

# Клинико-микробиологическое исследование тканей диабетической стопы после ампутации в специализированной клинической больнице в Северной Индии

Punia R.S., Kundu R., Jassal V., Attri A.K., Chander J.

Government Medical College and Hospital, Чандигарх, Индия

У пациентов с сахарным диабетом (СД) на 80% выше риск развития флегмоны подкожно-жировой клетчатки, в 4 раза — риск остеомиелита и в 2 раза — риск сепсиса и летального исхода.

**Цель.** Настоящее исследование было проведено для оценки клинических и микробиологических характеристик микроорганизмов, выделенных из тканей 25 пациентов с СД после ампутации конечностей.

**Материалы и методы.** В данном исследовании 25 пациентам с СД были выполнены ампутации конечностей. Язвы конечностей были классифицированы по Вагнеру, выполнена окраска материала по Граму. Также проводилось исследование влажных препаратов, фиксированных гидроксидом калия. Были проведены посевы на кровяной агар, агар МакКонки, декстрозный агар Сабуро и в бульон с сердечно-мозговой вытяжкой, и оценен рост микроорганизмов. Проводилось изучение гистологических срезов с использованием специальных красителей.

**Результаты.** В исследовании участвовали 25 пациентов (16 — мужчин, 9 — женщин). Возраст пациентов составлял от 30 до 90 лет (средний возраст:  $58 \pm 10,91$  лет). У большинства пациентов были язвы 3-й степени по Вагнеру. Остеомиелит был диагностирован в 13 (52%) случаях: острая форма в 2 (8%) случаях, хроническая — в 3 (12%) случаях, обострение хронического остеомиелита — в 8 (32%) случаях. По результатам посевов в большинстве случаев выделялся *Proteus mirabilis*; на втором месте — *Escherichia coli*. В 20 случаях было выделено более одного вида бактерий. Грибы *Candida* были выделены в 8 случаях; *Trichosporon* — в 2 случаях, а *Fusarium* — в 1 случае. При гистологическом исследовании *Candida* были обнаружены у 3 пациентов, а *Trichosporon* — у 1 пациента. В 80% случаев остеомиелита наблюдалась полимикробная инфекция.

**Заключение.** Выделение возбудителя инфекции помогает назначить подходящую схему антибиотикотерапии, что снижает частоту множественной лекарственной устойчивости, осложнений и ампутаций конечностей у пациентов, страдающих СД.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; ампутация; инфекции; бактериологический посев

## Clinico-microbiological study of diabetic limb amputations in a tertiary care hospital in North India

Punia R.S., Kundu R., Jassal V., Attri A.K., Chander J.

Government Medical College and Hospital, Chandigarh, India

The diabetic population faces 80% increased risk of cellulitis, 4-fold increased risk of osteomyelitis and 2-fold risk of both sepsis and death caused by infections.

**Study objectives:** The present study was carried out to assess the clinical aspects and microbiological profile of organisms isolated from 25 patients undergoing diabetic limb amputations.

**Materials and Methods.** In 25 diabetes persons who underwent limb amputation, grading of ulcers was done according to Wagner system. Material was stained with Gram stain. Potassium hydroxide wet mounts were also studied. Culture was done in blood agar, MacConkey agar, Sabouraud dextrose agar tube slants and brain heart infusion broth and examined for growth. The histopathology sections were also studied and special stains were done.

**Results.** Of 25 cases, 16 were males and 9 were females. The age ranged from 30 to 90 years (mean:  $58 \pm 10.91$ ). Majority of ulcers were grade 3. Osteomyelitis was seen in 13 (52%) cases; acute in 2 (8%), chronic in 3 (12%) and acute exacerbation of chronic osteomyelitis in 8 (32%) cases. On culture *Proteus mirabilis* was isolated in majority of cases followed by *Escherichia coli*. In 20 cases more than one bacterium were isolated. *Candida* was cultured in 8 cases followed by *Trichosporon* in 2 and *Fusarium* in one case. On histopathology *Candida* was seen in 3 cases, while one case showed spores of *Trichosporon*. 80% cases with osteomyelitis had polymicrobial infection.

**Conclusions.** The isolation of etiologic agent helps in administering appropriate antibiotic regimens, thus reducing the problem of multidrug resistance, morbidity and surgical limb amputations in patients suffering from diabetes mellitus.

**Key words:** diabetes; amputation; infection; culture

DOI: 10.14341/DM2015279-83

Увеличение количества пациентов с сахарным диабетом (СД) является одной из наиболее существенных проблем современной медицины. Распространенность СД увеличивается и, по оценкам экспертов, к 2050 г. показатели распространенности данного заболевания дополнительно вырастут еще на 165% [1]. По сравнению со здоровыми лицами у страдающих СД на 80% повышен риск развития флегмоны подкожно-жировой клетчатки (инфекционное поражение кожи и мягких тканей), в 4 раза выше риск возникновения остеомиелита и в 2 раза выше риск сепсиса и летального исхода при инфекционных осложнениях [2, 3].

При СД происходит нарушение лейкоцитарных функций [4]. Метаболические нарушения приводят к недостаточной миграции нейтрофилов и макрофагов в область раны и ухудшают хемотаксис [5]. Потенциальной причиной инфекционных осложнений могут быть различные микроорганизмы от аэробных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Streptococci* (группы В), *Enterococcus*, *Staphylococcus* (коагулазонегативный), *Proteus Mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia* до анаэробных бактерий, таких как *Bacteriodes*, *Peptococcus* и *Peptostreptococcus* [6]. Также из язвенных дефектов диабетической стопы периодически высеваются патологические грибы, преимущественно *Candida* [7].

## Цель

Настоящее исследование было проведено в связи с недостатком данных о клинико-микробиологических аспектах заболевания диабетической стопой в Индии. Целью данного исследования было изучение клинических и микробиологических характеристик микроорганизмов, выделенных у пациентов после ампутации конечностей в результате осложнений СД.

## Материалы и методы

Исследование проводилось в отделении патологической анатомии совместно с отделениями общей хирургии и микробиологии; использовались ткани 25 пациентов с СД, которым были выполнены ампутации конечностей в специализированной клинической больнице. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом; информированное согласие было получено от всех пациентов, включенных в исследование.

В ходе исследования были проведены тщательная оценка нарушений чувствительности (жгучая или стреляющая боль, покалывания или боли по типу «удара током», онемение и т.д.), а также клиническое обследование с использованием простых портативных устройств. Для оценки выраженности периферической невропатии использовался монофиламент массой 10 г; вибрационная чувствительность определялась с помощью камертона 128 Гц, а коленный рефлекс оценивался с использованием неврологического молоточка.

Взятие материала из язвы/зоны некроза осуществля-

лось хирургом после очистки язвенной поверхности с использованием физиологического раствора и стерильного шприца. Сбор экссудата осуществлялся путем протирания поверхности язвы стерильным ватным тампоном. Образцы глубжележащих тканей были получены с помощью скальпеля (лезвие №10–15) и помещены на стерильные тампоны, в емкости или в пробирки для посевов. Часть образцов была окрашена по Граму и исследована под микроскопом. Другая часть образцов была посеяна на кровяной агар и агар МакКонки [8].

Небольшую часть образцов исследовали после частичного гидролиза в 10–20% растворе гидроксида калия (КОН), посева в пробирки с косым декстрозным агаром Сабуро (SDA) и инкубации при 37°C или 22°C. Образцы также помещались в бульон с сердечно-мозговой вытяжкой и подвергались инкубации при 37°C. Рост культур оценивался ежедневно в течение 1-й недели и 2 раза в неделю на протяжении последующих 3 нед [9]. Для гистологического исследования образцы тканей ампутата помещались в 10% буферный раствор формалина. Изготавливались срезы толщиной 3–5 мкм и осуществлялась окраска гематоксилином и эозином. Также проводились исследования с использованием специальных методов окрашивания, таких как окраска Шифф-йодной кислотой (ШИК), окраска по Граму и по Grocott.

## Результаты

Из 25 участников исследования 16 пациентов были мужчинами, 9 – женщинами. Возраст пациентов составлял от 30 до 90 лет (средний возраст: 58±10,91 лет). Большинство пациентов (60%) были в возрасте от 40 до 60 лет. При клиническом обследовании 23 пациентов было выявлено отсутствие пульсации артерий нижних конечностей. В 14 случаях отмечалась утрата чувствительности. Из 25 случаев невропатические язвы присутствовали у 14 (56%) пациентов, а нейроишемические язвы – у 11 (44%) пациентов. Ампутации ниже колена были выполнены в 20 случаях; ампутации выше колена – в 2 случаях. Трем пациентам выполнялась ампутация на уровне предплюсне-плюсневой сустава. Характеристика язв осуществлялась в соответствии с классификацией по Вагнеру (табл. 1; рис. 1).

Остеомиелит был отмечен у 13 (52%) пациентов: острый – в 2 (8%) случаях (рис. 2), хронический – в 3 (12%) случаях и обострение хронического – в 8 (32%) случаях.

По результатам посевов в большинстве случаев выделялся *Proteus mirabilis*; следующим микроорганизмом была *Escherichia coli*. В 20 случаях был выделен более чем один вид бактерий (табл. 2).

Для выделения грибов выполнялась фиксация влажных препаратов гноя из некротической зоны в КОН (рис. 3 а, б); причем в 22 случаях грибковых возбудителей выявлено не было.

Исследователями проводилась постоянная оценка роста посевов (рис. 4 а–с). Грибы *Candida* были выделены в 8 случаях; *Trichosporon* – в 2 случаях, а *Fu-*



Рис. 1. Препарат ампутированной диабетической стопы (ампутация ниже колена) с язвенным дефектом 3-й степени по Вагнеру.

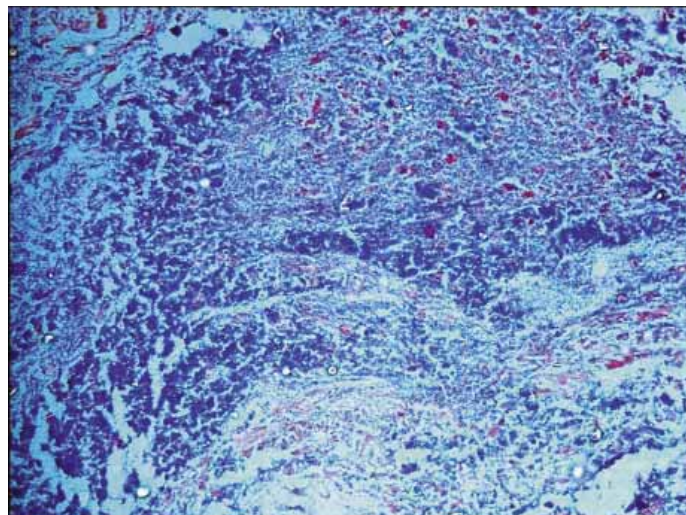


Рис. 2. Бактериальные колонии, выделенные из язвы диабетической стопы (окраска гематоксилином и эозином, х400).

Таблица 1

Классификация язв в ампутированных конечностях с диабетической стопой (n=25)		
Стадия	Характеристика	Количество случаев, %
0	Нет язвы, но высокий риск ее развития на стопе	0 (0)
1	Поверхностная язва	1 (4)
2	Глубокая язва без вовлечения костной ткани	8 (32)
3	Абсцесс с вовлечением костной ткани	13 (52)
4	Ограниченная гангрена	2 (8)
5	Гангрена всей стопы	1 (4)

*sarium* – в 1 случае. По результатам гистологического исследования с ШИК-окрашиванием почкующиеся грибы *Candida* с псевдогифами были обнаружены у 3 пациентов, а споры *Trichosporon* – у 1 пациента. В случаях

инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus*, отмечалось отсутствие остеомиелита. В 80% случаев остеомиелита была зарегистрирована полимикробная инфекция. Остеомиелит был выявлен в 3 (50%) случаях *Pseudomonas*-инфекции, у 5 (45%) пациентов с *Enterobacteriaceae* и у 1 (33%) пациента с *Enterococcus*.

## Обсуждение

Сахарный диабет – эндокринное расстройство, при котором нарушается метаболизм глюкозы в результате качественного и количественного дефицита инсулина [10]. Количество больных СД увеличивается в эпидемическом масштабе. За счет многолетней гипергликемии данное заболевание приводит к повреждению органов-мишеней, что, в свою очередь, является огромным бременем для системы здравоохранения.

Таблица 2

Микроорганизмы, выделенные из ампутированных конечностей с диабетической стопой (n=25)	
Выделенные бактерии, n (%)	<i>Proteus mirabilis</i> , 12 (48)
	<i>Escherichia coli</i> , 11 (44)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 6 (24)
	Виды <i>Acinetobacter</i> , 5 (20)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> , 5 (20)
	<i>Enterococcus</i> , 3 (12)
	<i>Proteus vulgaris</i> , 2 (8)
	<i>Staphylococcus aureus</i> , 1 (4)
	<i>Citrobacter koseri</i> , 1 (4)
	Выделенные патогенные грибы (фиксация в KOH), n (%)
Широкие гифы с прямоугольным ветвлением, что, предположительно, свидетельствует о мукоромикозе, 1 (4)	
Отсутствие грибковых элементов, 22 (88)	
Выделенные на культуре патогенные грибы, n (%)	Виды <i>Candida</i> , 8 (32)
	Виды <i>Trichosporon</i> , 2 (8)
	<i>Fusarium</i> , 1 (4)
	Стерильные образцы, 14 (56)

KOH – гидроксид калия

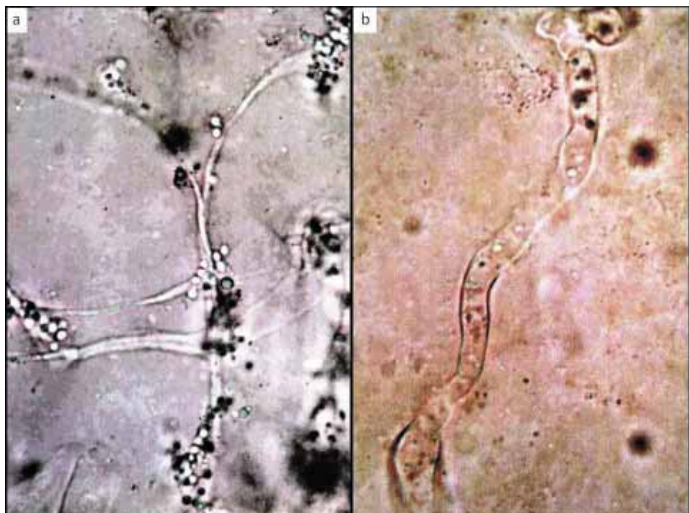


Рис. 3. Влажные препараты, фиксированные в КОН:  
а. почкующиеся грибы *Candida* с псевдогифами (x400).  
б. широкие гифы *Mucormycetes* (x400).

Возраст пациентов с СД, которым были выполнены ампутации конечностей в настоящем исследовании, варьировал от 30 до 90 лет (медиана 59 лет). Средний возраст больных составил  $58,6 \pm 10,91$  лет, причем среди пациентов с язвенными дефектами преобладали мужчины в пропорции 17:1. Интервал с момента появления язвенных дефектов стопы до момента обращения в стационар варьировал от 3 дней до 6 мес (в среднем – 7 нед).

В настоящем исследовании у большинства пациентов были язвы 3-й степени по Вагнеру – у 13 (52%) пациентов; далее следовали язвы 2-й степени – у 8 (32%) пациентов. Высокая частота глубоких язв стопы у пациентов с СД в нашем исследовании может быть обусловлена самолечением, медицинской неграмотностью и финансовой неблагополучностью пациентов, что приводило к задержке при обращении в медицинские учреждения.

В исследовании, проведенном Sharma и соавт. [11], было продемонстрировано, что *Staphylococcus aureus* (38,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (17,5%), *Proteus mirabilis* (14%) и *E. coli* (9,3%) являются наиболее часто выделяемыми микроорганизмами при инфекциях язвенных дефектов диабетической стопы. По данным зарубежной литературы, из дефектов кожных покровов при острых инфекциях преимущественно выделяются аэробные грамположительные кокки [12–18]. Наиболее часто высевают *Staphylococcus aureus* и  $\beta$ -гемолитические стрептококки (групп А, С и G и особенно группы В). Хронические раны характеризуются более сложной колонизирующей флорой, включающей в себя бактерии следующих видов: *Enterococci*, *Enterobacteriaceae*, облигатные анаэробы, *Pseudomonas aeruginosa*, а в некоторых случаях и другие неферментирующие грамотрицательные палочки [19].

Исследования, проведенные в Индии, напротив, сообщают о более частом выделении аэробных грамотрицательных бактерий [20–22]. Состав основных инфекционных агентов в тканях язвы у индийских пациентов несколько иной. Соотношение грамположительных и грамотрицательных аэробов составило 2:3,

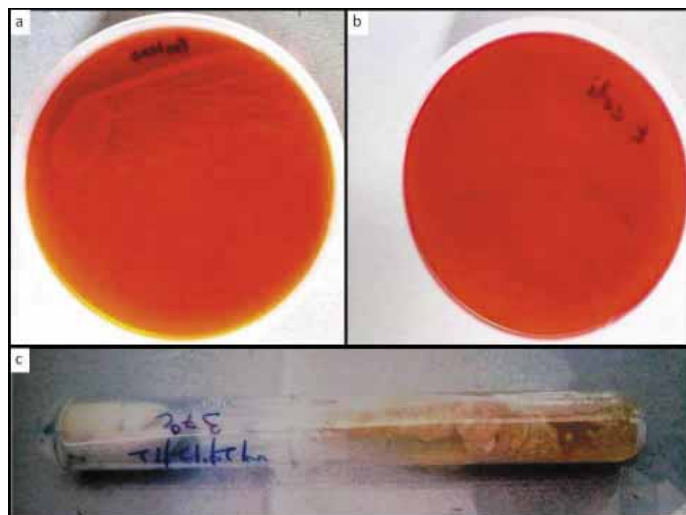


Рис. 4. Бактериальный рост в культурах:  
а. чашка Петри с агаром МакКонки – рост *Proteus*;  
б. чашка Петри с кровяным агаром – рост *Escherichia coli*;  
с. пробирки с косым декстрозным агаром Сабуро – рост грибов (колонии *Candida*).

что противоречит ранее указанным данным [22]. Вероятными причинами таких изменений могут являться различия возрастнo-половых характеристик, стадий язвенного дефекта, а также самих изучаемых групп населения. В настоящем исследовании грамотрицательные аэробы высевались чаще, чем грамположительные аэробы. Наиболее часто выявляемыми видами бактерий были *Proteus mirabilis* – 12 (48%) случаев и *Escherichia coli* – 11 (44%) случаев.

Патогенные грибы *Candida* были выделены в 8 случаях (32%); *Trichosporon* – в 2 случаях (8%), а *Fusarium* – в 1 случае (4%). Следует отметить, что в другом исследовании наблюдалась более высокая частота выделения патогенных грибов – в 77% случаев, причем преобладающим возбудителем были грибы рода *Candida* [7]. Последние преобладали среди грибковых возбудителей также в исследовании Chincholikar и Pal [23].

В данном исследовании было выявлено значительное число случаев остеомиелита (13 пациентов; 52%). Хронический остеомиелит отмечался чаще, чем острый, что объясняется более длительным периодом между появлением язв и поступлением пациентов в стационар. При расчете микробной этиологической корреляции был сделан вывод о том, что большинство (80%) инфекций были полимикробными. Из мономикробных инфекций *Pseudomonas* являлся причиной остеомиелита в половине случаев. Наиболее частой причиной остеомиелита при диабетической стопе был *Staphylococcus aureus* [24]. Следующими по распространенности были аэробные грамположительные кокки, затем – аэробные грамотрицательные палочки [25]. Инфекции, вызванные *Pseudomonas*, обычно возникают у пациентов с частым промоканием ног или колотой раной (особенно достигающей пяточной кости) в анамнезе, а также у пациентов, носящих обувь с резиновыми подошвами.

## Выводы

По результатам данного исследования можно сделать вывод, что в тканях язвенного дефекта диабетической стопы преобладали грамотрицательные аэробные бактерии. Для дальнейшего изучения микробиологического спектра возбудителей требуется проведение более масштабных многоцентровых и междисциплинарных исследований. Результаты настоящего исследования могут оказаться полезными в нашей популяции при изучении клинической и микробиологической вариабельности микроорганизмов у пациентов с СД, которым были выполнены ампутации конечностей, учитывая дефицит по-

добных исследований в Индии. Выделение возбудителя инфекции помогает назначить подходящую схему антибиотикотерапии, что снижает частоту множественной лекарственной устойчивости, осложнений и ампутаций конечностей у пациентов, страдающих СД.

### Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.*

### Список литературы

- Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KMV, et al. Projection of Diabetes Burden Through 2050: Impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes care*. 2001;24(11):1936-1940. doi: 10.2337/diacare.24.11.1936
- Morrison WB, Ledermann HP. Work up of diabetic foot. *Radiol Clin N Am*. 2002;40(5): 1171-1192. doi: 10.1016/S0033-8389(02)00036-2
- Shank CF, Feibel JB. Osteomyelitis in diabetic foot: diagnosis and management. *Foot Ankle Clin*. 2006;11:779-789. doi: 10.1016/j.facl.2006.06.008
- Tsourd E, Barthel A, Rietzsch H, et al. Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. *BioMed Research International*. 2013;2013:385641. doi: 10.1155/2013/385641
- Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, et al. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC Surgery*. 2008;8:5-5. doi: 10.1186/1471-2482-8-5.
- Lavery LA, Harkless LB, Felfer-Johnson K, et al. Bacterial pathogens in infected puncture wounds in adults with diabetes. *J Foot Ankle Surg*. 1994;33(1):91-97.
- Nair S, Peter S, Sasidharan A, et al. Incidence of mycotic infections in diabetic foot tissue. *J Cult Collect*. 2006;5:85-89.
- Duguid JP. Staining methods. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmon A, editors. *Mackie McCartney Practical Medical Microbiology*, Edinburgh: Churchill Livingstone; 2006. pp. 793-812.
- Chander J. *Textbook of medical mycology*. 3rd ed. New Delhi: Mehta Publishers; 2009.
- Ngim NE, Ndifon WO, Udosen AM, et al. Lower limb amputation in diabetic foot disease: experience in a tertiary hospital in southern Nigeria. *African Journal of Diabetes Medicine*. 2012;20(1):13-15.
- Sharma VK, Khadka PB, Joshi A, et al. Common pathogens isolated in diabetic foot infection in Bir Hospital. *Kathmandu Univ Med J*. 2006;4(3):295-301.
- Grayson M, Gibbons GW, Balogh K, Levin E, Karchmer AW. Probing to Bone in Infected Pedal Ulcers: A Clinical Sign of Underlying Osteomyelitis in Diabetic Patients. *JAMA*. 1995;273(9):721-723. doi:10.1001/jama.1995.03520330051036
- Grayson ML. Diabetic foot infections. *Antimicrobial therapy*. *Infect Dis Clin North Am*. 1995;9(1):143-161.
- Joseph WS, Axler DA. Microbiology and antimicrobial therapy of diabetic foot infections. *Clin Podiatr Med Surg*. 1990;7(3):467-481.
- Goldstein EJ, Citron DM, Nesbit CA. Diabetic foot infections bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes care*. 1996;19(6):638-641. doi: 10.2337/diacare.19.6.638
- Urbancic-Rovan V, Gubina M. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*. 2000;17(11):814-815. doi: 10.1046/j.1464-5491.2000.00374-2.x
- Sims D, Keating SE, DeVincentis AF. Bacteriology of diabetic foot ulcers. *J Foot Surg*. 1984;23(2):149-151.
- Jones EW, Edwards R, Finch R, et al. A microbiological study of diabetic foot lesions. *Diabet Med*. 1985;2(3):213-215. doi: 10.1111/j.1464-5491.1985.tb00640.x
- Pathare NA, Bal A, Talvarkar GV, et al. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. *Indian J Pathol Microbiol*. 1998;41(4):437-441.
- Viswanathan V, Jasmine JJ, Snehalatha C, et al. Prevalence of pathogens in diabetic foot infection in South Indian type 2 diabetic patients. *J Assoc Physicians India*. 2002;50:1013-1016.
- Shankar EM, Mohan V, Premalatha G, et al. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *European journal of internal medicine*. 2005;16(8):567-570. doi: 10.1016/j.ejim.2005.06.016
- Gadepalli R, Dhawan B, Sreenivas V, et al. A Clinico-microbiological Study of Diabetic Foot Ulcers in an Indian Tertiary Care Hospital. *Diabetes care*. 2006;29(8):1727-1732. doi: 10.2337/dc06-0116
- Chincholikar DA, Pal RB. Study of fungal and bacterial infections of the diabetic foot. *Indian J Pathol Microbiol*. 2002;45(1):15-22.
- Elamurugan TP, Jagdish S, Kate V, Chandra Parija S. Role of bone biopsy specimen culture in the management of diabetic foot osteomyelitis. *International Journal of Surgery*. 2011;9(3):214-216. doi: 10.1016/j.ijssu.2010.11.011.
- Lipsky BA. Osteomyelitis of the Foot in Diabetic Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(6):1318-1326. doi: 10.1086/516148

Rajpal Singh Punia

MD, Professor, Department of Pathology, Government Medical College and Hospital, Sector 32-A, Chandigarh 160030, India

Reetu Kundu

MD, Resident Pathologist, Department of Pathology, Government Medical College and Hospital, Sector 32-A, Chandigarh 160030, India

**E-mail: reetukundu@gmail.com**

Vikram Jassal

MD, Junior Resident, Department of Pathology, Government Medical College and Hospital, Sector 32-A, Chandigarh 160030, India

Ashok Kumar Attri

MS, Professor & Head, Department of General Surgery, Government Medical College and Hospital, Sector 32-A, Chandigarh 160030, India

Jagdish Chander

MD, Professor and Head, Department of Microbiology, Government Medical College and Hospital, Sector 32-A, Chandigarh 160030, India