

## Το Μικροβίωμα στο Διαβητικό Πόδι

**Μ. Δημητρίου<sup>1</sup>, Ν. Παπάνας<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Μικροβιολογικό Εργαστήριο Ε.Α.Ν.Π. ΜΕΤΑΞΑ

<sup>2</sup> Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ιατρείο Διαβητικού Ποδιού, Διαβητολογικό Κέντρο, Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Π.Γ.Ν.Α



**Μαρία Δημητρίου**

Υπεύθυνη αλληλογραφίας

**Μαρία Δημητρίου**

Γρηγορίου Λαμπράκη 138 Πειραιάς, Τ.Κ. 18535

**Τηλ. επικοινωνίας: +30 6946421807**

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διαβητικό πόδι αποτελεί μία από τις συχνότερες και δυσκολότερες στην αντιμετώπιση επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη, η οποία επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Ιδιαίτερως τα χρόνια έλκη επιδρούν αρνητικά στην καθημερινότητα των ασθενών πολύ περισσότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες επιπλοκές. Ένα έλκος επιπλεγμένο με λοίμωξη, αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα και ορθά, θα οδηγήσει με ακρίβεια στην απώλεια του άκρου. Ο ακρωτηριασμός αποτελεί την ύστατη ιατρική λύση αυξάνοντας κατακόρυφα το κόστος περίθαλψης καθιστώντας τον ασθενή ανάπηρο. Δυστυχώς ακόμα υπάρχει ελάχιστη κατανόηση της οικολογίας τέτοιων λοιμώξεων και έτσι ο τρόπος διαχείρισής τους καθυστερεί την επούλωση. Τα τελευταία χρόνια η ιατρική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της στο μικροβίωμα και το ρόλο του στην εξέλιξη διαφόρων νοσημάτων. Παρόλα αυτά, το μικροβίωμα του δέρματος μόλις πολύ πρόσφατα άρχισε να απασχολεί την ερευνητική κοινότητα προκειμένου να συσχετιστεί με την έκβαση ενός έλκους διαβητικού ποδιού. Άλλωστε, η συνεχής μεταβολή των παροδικών αποικιστών της δερματικής επιφάνειας καθώς και οι μηχανισμοί επικοινωνίας μεταξύ αυτών και του ξενιστή χρήζουν επιμελούς διερεύνησης. Η παρούσα βραχεία ανασκόπηση συζητά το ρόλο του μικροβιώματος του δέρματος, τη σημασία της ποικιλομορφίας του μικροβιακού πληθυσμού καθώς και την εμπλοκή του στη λοίμωξη και εξέλιξη του έλκους του διαβητικού ποδιού. Γίνεται επίσης καταγραφή και ερμηνεία των νέων τεχνικών απομόνωσης των μικροβίων.

**Λέξεις-κλειδιά:** διαβητικό πόδι, μικροβίωμα, λοιμώξεις, καλλιέργειες, μοριακές τεχνικές

### The microbiome of diabetic foot

**M. Demetriou<sup>1</sup>, N. Papanas<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Microbiology Laboratory, Anticancer Hospital of Piraeus Metaxa

<sup>2</sup> Diabetic Foot Clinic, Diabetes Centre, Second Department of Internal Medicine, Democritus University of Thrace, University Hospital of Alexandroupolis

## SUMMARY

Diabetic foot is one of the most common and most difficult to treat complications of diabetes, which negatively affects patients' quality of life. Especially chronic ulcers have a much worse impact on patients' daily life than the other complications. If not treated in a timely manner and correctly, an ulcer complicated with infection may lead to limb loss. Amputation is the last medical solution; it increases the cost of medical care and incapacitates the patient. Unfortunately, there is still little understanding of the ecology of such infections, and so their current management delays healing. In recent years, the medical community has turned its attention to the microbiome and its role in the development of various diseases. However, skin microbiome has only recently begun to attract interest in association with the outcomes of diabetic foot ulcers. Moreover, the continuous change of the transient colonists of the skin surface, as well as the communication mechanisms between them and the host, need meticulous investigation. This brief review discusses the role of skin microbiome, the importance of microbial population diversity, as well as its involvement in infection and progression of diabetic foot ulcers. Additionally, new microbial isolation techniques are presented and interpreted.

**Key words:** diabetic foot, microbiome, infections, cultures, molecular techniques

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λοιμώξεις αποτελούσαν πάντα ένα τεράστιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Όταν όμως οι λοιμώξεις επιπλέκουν χρόνια νοσήματα τότε το πρόβλημα μεγιστοποιείται. Οι χρόνιες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των ελκών που χρονίζουν, αποτελούν το 60-80% όλων των ανθρώπινων λοιμώξεων<sup>1</sup>. Το κόστος αυτών των χρόνιων λοιμώξεων στερεί ένα μεγάλο ποσό από τον κρατικό προϋπολογισμό που προορίζεται για την υγεία<sup>2</sup>. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ένα χρόνιο νόσημα το οποίο στις μέρες μας έχει πάρει διαστάσεις επιδημίας<sup>3</sup>. Μία από τις κυριότερες και πιο δύσκολες στην αντιμετώπιση επιπλοκές είναι αυτή του διαβητικού ποδιού<sup>3-4</sup>. Το διαβητικό πόδι άλλωστε αποτελεί το αίτιο του 40-60% των μη τραυματικών ακρωτηριασμών του κάτω άκρου<sup>4,5</sup>. Ενδεικτικό της σοβαρότητας του προβλήματος είναι το εντυπωσιακό νούμερο ακρωτηριασμών λόγω διαβήτη που λαμβάνει χώρα στις ΗΠΑ και αυτό είναι πάνω από 80.000 ετησίως τη στιγμή που και στο Ηνωμένο Βασίλειο πραγματοποιούνται πάνω από εκατό ακρωτηριασμοί κάθε εβδομάδα σε διαβητικούς ασθενείς<sup>6,7</sup>. Τα λίγα μέχρι πρότινος μικροβιολογικά δεδομένα, σχετικά με τα αληθινά αίτια των λοιμώξεων του διαβητικού ποδιού καθώς και τα περιορισμένα δεδομένα σχετικά με το εύρος της φυσιολογικής χλωρίδας και των παροδικών αποικιστών του δέρματος δε βοήθησαν επαρκώς στην ουσιαστική αντιμετώπιση του διαβητικού ποδιού. Παραδοσιακά οι

μικροβιολογικές μελέτες των ελκών διαβητικού ποδιού αναλώθηκαν στο ρόλο των εύκολων στην απομόνωση και ταυτοποίηση μικροβιακών στελεχών όπως είναι ο *Staphylococcus aureus* και η *Pseudomonas aeruginosa*<sup>8</sup>. Χωρίς να υποτιμάται ο ρόλος των συγκεκριμένων βακτηρίων αποδείχτηκε ότι το ζήτημα ήταν αρκετά πιο πολύπλοκο. Η αυξημένη βακτηριακή ποικιλομορφία φαίνεται να σχετίζεται με τη δημιουργία βιομεμβράνης. Ακόμη και μικροβιακά στελέχη τα οποία συνήθως δεν είναι παθογόνα, ή είναι χαμηλής λοιμογόνου δύναμης ώστε να συντηρηθούν από μόνα τους μία χρόνια λοίμωξη, μπορεί να συσσωρευτούν συμβιωτικά εντός αυτής της βιομεμβράνης και να οδηγούν τελικά σε χρόνια λοίμωξη. Αγνοώντας αυτά τα δεδομένα μέχρι πρότινος, καταναλώθηκαν τόνοι αντιβιοτικών και υπήρξε δυσκολία στην επιτυχή έκβαση κυρίως επιπλεγμένων λοιμώξεων που χρόνιζαν με δυσάρεστα τελικά αποτελέσματα<sup>9</sup>. Ωστόσο, η αλματώδης ανάπτυξη της κλινικής μικροβιολογίας, της βιοτεχνολογίας και της βιοπληροφορικής τα τελευταία έτη, με την εισαγωγή νέων και γρήγορων μοριακών τεχνικών στην ταυτοποίηση και παρατήρηση των παθογόνων φαίνεται να οδηγεί στην αυγή μια νέας εποχής δίνοντας απαντήσεις και λύνοντας μυστήρια<sup>9</sup>. Η στροφή των επιστημόνων στο μικροβίωμα και τον πρωταγωνιστικό ρόλο που φαίνεται να παίζει από τις πρώτες κιόλας μελέτες καθώς και η χρήση ολοένα περισσότερο ειδικών μοριακών μοντέλων, δίνουν τη δυνατότητα να ταυτοποιηθούν τα υπεύθυνα βα-

κτήρια γρηγορότερα, ευνοώντας την έγκαιρη αξιολόγηση, την εφαρμογή ειδικής αγωγής και τη επανεκτίμηση της κατάστασης σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα.

## 2. ΤΟ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

Το ανθρώπινο δερματικό μικροβίωμα έχει χαρακτηριστεί ως το «μικροβιακό αποτύπωμα» του κάθε ανθρώπου λόγω των διαφορών που εμφανίζει στον καθένα<sup>10</sup>. Όταν αναφερόμαστε όμως σε αυτό, δεν εννοούμε μόνο το σύνολο των μικροβίων της επιδερμίδας, αλλά και το μικροβιακό πληθυσμό στις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος. Παρά τις διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στον καθένα ξεχωριστά, το δερματικό μικροβίωμα μπορεί να είναι εντυπωσιακά παρόμοιο από άτομο σε άτομο. Η διαφορά στον μικροβιακό πληθυσμό βρίσκεται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα του δέρματος (επιδερμίδα), σε σχέση με το ιδίως δέρμα (χόριο) και την υποδερμίδα. Το μικροβιακό φορτίο της επιδερμίδας είναι περισσότερο δυναμικό και μεταβάλλεται συχνότερα σε σχέση με την πιο σταθερή μικροβιακή κοινότητα του χορίου<sup>10</sup>. Αυτό άλλωστε υποδηλώνει και τη σημασία της λήψης υλικού από τις βαθύτερες στιβάδες του έλκους και όχι επιφανειακά. Το δερματικό μικροβίωμα της επιδερμίδας δεν παραμένει σταθερό αλλά επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, ο τρόπος ζωής, η ανατομική περιοχή, η γενετική προδιάθεση, η ύπαρξη διαβήτη, η κακή γλυκαιμική ρύθμιση κ.α. Η επικρατούσα μικροβιακή δερματική κοινότητα είναι μοναδική σε σύνθεση και λειτουργία. Έρχεται δε άμεσα σε επαφή με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Αυτή η επικοινωνία σε επίπεδο μικροπεριβάλλοντος με τις συνεχείς προσαρμοστικές αλλαγές του μικροβιακού πληθυσμού είναι αντικείμενο τρεχουσών μελετών και μπορεί να διαφωτίσει τον ιατρικό κόσμο σε σχέση με τις λοιμώξεις των ελκών του διαβητικού ποδιού και ειδικά τις χρόνιες<sup>10</sup>. Οι μελέτες πάνω στο δερματικό μικροβίωμα σε σχέση με τα έλκη διαβητικού ποδιού, θα πρέπει να απαντήσουν σε 3 βασικά ερωτήματα. Ποιο είναι το μικροβιακό φορτίο σε κάθε περίπτωση λοίμωξης, ποια η μικροβιακή ποικιλότητα (μικροβιακό ρεπερτόριο) που εμπλέκεται και ποια είναι τα παθογόνα στελέχη που τελικά ευθύνονται για την εξέλιξη σε λοίμωξη και την μετάπτωση σε χρόνια λοίμωξη. Τα μέχρι πρότινος δεδομένα σε σχέση με τα παθογόνα στα επιπλεγμένα με λοίμωξη έλκη καταδεικνύουν την εμπλοκή κυρίως αερόβιων θετικών κατά gram κόκκων, με τους σταφυλοκόκκους και τους στρεπτοκόκκους να είναι τα κυρίαρχα παθογόνα<sup>11</sup>. Ειδικά ο *S. aureus* δεδομένων και των θεραπευτικών προβλημάτων που προκαλεί, είναι το πιο καλά μελετημένο παθογόνο<sup>11</sup>. Επικρατεί κυρίως

στα οξέα έλκη τα οποία είναι συνήθως μονομικροβιακής αιτιολογίας<sup>11</sup>. Σε χρόνια έλκη η λοίμωξη είναι πολυμικροβιακής αιτιολογίας με κυρίαρχα παθογόνα τους θετικούς κατά gram κόκκους (*S. aureus*), τα αρνητικά κατά gram βακτήρια όπως εντεροβακτηριακά (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*) και αζυμωτικά (*P. aeruginosa*) καθώς και αναερόβια (*Bacteroides*)<sup>12</sup>. Τα ευρήματα αυτά αφορούν μελέτες που έχουν γίνει με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές της καλλιέργειας. Με τη μέθοδο αυτή όμως υποεκτιμήθηκαν κάποια μικρόβια έναντι κάποιων άλλων. Συγκεκριμένα είχαμε μια επικράτηση του γένους των *Staphylococcus spp.* έναντι των *Propionibacterium spp.* και των *Corynebacterium spp.* Προκειμένου να μετριάσει αυτή η κατάσταση εφαρμόστηκαν από ερευνητές σύγχρονες τεχνικές και συγκρίθηκαν τα δεδομένα<sup>13</sup>.

## 3. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ-ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

### 3.1 Λήψη δείγματος με βαμβακοφόρο στυλεό για διενέργεια απλής καλλιέργειας

Ο πιο ευρέως διαδεδομένος τρόπος λήψης υλικού προς διερεύνηση παθογόνων είναι ο βαμβακοφόρος στυλεός. Πρόκειται για την πιο εύκολη μη επεμβατική και φτηνή μέθοδο. Ακόμη και στις μέρες μας αποτελεί την πιο συνηθισμένη τακτική<sup>14</sup>. Απαραίτητες προϋποθέσεις για τη λήψη καλλιέργειας είναι αρχικά η κλινική διάγνωση λοίμωξης του έλκους. Η διάγνωση κατευθύνεται από την ύπαρξη ενός ή παραπάνω από τα κλασικά σημεία λοίμωξης: ερύθημα, οίδημα, πυώδης έκκριση. Εν συνεχεία ακολουθεί μικροβιολογικά ορθός τρόπος λήψης σύμφωνα με τις κατευθυντήριες μικροβιολογικές οδηγίες οι οποίες ωστόσο αναφέρουν ρητά την χαμηλής αξίας καλλιεργητικό αποτέλεσμα. Δείγμα λαμβάνεται από το τραύμα κατόπιν καθαρισμού με φυσιολογικό ορό. Ο στυλεός πρέπει να περιστραφεί πέντε φορές στην επιφάνεια του έλκους με έμφαση στα σημεία τα οποία έχουν εμφανή σημεία φλεγμονής<sup>15</sup>. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος του βαμβακοφόρου στυλεού προς διενέργεια απλής καλλιέργειας τραύματος δεν είναι αξιόπιστη και χρειάζεται μεγάλη εμπειρία ως προς την ερμηνεία της. Το μεγαλύτερο πρόβλημα έγκειται στα ψευδώς θετικά απομονωθέντα, τα οποία είναι φυσιολογική χλωρίδα ή παροδικοί αποικιστές<sup>16</sup>. Έτσι οι καλλιέργειες στυλεού έχουν υψηλή ευαισθησία και αρνητική προγνωστική αξία<sup>16</sup>. Με άλλα λόγια οι αρνητικές καλλιέργειες είναι χρήσιμες στο να αποκλείσουν τη λοίμωξη από κάποιο παθογόνο<sup>16</sup>. Οι θετι-

κές καλλιέργειες όμως δεν εξασφαλίζουν την απομόνωση του αληθινού παθογόνου λόγω των εντυπωσιακά χαμηλών ποσοστών ειδικότητας της μεθόδου. Αυτό συμβαίνει διότι όπως αναφέρθηκε και παραπάνω απομονώνονται και η φυσιολογική χλωρίδα αλλά και οι παροδικοί αποικισμοί<sup>16</sup>.

### 3.2. Λήψη ιστοτεμαχίου προς διενέργεια ποσοτικής ιστοικής καλλιέργειας

Ο χρυσός κανόνας λήψης καλλιέργειας τραύματος σύμφωνα με τα μικροβιολογικά πρωτόκολλα, είναι η λήψη ιστοικού τεμαχίου, προς διενέργεια ποσοτικής ιστοικής καλλιέργειας<sup>15</sup>. Κατά τη διαδικασία αυτή αφού προηγηθεί νεαροποίηση των προσβεβλημένων ιστών, συλλέγεται ιστός μεγέθους τουλάχιστον 1-2 cm (με στόχο την απόδοση περίπου 500 mg ιστού). Απαιτείται άμεση μεταφορά στο εργαστήριο σε κλειστό αποστειρωμένο περιέκτη<sup>16</sup>. Η παρουσία υψηλού αριθμού βακτηρίων δηλαδή άνω των 10<sup>5</sup> αποικιών ανά γραμμάριο ιστού, είναι αποδεικτική της απομόνωσης των αληθινών παθογόνων που ευθύνονται για τη λοίμωξη<sup>17</sup>. Νεότερα δεδομένα καταδεικνύουν πως ακόμα και αυτή η μέθοδος που θεωρείται εκλογής για την αποκάλυψη των αιτιοπαθογόνων είναι εκτός από χρονοβόρα και κοπιαστική, περιορισμένων δυνατοτήτων. Πέραν του χρόνου που απαιτείται για την επώαση, την απομόνωση και τον έλεγχο της ευαισθησίας που αποβαίνει εις βάρος της έναρξης στοχευμένης αντιμικροβιακής θεραπείας, είναι δυνατόν να απομονωθούν λιγότεροι από τους αληθείς μικροοργανισμούς που βρίσκονται πραγματικά στο δείγμα<sup>17,18,19</sup>. Μελέτες που έχουν γίνει πάνω στο ανθρώπινο μικροβίωμα έδειξαν ότι μόνο το 30% αυτού έχει καλλιεργηθεί μέχρι τώρα<sup>20</sup>. Επιπλέον βακτήρια τα οποία βρίσκονται σε χαμηλό φορτίο είναι αδύνατον να απομονωθούν στην κλασική καλλιέργεια λόγω βακτηριακής υπερανάπτυξης αυτών που υπερέρχουν σε συγκέντρωση<sup>21,22</sup>.

## 4. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι σύγχρονες τεχνικές είναι χρήσιμα εργαλεία που μπηγαν στο εργαστήριο μόλις τα τελευταία χρόνια με την αλματώδη ανάπτυξη της βιοπληροφορικής και της βιοτεχνολογίας<sup>22</sup>.

### 4.1. Culturomics

Η εξέλιξη σε επίπεδο καλλιέργειας είναι το culturomics. Κάποιοι μικροοργανισμοί είναι πιο απαιτητικοί και χρειάζονται ιδιαίτερες συνθήκες καλλιέργειας για να αναπτυχθούν και συγκεκριμένους τροφικούς παράγοντες<sup>23</sup>. Με την εισαγωγή στα σύγχρονα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια των λεγόμενων έξυπνων επωαστικών κλιβάνων όπως το MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/

ionization time-of-flight), αυξάνεται η δυνατότητα απομόνωσης μεγαλύτερης ποικιλότητας μικροβίων που εμπλέκονται σε λοίμωξη, σε λιγότερο χρόνο και με μεγαλύτερη ακρίβεια. Αυτό βρήκε εφαρμογή και στη διερεύνηση της μικροχλωρίδας στο διαβητικό πόδι<sup>24</sup>. Πιο συγκεκριμένα σε μελέτη νοσηλευόμενων ασθενών με λοίμωξη έλκους διαβητικού ποδιού αναλύθηκε το μικροβιακό φορτίο με τη χρήση culturomics. Μετά την προκαταρκτική ταυτοποίηση με το MALDI-TOF ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση με την τεχνολογία του 16S rRNA<sup>24</sup>. Κάπου εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι γενικά η συγκεκριμένη τεχνολογία βοήθησε στη σύγκριση του ανθρώπινου μικροβιώματος μεταξύ υγιών και μη ατόμων. Ωστόσο δεν κατάφερε να απαντήσει σε ένα πυρηνικό ερώτημα. Στο κατά πόσο οι διαφορές που παρατηρούνται στο μικροβίωμα αποτελούν το αίτιο ή είναι το αποτέλεσμα της νόσου<sup>22</sup>. Στη συνέχεια παρακολουθήθηκε η πρόοδος του έλκους και έγινε συσχέτιση διαφόρων παραμέτρων. Μεταξύ αυτών ήταν η παρουσία συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών και η απουσία άλλων. Τα πιο συχνά μικρόβια ήταν και πάλι οι gramθετικοί αερόβιοι κόκκοι, ακολουθούμενοι από αερόβια gram αρνητικά βακτήρια και τέλος υποχρεωτικώς αναερόβια βακτήρια. Ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν μικροβιακή ποικιλομορφία και μάλιστα επικράτηση στελεχών όπως πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων (*S. lugdunensis*, *S. epidermis*) και κάποιων συγκεκριμένων μικροβίων όπως *E. cloacae*, *P. mirabilis* και *E. faecalis* σχετίστηκαν με καλύτερη έκβαση του έλκους<sup>24</sup>. Όσον αφορά στον *S. lugdunensis* αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί γνωρίζοντας ότι παράγει το ένζυμο lugdunin, το οποίο έχει βρεθεί ότι μειώνει σημαντικά τη φορεία του *S. aureus*<sup>24</sup>. Αντιθέτως η παρουσία των μικροβιακών στελεχών *S. aureus* και *Fingoldia magna* (θετικός κατά gram αναερόβιος κόκκος), σχετίστηκαν με χειρότερη πορεία. Επιπλέον σε βάθος επανελέγχου ενός μηνός βρέθηκε ότι η παρουσία *Enterococcus faecalis* σχετιζόταν σημαντικά με βελτίωση του έλκους. Αντίστοιχα φάνηκε ότι η συνύπαρξη ορισμένων συνδυασμών μικροβιακών στελεχών είχε καλύτερη έκβαση σε σχέση με άλλους<sup>24</sup>. Επιπλέον παρατηρήθηκαν στελέχη τα οποία αποτελούν μέρος του μικροβιώματος του εντέρου. Αυτά αποτελούσαν την πλειονότητα των απομονωθέντων. Ένα μικρότερο ποσοστό δεν είχε εμφανιστεί ξανά στις κλασικές τεχνικές ενώ ταυτοποιήθηκαν και 5 νέα είδη μικροβιακών στελεχών<sup>24</sup>. Τέλος φάνηκε ότι το μικροβίωμα του έλκους ακόμη και χωρίς λοίμωξη είναι δυναμικό και διαμορφώνεται συνεχώς καθώς αλλάζουν οι επικρατούσες συνθήκες (έκταση, βάθος, διάρκεια διαβήτη, ύπαρξη φιλούμενου έλκους και ανατομική περιοχή στην οποία εδράζεται)<sup>24</sup>.

## 4.2 Ταξινόμηση βακτηρίων με την υπομονάδα 16S ριβοσωματικού RNA

Το σύστημα ταξινόμησης 16S rRNA αποτελείται από 1500 βάσεις νουκλεοτιδίων οι οποίες είναι κοινές σε όλα τα βακτήρια. Επιπλέον περιλαμβάνει και 9 μεταβλητές περιοχές οι οποίες είναι διαφορετικές και χρησιμεύουν στην ταυτοποίηση και διαχωρισμό των βακτηρίων<sup>22</sup>. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί ένα μικρόβιο ακολουθεί η σύγκριση των αλληλουχιών του με αλληλουχίες αναφοράς αποθηκευμένες σε βάσεις δεδομένων. Για τη σύγκριση του «μικροβιακού ρεπερτορίου» όπως δηλαδή στην περίπτωση του δερματικού και όχι μόνο ανθρώπινου μικροβιώματος, οι ερευνητές ελέγχουν τις συνολικές διαφορές στη σύνθεση των μικροβίων της κοινότητας<sup>22</sup>. Αυτό που φάνηκε με τη βοήθεια του συστήματος 16S rRNA είναι μια πιο ευρεία κοινότητα βακτηρίων από τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας. Η μελέτη του Gardner και συνεργατών είναι αποκαλυπτική για τις διαφορές στον επικρατούντα πληθυσμό μικροβίων μεταξύ των κλασικών καλλιέργειών και των νέων τεχνικών. Κατά τη μελέτη συγκρίθηκαν τα απομονωθέντα μικροβιακά στελέχη από ασθενείς με πολύ συγκεκριμένα κριτήρια όπως αυστηρώς νευροπαθητικά έλκη χωρίς λοίμωξη με την τεχνική της κλασικής ιστικής καλλιέργειας και την τεχνική 16S rRNA<sup>19</sup>. Προφανώς ο κανόνας της καλλιέργειας ελκών μόνο επιπλεγμένων με λοίμωξη εδώ παρακάμπτεται αυστηρά και μόνο για ερευνητικούς σκοπούς, για τον έλεγχο του μικροβιώματος αυτών. Με την ανεξάρτητη της καλλιέργειας τεχνική φάνηκε ότι οι υποχρεωτικώς αναερόβιοι μικροοργανισμοί είναι διπλάσιοι και αυτό κλινικά μεταφράζεται σε μελλοντικά δυσχερή αντιμετώπιση της επερχόμενης λοίμωξης λόγω της υψηλής λοιμογονικότητάς τους<sup>19</sup>. Σε μεγάλη αναδρομική μελέτη (910 ελκών) όπου έγινε χρήση της τεχνικής 16S rRNA τα πιο άφθονα μείζονα φύλα μικροβίων που απομονώθηκαν ανήκαν στα Firmicutes (64%), ακολουθούμενα από Proteobacteria (26%), Actinobacteria (9.6%) και Bacteroidetes (1%)<sup>26</sup>. Ο *Staphylococcus* ήταν παρόν σε 31% ελκών με επικράτηση του *S. aureus* σε ποσοστό 48% και *S. epidermidis* σε ποσοστό 35%<sup>26</sup>.

## 4.3 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing)

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) είναι μια νέα τεχνολογία με τη βοήθεια της οποίας γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός αλληλουχιών του DNA. Επιπλέον όταν ένας μεγάλος αριθμός τμημάτων του DNA μπορεί να αλληλουχιθεί ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση τότε μιλάμε για τη λεγόμενη μαζική, παράλληλη αλληλούχιση ή

πυροαλληλούχιση (pyrosequencing)<sup>22</sup>. Οι τεχνικές αυτές εξελίσσονται πλέον τόσο ραγδαία που ήδη η πυροαλληλούχιση είναι η παλαιότερη από τις νέες αυτές τεχνικές. Όσο πιο πρόσφατη η συσκευή αλληλούχισης τόσο πιο μεγάλη είναι η απόδοση στον προσδιορισμό του DNA<sup>22</sup>. Σε μελέτη ασθενών με επιπλεγμένο με λοίμωξη έλκος διαβητικού ποδιού έγινε λήψη ιστοτεμαχίων προς διενέργεια ποσοτικής ιστικής καλλιέργειας και παράλληλα σύγκριση με την τεχνολογία της αλληλούχισης DNA. Αναλύθηκαν τόσο τα μικροβιολογικά δεδομένα όσο και η κλινική έκβαση του έλκους. Αυτό που φάνηκε ήταν ότι η διάρκεια του έλκους προ της εμφάνισης λοίμωξης είναι χρήσιμη στην επιλογή αντιμικροβιακού σχήματος<sup>26</sup>. Ο *Staphylococcus* spp. αναδεικνύεται και πάλι το πιο συχνά απομονωθέν βακτήριο με παρουσία σε σχεδόν ένα τρίτο των υπό μελέτη περιπτώσεων, ακολουθούμενος από το *Corynebacterium* spp. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανασκόπηση της σύγχρονης βιβλιογραφίας ασχέτως ταυτοποιητικής προσέγγισης (μοριακής ή κλασικής καλλιεργητικής) όπου διαπιστώνεται ότι το κυρίαρχο παθογόνο είναι ο *S. aureus*<sup>27</sup>. Τα υπόλοιπα κυρίαρχα παθογόνα είναι το *Corynebacterium* spp., ο *Streptococcus* spp., και τα αναερόβια της οικογένειας Clostridiales<sup>26</sup>. Αυτά ωστόσο εμφανίζονται κυρίως στα πλαίσια πολυμικροβιακής λοίμωξης και επιπλέον τα πιο πολλά αντιβιοτικά πρώτης γραμμής είναι δραστικά και σε αυτά<sup>26</sup>.

## 4.4 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Η μεταγονιδιωματική είναι η ανάλυση της γονιδιακής σύστασης μιας κοινότητας μικροβίων με τη βοήθεια υπολογιστικών μεθόδων οι οποίες επιτρέπουν την ανάγνωση των γονιδίων των παθογόνων<sup>22</sup>. Η εποχή της μεταγονιδιωματικής μπορεί να αποκαλύψει ποια γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμογόνο δράση των μικροβίων ενώ απαντά σε ερωτήματα όπως ποια είδη μικροβίων επικρατούν στη μικροχλωρίδα μιας περιοχής αλλά και σε τι ποσότητα<sup>22</sup>. Η εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας στο διαβητικό πόδι μπορεί να επιτρέψει μια πιο λεπτομερή εικόνα των μικροοργανισμών που επικρατούν, αλλά κυρίως «τι είναι ικανοί να προκαλέσουν» καθώς και «ποιοι» μικροοργανισμός προκαλεί «τι». Επιπλέον μπορούν να ταυτοποιηθούν αλληλουχίες κωδικοποίησης πρωτεϊνών από τις οποίες μπορούν να συναχθούν οι βιολογικές λειτουργίες του μικροβίου όπως η παθογένεια, η μολυσματικότητα, η ευαισθησία στα αντιβιοτικά και διάφορες μεταβολικές οδοί. Δεδομένα που απαιτούνται για την κατανόηση λειτουργιών υψηλού επιπέδου<sup>28</sup>. Η τεχνική της μεταγονιδιωματικής, έχει τη δυνατότητα να αποκαλύψει κλινικά σημαντι-

κούς βιοδείκτες. Αυτοί έχουν συγκεκριμένο ρόλο στην επούλωση του έλκους καθώς και στην εξέλιξη των επιπλοκών. Έτσι σε μελέτη 100 χρόνιων νευροπαθητικών ελκών χωρίς λοίμωξη με την τεχνική της μεταγονιδιωμικής φάνηκαν τα εξής όσον αφορά στο μικροβίωμα των ελκών. Τα στελέχη του *S. aureus* είναι σαφώς παρόντα και εμπλέκονται αποκλειστικά με έλκη που δεν επουλώνονται. Πιο συγκεκριμένα το γονιδίωμα του *S. aureus* ήταν παρόν σε έλκη με πτωχή έκβαση ενώ παρόντα ήταν και γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά και γονίδια που κωδικοποιούν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες. Αυτά δρουν ως υπεραντιγόνα οδηγώντας σε υπερβολική ανοσολογική αντίδραση τον ξενιστή διεγείροντας την έκπτυξη ενός κλώνου *T* λεμφοκυττάρων<sup>30</sup>. Επιπλέον φάνηκε ότι η ύπαρξη κάποιων περιβαλλοντικών παθογόνων εντός της βιομεμβράνης του έλκους, όπως *Alcaligenes faecalis* (αρνητικός κατά gram κόκκος) ο οποίος συνήθως δεν είναι παθογόνος διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών και παραγόντων που επιδρούν θετικά στην επούλωση των ελκών. Αυτός ο παράγοντας δεν ήταν δυνατόν να μελετηθεί με την κλασική καλλιέργεια. Το ίδιο ισχύει και για τα *Corynebacterium species*. Ακόμα πιο συγκεκριμένα το *C. striatum* φαίνεται να είναι ένα αναδυόμενο ανθεκτικό παθογόνο που μπορεί να εμπλέκεται σε πιο διεισδυτική λοίμωξη του διαβητικού ποδιού όπως η οστεομυελίτιδα. Τέλος και με αυτή την τεχνολογία φάνηκε ότι τα αναερόβια μικρόβια υποεκτιμούνται με τις κλασικές καλλιέργειες απομόνωσης<sup>28</sup>.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πολλά ερωτήματα εγείρονται σχετικά με το κατά ποσό όλα αυτά τα νέα δεδομένα αποτελούν απαραίτητη γνώση στην κατανόηση και αντιμετώπιση των λοιμώξεων στο διαβητικό πόδι. Μήπως όλη αυτή η πληθώρα πληροφοριών οδηγήσει τελικά σε υπερδιάγνωση, υπερχορήγηση αντιβιοτικών και υπερθεραπεία; Εξυπακούεται ότι κάθε πληροφορία μπορεί να είναι τόσο χρήσιμη όσο και επικίνδυνη αν δεν ερμηνευτεί σωστά. Ωστόσο φαίνεται να ανοίγονται νέες και θαυμαστές προοπτικές στον τρόπο ερμηνείας και πρόβλεψης της εξέλιξης του έλκους με λοίμωξη. Η πεπερασμένη ύπαρξη αντιβιοτικών δεν αφήνει περιθώρια παρά για στροφή προς ανεύρεση απαντήσεων στα ίδια τα μικρόβια. Με τη βοήθεια των νέων τεχνικών απομόνωσης ήδη έχουν σχηματιστεί τα πρώτα συμπεράσματα που αποδεικνύουν ότι η επικράτηση συγκεκριμένου μικροβιακού πληθυσμού σε σχέση πάντα και με παραμέτρους που αφορούν στον εκάστοτε ασθενή, οδηγεί σε συγκεκριμένη έκβαση. Ένα σημαντικό ερώτημα που εγείρεται για την κλινική πράξη σε σχέση

με τις νέες μικροβιολογικές πρακτικές διερεύνησης των ελκών είναι το αν τελικά η ανάλυση του μικροβιώματος θα μπορούσε να προβλέψει ποιο διαβητικό πόδι με έλκος αλλά χωρίς λοίμωξη, θα είχε τελικά μεγαλύτερες πιθανότητες να εκδηλώσει λοίμωξη. Αν μπορούσαν οι επιστήμονες να αποδώσουν την επικράτηση συγκεκριμένων μοτίβων μικροβιώματος σε συγκεκριμένη εξέλιξη του έλκους δηλαδή αν συσχετιστεί η ύπαρξη συγκεκριμένου μικροβιακού πληθυσμού και μικροβιακού φορτίου με πιθανότητα εκδήλωσης λοίμωξης τότε θα μιλάμε για ανατροπή ακόμα και βασικών αρχών που ισχύουν μέχρι τώρα. Θα μπορούσε να τεθεί δηλαδή υπό αμφισβήτηση ακόμη και η μη αναγκαιότητα καλλιέργειας ελκών χωρίς λοίμωξη καθώς και η μη χορήγηση αντιβιοτικών σε κλινικά ανεπίπλεκτα έλκη. Μία τέτοια ανακάλυψη θα φέρει τεράστια αλλαγή στις μέχρι τώρα πρακτικές και θα οδηγήσει σε αναγκαία αναθεώρηση των ισχυουσών οδηγιών.

## Βιβλιογραφία

1. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711–745.
2. Smith A. Etiology of the Problem Wound. In: Sheffield PJ, Fife CE, Smith A. *Wound Care Practice.* 2004; pp. 3–48.
3. Apelqvist J, Tennvall GR. The Global Impact. Counting the costs of the diabetic foot. *Diabetes Voice.* 2005; 50: Special Issue: 8-10.
4. Frykberg RG. Epidemiology of the diabetic foot: ulcerations and amputations. *Adv. Wound Care.* 1999; 12: 139-41.
5. Ahmad N, Thomas GN, Gill P, Chan C, Torella F. Lower limb amputation in England: prevalence, regional variation and relationship with revascularisation, deprivation and risk factors. A retrospective review of hospital data. *J R Soc Med.* 2014; 107(12):483-9.
6. Ahmad N, Thomas GN, Gill P, Torella F. The prevalence of major lower limb amputation in the diabetic and non-diabetic population of England 2003-2013. *Diab Vasc Dis Res.* 2016; 13(5):348-53.
7. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005;293(2):217–28.
8. Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Smith E, Rhoads D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) *PLoS One.* 2008; 3(10): e3326.
9. Lavigne JP, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lipsky BA. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4(1):38-49. *New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers.*

10. Bay L, Barnes CJ, Fritz BG, Thorsen J, Restrup MEM, Rasmussen L et al. Universal DermalMicrobiome in Human Skin. *mBio*. 2020; 11;11(1)
11. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 2819-2828.
12. Ghotaslou R, Memar MY, Alizadeh N. Classification, microbiology and treatment of diabetic foot infections. *J Wound Care*. 2018; 27(7):434-441.
13. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(3): 143-155
14. Macías Hernández AE, Alvarez JA, Cabeza de & Vaca F, et al. Microbiology of the diabetic foot: is the swab culture useful? *Gac Med Mex*. 2011;147:117-124
15. Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία. Λήψη, επεξεργασία, άμεση αναζήτηση, καλλιέργεια και αξιολόγηση κλινικών δειγμάτων για παθογόνα (βακτήρια, μύκητες, παράσιτα). Κλινικό φροντιστήριο. 6ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων Αθήνα, 27, 28 Φεβρουαρίου, 1η Μαρτίου 2013. Ξενοδοχείο Royal Olympic σελ.133-134
16. Demetriou M, Papanas N, Panopoulou M, Papatheodorou K, Bounovas A, Maltezos E. Tissue and swab culture in diabetic foot infections: neuropathic versus neuroischemic ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2013; 12(2):87-93.
17. Δημητρίου Μ. Μελέτη παθογόνων μικροοργανισμών σε λοιμώξεις διαβητικού ποδιού. Διδακτορική Διατριβή. Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Ακαδημαϊκό έτος 2017-2018, Αλεξανδρούπολη: 66,90-99.
18. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, McBain AJ. Molecular and culture-based assessment of the microbial diversity of diabetic chronic foot wounds and contralateral skin sites. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(7):2263-71.
19. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, Segre JA, Grice EA. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes*. 2013; 62(3):923-30.
20. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308:1635-1638.
21. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-9.
22. Γύπας Φ, Μεντής Α-Φ. Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου - μεταγονιδιωματική. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας. 2014; 59(2): 7-16
23. Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16:540-550.
24. Jneid J, Cassir N, Schuldiner S, Jourdan N, Sotto A, Lavigne J Pet al. Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:282.
25. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 2016; 535, 511-516.
26. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen* 2016; 24(1):164-74
27. Malone M, Johani K, Jensen SO, Gosbell IB, Dickson HG, Hu H et al. Next generation DNA sequencing of tissues from infected diabetic foot ulcers. *E. BioMedicine* 2017; 21:142-149
28. Malone M, Gosbell IB, Dickson HG, Vickery K, Espedido BA, Jensen SO. Can molecular DNA-based techniques unravel the truth about diabetic foot infections? *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2017;33(1).
29. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X et al. Strain- and species-level variation in the microbiome of diabetic wounds is associated with clinical outcomes and therapeutic efficacy. *Cell Host Microbe*. 2019; 25 (5), 641-655.e5
30. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Galvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins (Basel)* 2010; 2, 2117-2131.