14;13:257
103. **Peacock S.J.**, Moore C.E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., O'Neill G., Day N.P.J.; Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus.*; *Infect. Immunity*; 2002;70: 4987-4996
104. **Percival S.L.**, Bowler P.G.; Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing; *World Wide Wounds*; 2004
105. **Petrelli D.**, Zampaloni C., D'Ercole S., Prenna M., Ballarini P., Ripa S., Vitali L.A.; Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 2006; 25(12):773-81
106. **Pietruczuk-Padzik A.**, Stefańska J., Semczuk K., Dzierzanowska D., Tyski S.; Ocena tworzenia biofilmu przez szczepy *Staphylococcus aureus* wyizolowane z płwociny pacjentów z mukowiscydozą; *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2010;62(1):1-8
107. **Piette A.**, Verschraegen G.; Role of coagulase-negative staphylococci in human disease; *Vet. Microbiol.*; 2009; 134(1-2):45-54
108. **Piroth L.**, Que Y.A., Widmer E., Panchaud A., Piu S., Entenza J.M., Moreillon P.; The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis; *Infect.Immun.*; 2008; 76(8): 3824-31
109. **Plata K.**, Rosato A.E., Węgrzyn G.; *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity; *Acta Biochemica Polonica*; 2009; 56: 597-612
110. **Podbielska A.**, Galkowska H., Stelmach E., Mlynarczyk G., Olszewski W.L.; Slime production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with diabetic foot ulcers; *Arch. Immunol. Ther. Exp.*; 2010; 58(4):321-324

111. **Powlson A.S.**, Coll A.P.; The treatment of diabetic foot infections; *J. Antimicrob. Chemother.*; 2010; 65; Suppl 3:iii3-9
112. **Qian W.**, Sun F.-J., Liu Y., Xiong L.-R., Xie L.-L., Xia P.-Y.; Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 2010; 2707–2711
113. **Ramasastri S.S.**; Chronic problem wounds; *Clin. Plast. Surg.*; 1998; 25(3):367-96
114. **Richard J.-L.**, Sotto A., Lavigne J.-P.; New insights in diabetic foot infection; *World J. Diabetes.*; 2011; 2(2): 24-32
115. **Rogers K.L.**, Rupp M.E., Fey P.D.; The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*; *Applied and Environmental Microbiology*; 2008; 6155–6157
116. **Rohde H.**, Burandt E.C., Siemssen N., Frommelt L., Burdelski C., Wurster S., Scherpe S., Davies A.P., Harris L.G., Horstkotte M.A., Knobloch J. K-M, Ragunath C., Kaplan J.B., Mack D. ; Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections; *Biomaterials*; 2007; 28:1711-1720
117. **Rohde H.**, Frankenberger S., Zähringer U., Mack D.; Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections; *Eur. J. Cell. Biol.* ;2010; 89(1):103-11
118. **Rohde H.**, Kalitzky M., Kröger N., Scherpe S., Horstkotte M.A., Knobloch J.K., Zander A.R., Mack D.; Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit; *J. Clin. Microbiol.*; 2004; 42(12):5614-9
119. **Rosinski G.**; Leczenie zespołu stopy cukrzycowej; *Przewodnik lekarza*; 2005; 3; 58-64
120. **Sanghera D.K.**, Blackett P.R.; Type 2 diabetes genetics: Beyond GWAS.; *J.Diabetes. Metab.*; 2012; 23; 3:5
121. **Satorres S.E.**, Lucía E. A.; Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff; *Cent. Eur. J. Public. Health*; 2007; 15 (2): 87–90
122. **Schoenfelder S.M.**, Lange C., Eckart M., Hennig S., Kozytska S., Ziebuhr W.; Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen; *Int.J.Med.Microbiol.*; 2010;300(6):380-86
123. **Semczuk K.**, Dzierzanowska-Fangrat K., Dmeńska H., Dzierzanowska D.; Ocena wytwarzania biofilmu przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane od dzieci chorych na mukowiscydozę; *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2008;60(4):311-18
124. **Shaw J.E.**, Boulton J.M.; The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview; *Diabetes*; 1997; 46(2):58-61
125. **Shea K.W.**; Antybiotykoterapia w zakażeniach stopy cukrzycowej, *Medycyna po dyplomie*; 2000; 9(1) 52-59
126. **Shu Y.Q.**, Khan B.A., Wang R., Bach L. Thanh-Huy, Kretschmer D., Chen L., Kreiswirth B.N., Peschel A., DeLeo F.R., Otto M.; Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA; *PLoS Pathog.*; 2009; 5(7): e1000533
127. **Siddiqui A.R.**, Bernstein J.M.; Chronic wound infection: facts and controversies. Review; *Clin. Dermatol.*; 2010; 28(5):519-26
128. **Sotto A.**, Richard J.L., Jourdan N., Combescure C., Bouziges N., Lavigne J.P.; Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers; *Diabetes Care*; 2007; 30(8):2051-6
129. **Sotto A.**, Richard J.L., Messad N., Molinari N., Jourdan N., Schuldiner S., Sultan A., Carrière C., Canivet B., Landraud L., Lina G., Lavigne J.P.; Distinguishing colonization from infection

- with *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers with miniaturized oligonucleotide arrays: a French multicenter study; *Diabetes Care.*; 2012; 35(3):617-23
130. **Stanley N.R.**, Lazizzera B.A.; Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation; *Mol. Microbiol.*; 2004; 52(4):917-24
 131. **Stevens N.T.**, Greene C.M., O'Gara J.P., Humphreys H.; Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis; *J. Med. Microbiol.*; 2009; (58):855-62
 132. **Szczuka E.**, Grabska K., Trawczyński K., Bosacka K., Kaznowski A.; Characterization of SCCmec types, antibiotic resistance, and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains; *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013 Sep;60(3):261-70
 133. **Tahergorabi Z.**, Khazaei M.; Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms; *Int.J.Prev.Med.*; 2012; 3(12):827-38
 134. **Tenover F.C.**, Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Persing D.H., Swaminathan B.; Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing; *J.Clin.Microbiol.*; 1995; 33:2233-2239
 135. **Thangarajah H.**, Vial I.N., Grogan R.H., Yao D., Shi Y., Januszyk M., Galiano R.D., Chang E.I., Galvez M.G., Glotzbach J.P., Wong V.W., Brownlee M., Gurtner G.C.; HIF-1alpha dysfunction in diabetes; *Cell Cycle*; 2010; 9(1):75-9
 136. **Tu Quoc P. H.**, Genevaux P., Pajunen M., Savilahti H., Georgopoulos C., Schrenzel J., Kelley W.L.; Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*; *Infection and Immunity*; 2007; 1079–1088
 137. **Warren Y. A.**, Tyrrell K. L., Citron D. M., Goldstein E. J.; *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections; *J. Clin. Microbiol.*; 2006; 44:2416–2422
 138. **Waugh H.V.**, Sherratt J.A.; Macrophage dynamics in diabetic wound healing; *Bull Math. Biol.*; 2006; 68(1):197-207
 139. **Wisplinghoff H.**, Rosato A.E., Enright M.C., Noto M., Craig W., Archer G.L.; Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates; *Antimicrob. Agents Chemother.*; 2003; 3574–3579
 140. **Wiśniewska K.**, Garbacz K., Piechowicz L.; Genotypic screening of atypical *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples for M of selected adhesin genes; *Med. Mal. Infect.*; 2008; 38(10):549-53
 141. **Witkowska D.**; Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej; *Postępy Hig. Med. Dośw.*; 2009; 63: 176-199
 142. **Vacheethasane K.**, Marchant R.E.; Handbook of bacterial adhesion; Nonspecific *Staphylococcus epidermidis* adhesion; 2000; Humana Press; 73-90
 143. **Vinik A.I.**, Park T.S., Stansberry K.B., Pittenger G.L.; Neuropatie cukrzycowe; *Diabetologia*; 2000; 43:957-973
 144. **Von Eiff C.**, Peters G., Heilmann C.; Pathogenesis of infections due to coagulase- negative staphylococci; *The Lancet Infect. Dis.*; 2002; 2: 677-685
 145. **Vuong C.**, Otto M.; *Staphylococcus epidermidis* infections; *Microbes Infect.*; 2002; 4(4):481-9
 146. **Xu Y.**, Rivas J.M., Brown E.L., Liang X., Höök M.; Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen; *J. Infect. Dis.*; 2004; 189(12):2323-33
 147. **Yamaguchi T.**, Nishimura K., Sasaki M., Fudaba Y., Aepfelbacher M., Takata T., Ohara M., Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M.; Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B; *Infect Immun.*; 2002; 70(10): 5835–5845

148. **Yekta Z.**, Pourali R., Nezhadrahim R., Ravanyar L., Ghasemi-Rad M.; Clinical and behavioral factors associated with management outcome in hospitalized patients with diabetic foot ulcer; *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*; 2011; 4:371-5
149. **Yuehwei H. A.**, Dickinson R.B., Doyle R.J.; *Handbook of bacterial adhesion; Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue*; 2000; Humana Press; 1-37
150. **Zdżalik D.**, Dominiak A., Gałkowska H., Interewicz B., Olszewski W.L., Stelmach E., Luczak M., Machowski Z.; The molecular characteristic of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical sources, *Med. Dośw. Mikrobiol.*; 2006; 58(4):269-74
151. **Ziebuhr W.**, Heilmann C., Gotz F., Meyer P., Wilms K., Straube E, Hacker J.; Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates; *Infect Immun.*; 1997; 65(3): 890–896
152. **Ziebuhr W.**, Krimmer V., Rachid S., Lössner I., Götz F., Hacker J.; A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element *IS256*; *Mol. Microbiol.*; 1999; 32(2):345-56
153. **Zmantar T.**, Chaieb K., Makni H., Miladi H., Abdallah F.B., Mahdouani K., Bakhrouf A.; Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*; *Journal of Basic Microbiology*; 2008;48, 308–314

12. Załączniki

Załącznik 1. Zbiorcze dane dotyczące izolatów badanego materiału od chorych

Kolejny nr próbki i nr przypisany w trakcie badań- przypisane tylko dla izolatów użytych w badaniach (*S.aureus* lub *S.epidermidis*); R-oporność na metycylinę, zbadana wyłącznie dla *Staphylococcus*; SCNied.-stopa cukrzycowa niedokrwienna, SCNeur.-stopa cukrzycowa neuropatyczna; W-wyskrobiny z dna owrzodzenia, S-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej; O- izolaty od chorych z oddziału szpitalnego, P-izolaty od chorych leczonych w przychodni

Numer pacjenta	Kolejny numer próbki	Numer przypisany w trakcie badań	Gatunek bakterii	Oporność na metycylinę	Rodzaj stopy cukrzycowej	Miejsce pobrania materiału do badań	Miejsce leczenia pacjenta
1	1	4/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	O
	2	5/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	
			<i>S.capitis</i>				
2	3	6/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	O
	4	8/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	S	
3	5	9/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	O
	6	12/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	S	
4	7	11/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	MP	O
	8	13/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	W	
5			<i>S.hominis</i>		SCNeur.	S	O
			<i>S.capitis</i>				
			<i>S.hominis</i>		SCNeur.	MP	
			<i>S.capitis</i>				
6	9	17/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	W	O
	10	16/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	S	
	11	18/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	MP	
7	12	26/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	O
	13	27/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	
	14		<i>S.haemolyticus</i>		SCNeur.	MP	
8	15	29/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	W	O
	16	31/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
9	17	39/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	P
	18	40/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	MP	
	19	39/2	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	S	
	20	40/2	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	MP	
10	21	41/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	W	P
	22	41/2	<i>S.aureus</i>		SCNied.	W	
11	23	42/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	W	P
	24	47/1	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.capitis</i>	R	SCNeur.	W	
	25	48/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	S	
	26	48/2	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	
	27	49/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
	28	49/2	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
12	29	50/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	S	P
13	30	53/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	P
	31	54/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	MP	
14	32	55/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	W	P
	33	56/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	S	
	34	57/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	

15	35	60/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	MP	P
16	36	61/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	P
	37	61/2	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	MP	
17	39	67/2	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	W	P
			<i>S.sciuri</i>				
	40	68/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
	41	68/2	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
			<i>S.capitis</i>		SCNeur.	S	
18	42	420/2	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	W	P
	43	420/3	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	W	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
			<i>E.faecalis</i>				
	44	71/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	S	
45	70/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	MP		
19	46	72/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	W	P
	47	73/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	S	
	48	74/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	MP	
20	49	78/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	W	P
	50	79/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	MP	
21	51	83/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	W	P
	52	84/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	S	
22	53	87/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	MP	P
23			<i>S.xylosus</i>		SCNied.	S	P
	54	90/1	<i>S.epidermidis</i>		SCNied.	MP	
24	55	91/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	W	O
25	56	95/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	S	P
	57	96/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNeur.	MP	
26	58	101/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	P
	59	102/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	MP	
			<i>S.xylosus</i>		SCNeur.	S	
27	60	103/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	P
	61	104/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	
	62	105/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	MP	
28	63	112/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	S	O
29	64	118/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	S	P
	65	119/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	W	
	66	120/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	MP	
30	67	122/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	P
31	68	124/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	MP	P
	69	125/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	
	70	126/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	
32	71	127/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	S	P
	72	128/1	<i>S.aureus</i>		SCNied.	MP	
	73	129/1	<i>S.aureus</i>	R	SCNied.	W	
33	74	134/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur..	MP	P
			<i>S.xylosus</i>		SCNeur.	W	
			<i>S.capitis</i>		SCNeur.	S	
34	75	137/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNied.	MP	P
35	76	138/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	S	P
	77	139/1	<i>S.aureus</i>		SCNeur.	W	
	78	140/1	<i>S.epidermidis</i>	R	SCNeur.	MP	
36					SCNeur.		O
37			<i>S.luteus</i>		SCNeur.	MP	O
38					SCNied.		O
39			<i>S.simulans</i>		SCNied.	W, S, MP	P

40					SCNied.		O
41			<i>Pseudomonas</i>	R	SCNied.	W	P
			<i>E. faecalis</i>				
			<i>S. xyloso</i>				
42			<i>S. simulans</i>		SCNeur.	W	P
			<i>S. xyloso</i>		SCNeur.	S, MP	
43			<i>S. chro-mogenes</i>		SCNeur.	MP	P
44			<i>S. xyloso</i>		SCNeur.	W, MP	P
45			<i>Pseudomonas</i>		SCNied.	W, S	P
46			<i>S. captitis</i>		SCNied.	W,S, MP	P
47					SCNeur.		O
48					SCNeur.		P
49			<i>Proteus spp.</i>		SCNied.	W,S	P
50			<i>S. xyloso</i>		SCNeur.	S	P
			<i>S. cohnii</i>				

Załącznik 2. *Odczynniki i testy stosowane do izolacji bakterii z materiału klinicznego, ich identyfikacji i bankowania*

Stosowany odczynnik, test	Numer katalogowy	Producent
probówki z podłożem transportowym	408C	Copan, Brescia
podłoże BHI	51011	bioMérieux
podłoże stałe wybiórczo-różnicujące Chapmana	CM0145	Oxoid
testy biochemiczne API STAPH	205000	bioMérieux
Slidex Staph-kit	73112	bioMérieux
podłoże Mueller-Hinton	CM0337	Oxoid
ampułki Cryobank	291709	Mast Diagnostica
lizostafyna z <i>Staphylococcus staphylolyticus</i>	L7386	Sigma

Załącznik 3. *Test stosowany do określania oporności szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* na antybiotyki oraz oporności wielolekowej szczepów MRSA i MRSE*

Stosowany test	Numer katalogowy	Producent
ATB-STAPH 5	14225	bioMérieux

Załącznik 4. Odczynniki i zestawy stosowane do izolacji DNA i wykrywania obecności genów kodujących wybrane czynniki wirulencji

Stosowany odczynnik	Numer katalogowy	Producent
High Pure PCR Template Preparation Kit	11 796 828 001	Roche Applied Science
Proteinaza K z <i>Tritirachium album</i>	P2308-5MG	Sigma
agarozą NA	17-0554-03	Amersham Biosciences
bromek etydyny (10 mg/ml)	161-043	Bio-Rad
antyinhibitor PCR	RP50	DNAGdańsk
mieszanka deoksynukleotydów (200µM, DTP mix)	D7295	Sigma
Polimeraza Red Taq genomic DNA polymerase (1U/µl)	232-741-2	Sigma
GC-Rich (FastStart Taq DNA Polymerase)	12 161 575 001	Roche Applied Science
polimeraza RedAllegroTaq DNA polymerase	N1001-05	Novazym

Załącznik 5. Zestawy stosowane do badania ekspresji genów czynników wirulencji

Stosowany odczynnik	Numer katalogowy	Producent
Total RNA Kit	031-100	A&A Biotechnology
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	04 379 012 001	Roche Applied Science

Załącznik 6. Odczynniki stosowane do badania podobieństwa genetycznego szczepów techniką PFGE

Stosowany odczynnik	Numer katalogowy	Producent
Agarozą (InCert Agarose)	50123	Lonza
RNAza A (Ribonuclease A from bovine pancreas)	R6513	Sigma
lizozym (Lysozyme from chicken egg white)	L6876	Sigma
Lizostafyna (Lysostaphin from <i>Staphylococcus staphylolyticus</i>)	L7386	Sigma
proteinaza K (Proteinase K from <i>Tritirachium album</i>)	P2308-5MG	Sigma
enzym <i>Sma</i> I	#ER0661	Fermentas
agarozą Pulsed Field Certified	1620137	Biorad
Wzorzec masy molekularnej DNA (Lambda Ladder PFGE Marker)	NO3405	BioLabs

Załącznik 7. Składy stosowanych buforów w technice PFGE

Nazwa buforu	Skład
PIV	0,01 M Tris pH 8,0; 1M NaCl
EC	6 mM Tris pH 8,0; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,2% sodium deoxycholate; 0,2% N-lauroyl sarcosine sodium salt; 50 µg/ml RNAza A; 100 µg/ml lizozym; 50 µl/ml lizostafyna
ESP	0,5 M EDTA pH 9,0; 1% N-lauroyl sarcosine sodium salt; proteinaza K
TE	10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA
0,1 M PMSF	0,174 g PMSF (fluorek fenylometylosulfonylu) 10 ml metanolu
TBE	45 mM Tris; 45 mM kwas borowy; 1mM EDTA

Załącznik 8. Sekwencje zastosowanych w reakcji PCR starterów badanych genów wirulencji

Gatunek bakterii	Nazwa genu	Sekwencje genu	Piśmiennictwo
<i>S.aureus</i>	<i>fnbA</i>	5'-CACAACCAGCAAATATAG-3', 5'-CTGTGTGGTAATCAATGTC-3'	[99]
	<i>cna</i>	5'-AGTGGTTACTAATACTG-3', 5'-CAGGATAGATTGGTTTA-3'	[99]
	<i>eta</i>	5'-ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT-3', 5'-TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC-3'	[58]
	<i>etd</i>	5'-AACTATCATGTATCAAGG-3' 5'-CAGAATTTCCCGACTCAG-3'	[140]
	<i>edin</i>	5'-GAAGTATCTAATACTTCTTTAGCAGC-3' 5'-TCATTTGACAATTCTACTTCCAAC-3'	[58]
<i>S.epidermidis</i>	<i>atlE</i>	5'-CAACTGCTCAACCGAGAACA-3', 5'-TTTGTAGATGTTGTGCCCCA-3'	[39]
	<i>icaAB</i>	5'-TTATCAATGCCGCAGTTGTC-3', 5'-GTTTAACGCGAGTGCGCTAT-3'	[39]
	<i>IS256</i>	5'-ATGTAGGTCCATAAGAACGGC-3' 5'-TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC-3'	[114]

Załącznik 9. Sekwencje zastosowanych w reakcji PCR starterów dla oporności gronkowcowej

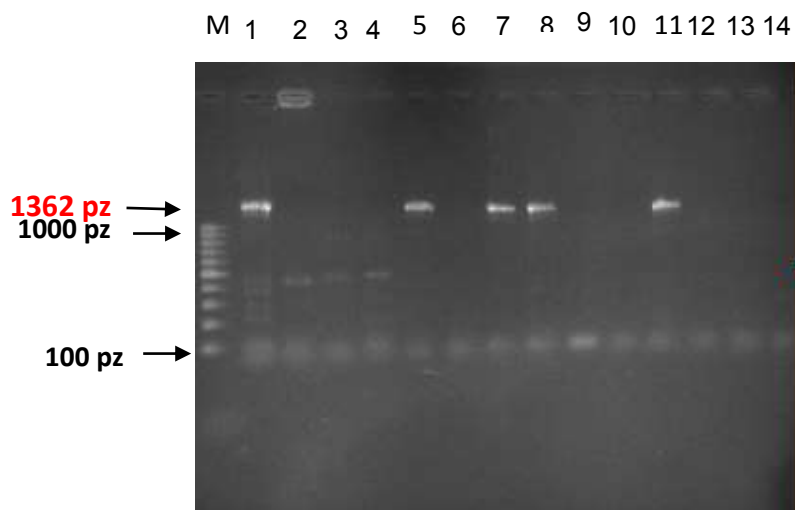
Gatunek bakterii	Nazwa genu	Sekwencje genu	Piśmienictwo
<i>S.aureus</i> i <i>S.epidermidis</i>	<i>mecA</i>	5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3' 5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3'	[84]
	<i>staph</i> 756	5'-AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA-3' 5'-CCACCTTCCTCCGGTTTGTACC-3'	
	<i>PVL</i>	5'ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' 5'-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC-3'	

Załącznik 10. Warunki reakcji PCR dla genów wirulencji *fnbA*, *eta*, *cna*, *icaAB*, *atlE*, IS256

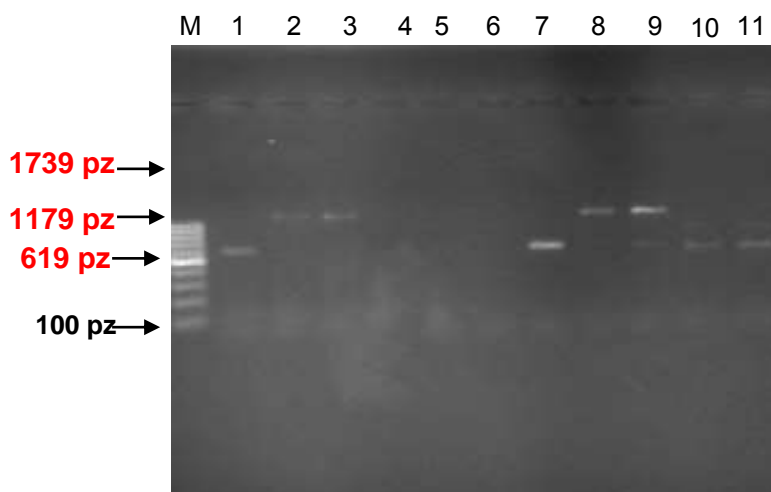
Gen	Etap PCR	Temperatura	Czas	Liczba cykli	Piśmienictwo
<i>fnbA</i> , <i>eta</i>	wstępna denaturacja	95°C	5 minut	30	[99]
	denaturacja w cyklu	95°C	1 minuta		
	przyłączanie starterów	50°C	1 minuta		
	wydłużanie	72°C	2 minuty		
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut		
<i>cna</i>	wstępna denaturacja	95°C	5 minut	30	[99]
	denaturacja w cyklu	94°C	1 minuta		
	przyłączanie starterów	45°C	1 minuta		
	wydłużanie	72°C	2 minuty		
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut		
<i>icaAB</i> , <i>atlE</i>	wstępna denaturacja	95°C	5 minut	35	[39]
	denaturacja w cyklu	9°C	1 minuta		
	przyłączanie starterów	35°C	1 minuta		
	wydłużanie	72°C	1 minuta		
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut		
IS256	wstępna denaturacja	95°C	5 minut	30	[144]
	denaturacja w cyklu	95°C	1 minuta		
	przyłączanie starterów	52°C	1 minuta		
	wydłużanie	68°C	1.5 minuty		
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut		

Załącznik 11. Warunki reakcji PCR dla genów wirulencji *mecA*, *PVL*, *Staph756*

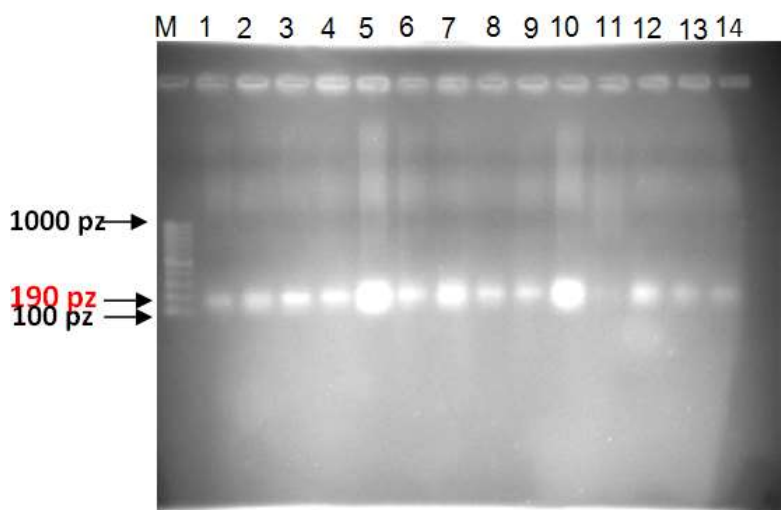
Gen	Etap PCR	Tempera- tura	Czas	Liczba cykli	Piśmien- nictwo
<i>mecA</i> , <i>PVL</i> , <i>Staph756</i>	wstępna denaturacja	94°C	10 minut	1	[84]
	denaturacja w cyklu (1)	94°C	45 sekund	10	
	przyłączanie starterów	55°C	45 sekund		
	wydłużanie	72°C	90 sekund		
	powrót do denaturacji w cyklu (1)				
	denaturacja w cyklu (2)	94°C	45 sekund	25	
	przyłączanie starterów	50°C	45 sekund		
	wydłużanie	72°C	90 sekund		
	powrót do denaturacji w cyklu (2)				
	wydłużanie końcowe	72°C	10 minut	1	

Załącznik 12. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

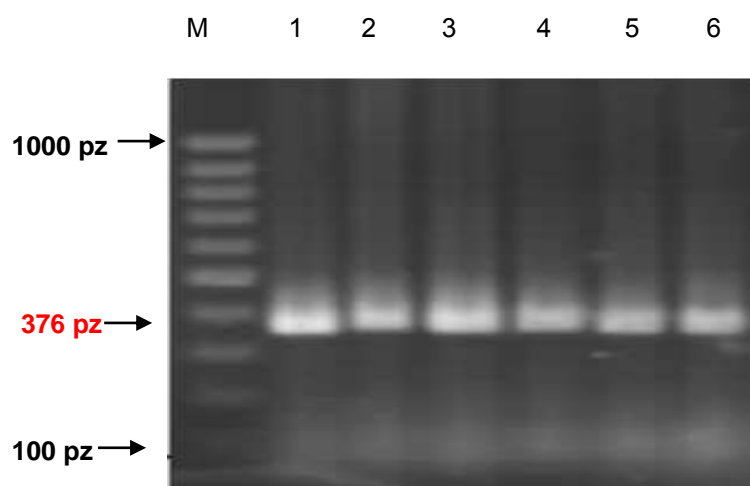
Rycina 23. Rozdział produktów reakcji *fnbA*-PCR w żelu agarozowym, *M*-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *fnbA*-PCR (1360 pz)- ścieżki 1, 5, 7, 8, 11; brak produktu- ścieżki 2-4, 6, 9, 10, 12-14



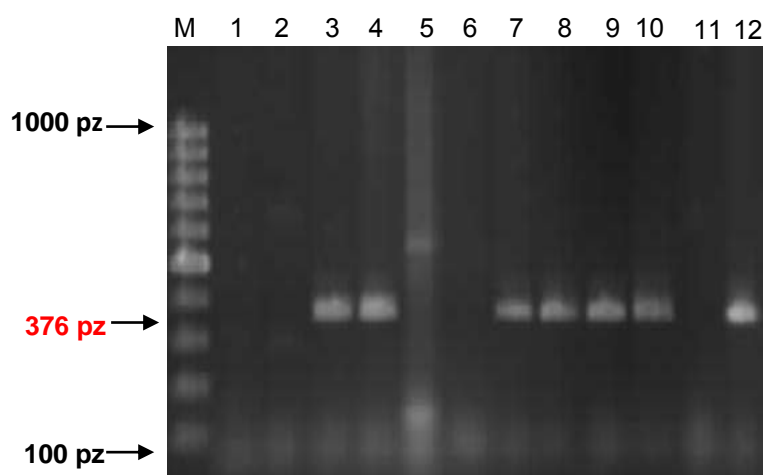
Rycina 24. Rozdział produktów reakcji **cna-PCR** w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji **cna-PCR** (1739 pz, 1179 pz, 619 pz)- ścieżki 1-3, 7-11; brak produktu- ścieżki 4-6



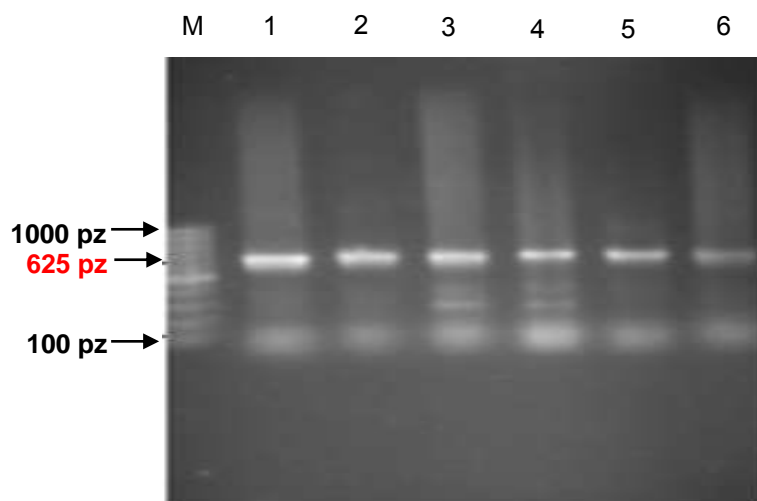
Rycina 25. Rozdział produktów reakcji **eta-PCR** w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji **eta-PCR** (190 pz)- ścieżki 1-10 i 12-14; brak produktu- ścieżka 11



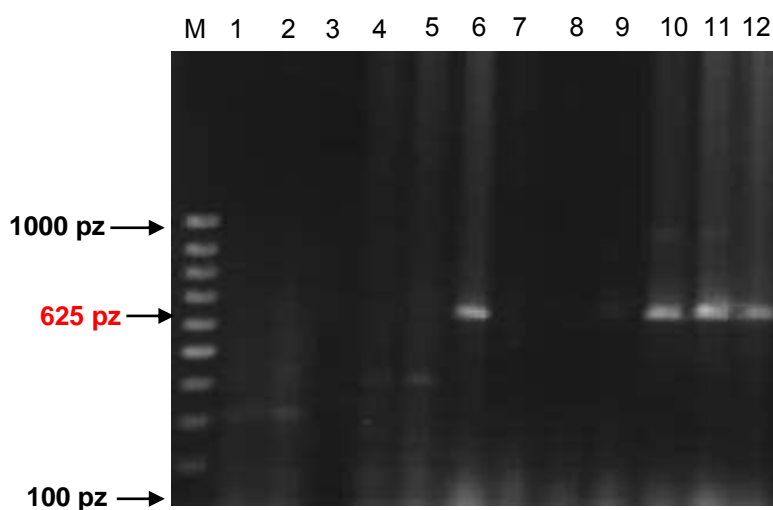
Rycina 26. Optimalizacja warunków reakcji *etdGRADIENT-PCR* w żelu agarozowym, *M*-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *etdGRADIENT-PCR* to 376 pz. Ścieżki 1-6 - gradient temperatur: 35°C; 36,7°C; 40,5°C; 46,7°C; 51,8°C; 55°C; najbardziej optymalna temperatura-35°C



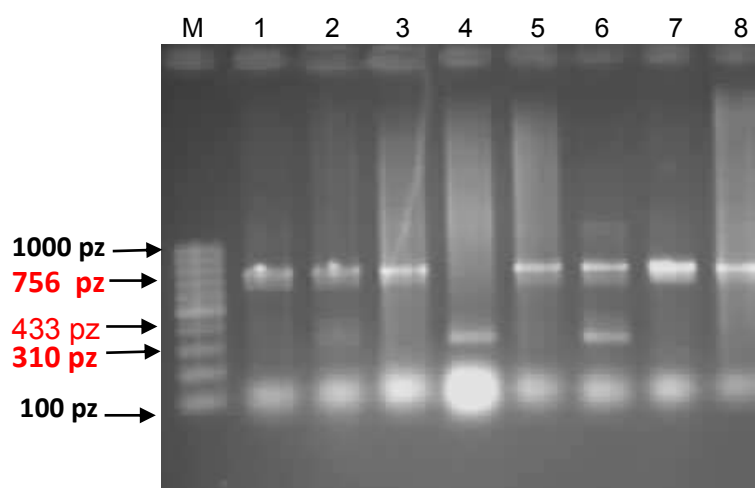
Rycina 27. Rozdział produktów reakcji *etd-PCR* w żelu agarozowym, *M*-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *etd-PCR* (376 pz)- ścieżki 3, 4, 7-10, 12; brak produktu- ścieżki 1, 2, 5, 6, 11



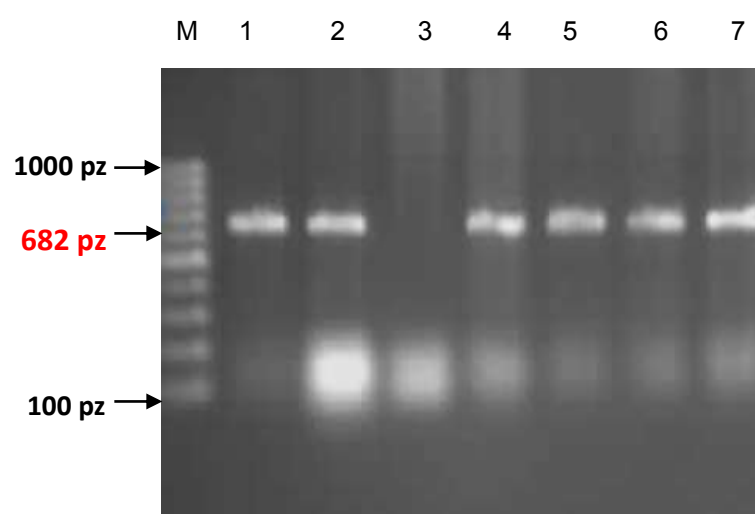
Rycina 28. Optymalizacja warunków reakcji *edinGRADIENT-PCR* w żelu agarozowym, *M*-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *edinGRADIENT-PCR* to 625 pz. Ścieżki 1-6 - gradient temperatur: 45°C 46,7°C; 50,5°C; 56,7°C; 61,8°C; 65°C; najbardziej optymalna temperatura- **46,7°C**



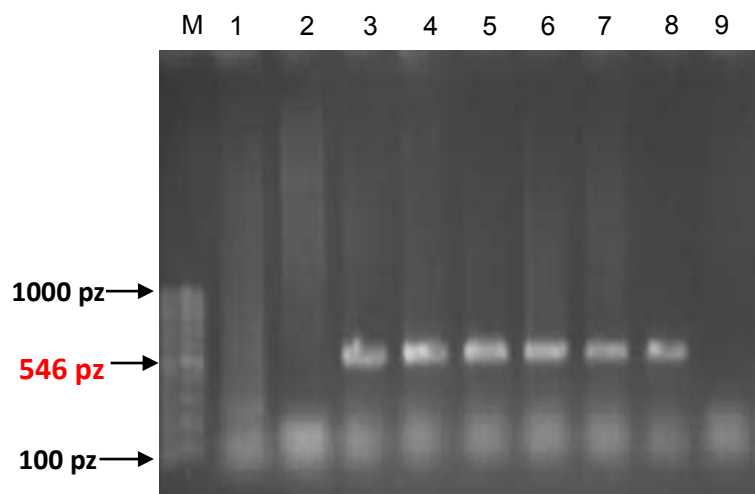
Rycina 29. Rozdział produktów reakcji *edin-PCR* w żelu agarozowym, *M*-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *edin-PCR* (625 pz) - ścieżki 6, 10-12; brak produktu - ścieżki 1-5, 7-9



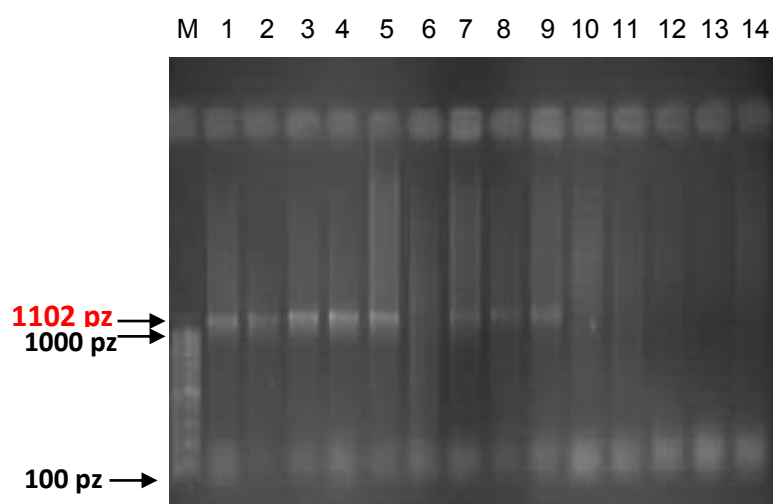
Rycina 30. Rozdział produktów reakcji *mecAStaphPVL-PCR* w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *mecAStaphPVL-PCR* to 310 pz, 433 pz, 756 pz. Ścieżki 4 i 6 – produkt genu *mecA*; ścieżki 1-3, 5-8- produkt genu *Staph756*



Rycina 31. Rozdział produktów reakcji *atIE-PCR* w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *atIE-PCR* (682 pz) - ścieżki 1, 2, 4-7; brak produktu - ścieżka 3



Rycina 32. Rozdział produktów reakcji *icaAB*-PCR w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *icaAB*-PCR (546 pz) - ścieżki 3-8; wynik negatywny - ścieżki 1, 2, 9



Rycina 33. Rozdział produktów reakcji *IS256*-PCR w żelu agarozowym, M-standard masy cząsteczkowej. Produkt reakcji *IS256*-PCR (1102 pz) - ścieżki 1-5, 7-9; brak produktu - ścieżki 6, 10-14

Załącznik 13. Obecność genów wirulencji u szczepów *S.aureus* pochodzących od osób chorych i zdrowych ochotników

SCNied.-stopa cukrzycowa niedokrwienna, SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna; W-wyskrobiny z dna owrzodzenia, S-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej

Nr pacjenta	Nr przypisany w trakcie badań	Rodzaj stopy cukrzycowej	Miejsce pobrania materiału do badań	MR SA	eta	fnbA	cna	mecA310	PVL	edin	etd
1	4/1	SCNeur.	W	-	+	+	-	+	-	-	+
2	5/1	SCNeur.	S	-	-	+	+	-	-	+	+
3	6/1	SCNeur.	MP	+	-	+	+	+	-	-	-
4	8/1	SCNeur.	S	+	-	+	+	+	-	-	-
5	9/1	SCNeur.	MP	+	-	+	+	-	-	-	-
6	13/1	SCNeur.	W	+	+	+	+	-	-	-	-
7	26/1	SCNeur.	W	-	-	+	+	-	-	+	+
8	27/1	SCNeur.	S	-	+	+	+	-	-	+	-
9	29/1	SCNeur.	W	+	+	+	+	+	-	+	-
10	39/1	SCNeur.	S	-	+	+	+	-	-	+	-
11	40/1	SCNeur.	MP	-	+	+	+	-	-	+	-
12	41/1	SCNied.	W	-	-	+	+	-	-	-	-
13	41/2	SCNied.	W	-	-	+	+	-	-	-	-
14	48/2	SCNeur.	S	-	-	-	+	-	-	-	-
15	49/1	SCNeur.	MP	+	-	-	+	-	-	-	+
16	49/2	SCNeur.	MP	+	-	+	+	+	-	-	+
17	50/1	SCNeur.	S	+	+	+	+	-	-	+	-
18	53/1	SCNeur.	S	-	-	-	+	-	-	-	+
19	54/1	SCNeur.	MP	-	-	+	+	-	-	-	-
20	55/1	SCNeur.	W	+	+	+	+	+	-	-	-
21	56/1	SCNeur.	S	+	+	+	+	+	-	-	-
22	57/1	SCNeur.	MP	+	-	-	+	+	-	-	+

23	61/1	SCNeur.	MP	+	-	-	+	+	-	-	-
24	67/2	SCNeur.	W	+	+	+	+	+	-	+	+
25	68/1	SCNeur.	MP	+	-	-	+	-	-	-	-
26	68/2	SCNeur.	MP	+	-	+	+	-	-	-	+
27	71/1	SCNied.	S	+	-	+	+	+	-	-	-
28	420/3	SCNied.	W	+	-	-	+	+	-	-	-
29	72/1	SCNied.	W	-	+	+	-	-	-	-	-
30	73/1	SCNied.	S	-	+	+	+	-	-	-	-
31	74/1	SCNied.	MP	+	-	-	+	+	-	-	+
32	83/1	SCNied.	W	+	-	-	+	+	-	-	-
33	84/1	SCNied.	S	+	-	-	-	+	-	-	-
34	91/2	SCNied.	W	+	+	+	+	+	-	+	+
35	95/1	SCNeur.	S	+	+	+	+	+	+	+	+
36	96/1	SCNeur.	MP	+	+	-	-	+	-	-	-
37	101/1	SCNeur.	W	-	-	-	-	-	-	-	-
38	102/1	SCNeur.	MP	-	-	+	+	-	-	-	-
39	103/1	SCNeur.	S	-	-	-	-	-	-	+	-
40	104/1	SCNeur.	W	-	-	+	+	-	-	+	-
41	105/1	SCNeur.	MP	-	-	-	+	-	-	-	-
42	112/1	SCNied.	S	+	-	-	+	+	-	-	-
43	118/1	SCNied.	S	-	+	+	+	-	-	-	-
44	119/1	SCNied.	W	-	+	+	+	-	-	+	-
45	120/1	SCNied.	MP	+	+	+	+	-	-	-	-
46	122/1	SCNeur.	W	-	-	+	+	-	-	-	-
47	124/1	SCNeur.	MP	-	-	-	+	-	-	-	-
48	125/1	SCNeur.	W	-	-	+	+	-	-	-	-
49	126/1	SCNeur.	S	-	-	-	+	-	-	-	-
50	127/1	SCNied.	S	-	-	-	+	-	-	-	+

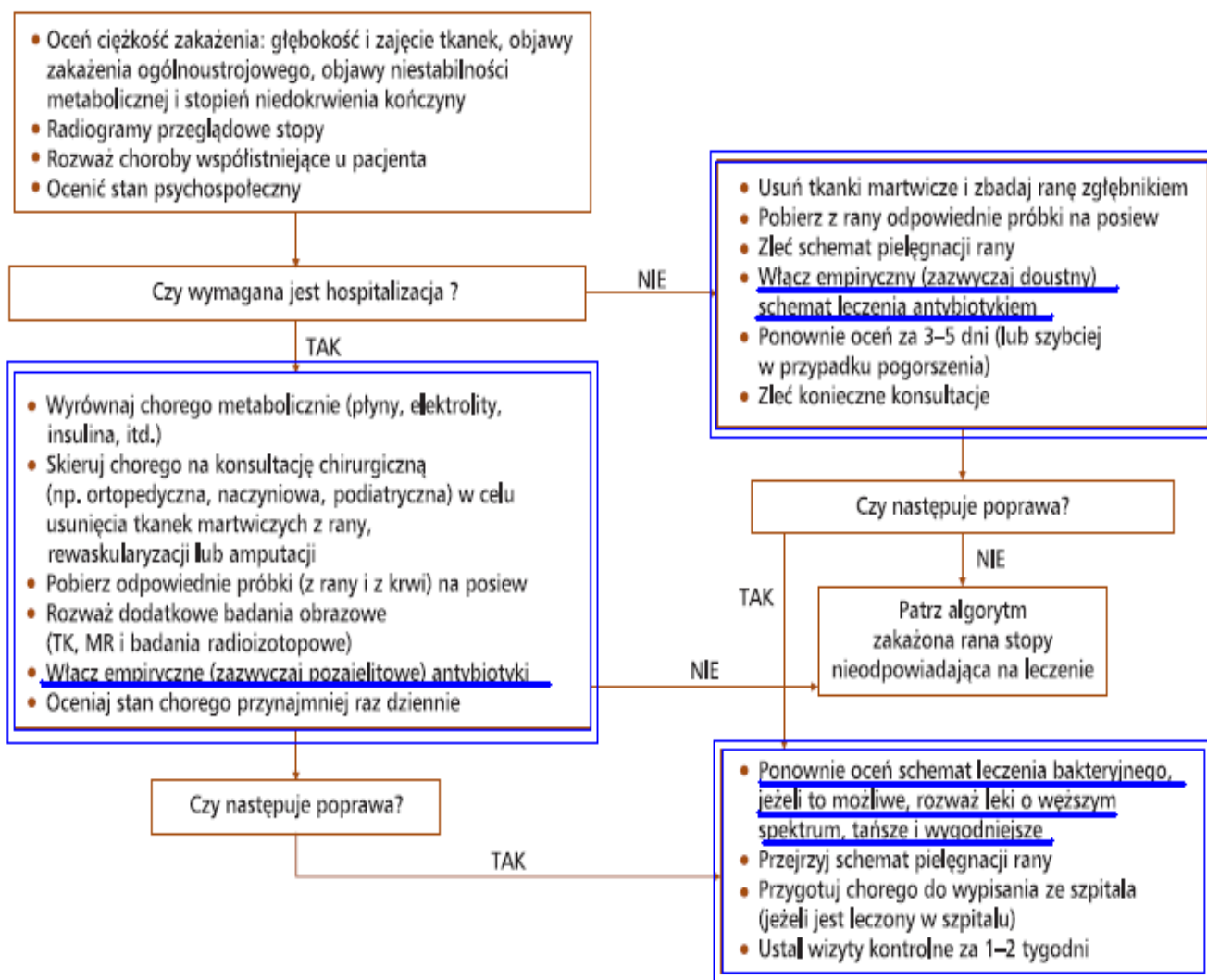
51	128/1	SCNied.	W	-	-	-	+	-	-	+	+	
52	129/1	SCNied.	MP	+	-	-	+	-	-	+	+	
53	134/1	SCNeur.	MP	-	-	-	+	-	-	+	-	
54	138/1	SCNeur.	S	-	-	+	+	-	-	-	+	
55	139/1	SCNeur.	W	-	+	+	+	+	-	+	+	
1	2/2	Zdrowi ochotnicy	MP	nie badano	+	-	-	-	-	-	+	
2	3/1				-	-	-	-	-	-	-	+
3	4/1				-	-	-	-	-	-	-	-
4	9/1				-	-	-	-	-	-	-	+
5	10/1				-	-	-	-	-	-	-	+
6	15/1				-	-	-	-	-	-	-	+
7	64/2				-	-	-	-	-	-	-	-
8	70/3				-	-	-	-	-	-	-	+
9	72/3				-	-	-	-	-	-	+	-
10	13/1				-	-	+	-	-	-	-	+

Załącznik 14. Obecność genów wirulencji u szczepów *S.epidermidis* pochodzących od osób chorych i zdrowych ochotników

SCNied.- stopa cukrzycowa niedokrwieną, SCNeur.- stopa cukrzycowa neuropatyczna;
W-wyskrobiny z dna owrzodzenia, S-biopsja skóry z brzegu owrzodzenia, MP-wymaz z powierzchni skóry z okolicy międzypalcowej

Nr pacjenta	Nr przypisany w trakcie badań	Rodzaj stopy cukrzycowej	Miejsce pobrania materiału do badań	M R S E	atIE	icaAB	IS256	mecA310
1	11/1	SCNeur.	MP	+	+	+	+	-
2	12/1	SCNeur.	S	+	+	+	+	+
3	16/1	SCNied.	S	+	+	+	+	+
4	17/1	SCNied.	W	+	+	+	+	-
5	18/1	SCNied.	MP	+	+	+	+	+
6	39/2	SCNeur.	S	+	+	+	+	-
7	40/2	SCNeur.	MP	+	+	+	+	-
8	42/1	SCNied.	W	+	+	+	+	+
9	47/1	SCNeur.	W	-	+	+	+	-
10	48/1	SCNeur.	S	+	+	+	+	-
11	60/1	SCNied.	MP	+	+	+	+	-
12	61/2	SCNeur.	MP	+	+	+	+	-
13	70/1	SCNied.	MP	+	+	+	-	+
14	420/2	SCNied.	W	+	+	+	+	+
15	78/1	SCNied.	W	+	+	+	+	+
16	79/1	SCNied.	MP	+	+	+	-	+
17	87/1	SCNeur.	MP	+	+	+	-	+
18	90/1	SCNied.	MP	-	+	+	-	-
19	137/1	SCNied.	MP	+	-	+	-	+
20	140/1	SCNeur.	MP	+	-	+	-	-
1	K1	Zdrowi ochotnicy	MP	nie badano	+	+	-	-
2	K2		MP		+	+	-	-
3	K3		MP		+	+	-	-

Załącznik 15. Algorytm postępowania w przypadku zakażonej stopy cukrzycowej [wg 74]



Podkreślone fragmenty tekstu dotyczą obszarów postępowania terapeutycznego, w których istotne może okazać się zbadanie obecności genów wirulencji