

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski

Rozprawa doktorska

**Analiza zmienności
ilościowej i jakościowej
tlenowej flory bakteryjnej
izolowanej z ran przewlekłych
kończyn dolnych w trakcie leczenia
tlenem hiperbarycznym
i jej znaczenie w klinicznej ocenie infekcji**

ELŻBIETA ARŁUKOWICZ

Promotor: prof. dr hab. med. Roman J. Nowicki

Pracę wykonano w:

- Klinice Medycyny Hiperbarycznej i Ratownictwa Morskiego GUMed w Gdyni,
kierownik: dr hab. Jacek Kot
- Pracowni Mikrobiologii Laboratoriów Medycznych Bruss, grupa ALAB w Gdyni,
dyrektor: mgr Krzysztof Łangowski
- Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed w Gdańsku,
kierownik: prof. dr hab. med. Roman J. Nowicki

Gdańsk 2018

Podziękowania

*Mojemu Promotorowi, prof. dr hab. n.med. Romanowi J. Nowickiemu,
za możliwości rozwoju, jakie dla mnie stworzył dla realizacji projektu badawczego.*

*Dr hab. med. Jackowi Kotowi, dr n.med. Magdalenie Sidorowicz
oraz koleżankom i kolegom z KMHiRM za koleżeńską pomoc
w opracowywaniu materiału klinicznego.*

*Prezesowi i Kadrze Zarządzającej Laboratoriów Medycznych Bruss
za umożliwienie prowadzenia prac badawczych w Pracowni Mikrobiologii
na unikalnej aparaturze diagnostycznej.*

*Prof. ndzw. dr hab. n.med. Wiolecie Barańskiej - Rybak za inspirację
i motywację do pracy badawczej oraz dr n. med. Łukaszowi Naumiukowi za cenne
merytoryczne uwagi związane z diagnostyką laboratoryjną.*

*Mojemu nadzwyczajnemu Mężowi, Piotrowi, za nieocenioną pomoc
i wsparcie na każdym etapie mojej pracy, Siostrze, wspomagającej
moje działania naukowe oraz Synowi za cierpliwość i wyrozumiałość.*

*Wyrażam swoją wdzięczność również Innym Osobom,
których nie wymieniłam, a które służyły mi swoimi życzliwymi radami.*

Spis treści

Spis treści	3
Wykaz skrótów użytych w pracy.....	5
1. Wstęp.....	9
1.1. Definicje ran przewlekłych	11
1.2. Rodzaje ran przewlekłych	12
1.3. Patomechanizm powstawania owrzodzeń kończyn dolnych.....	13
1.4. Procesy naprawcze w ranie, gojenie ran.....	15
1.5. Czynniki wpływające na gojenie ran.....	17
1.6. Skóra jako rezerwuuar drobnoustrojów.....	18
1.7. Diagnostyka mikrobiologiczna ran przewlekłych	20
1.8. Obecność drobnoustrojów w ranie przewlekłej: kontaminacja, kolonizacja i kolonizacja krytyczna.....	23
1.9. Obecność drobnoustrojów w ranie przewlekłej: infekcja	24
1.10. Biofilm w ranie przewlekłej.....	25
1.11. Leczenie ran przewlekłych	26
1.12. Zastosowanie HBOT w leczeniu ran przewlekłych.....	31
2. Cele pracy.....	34
3. Materiały	35
3.1. Kryteria włączenia i wyłączenia.....	36
3.2. Grupa badana	37
4. Metody badań	43
4.1. Metody kliniczne	43
4.1.1. Podział ran na grupy według kryterium czasu trwania i pola powierzchni rany.....	44
4.2. Metody laboratoryjne	48
4.2.1. Metoda mikroskopii bezpośredniej.....	48
4.2.2. Metoda posiewu, identyfikacja i oznaczenie lekowrażliwości drobnoustrojów	50
4.2.3. Klasyfikacja drobnoustrojów	51
4.3. Metody statystyczne	53
5. Wyniki.....	55
5.1. Wyniki analizy głównych parametrów ran.....	55
5.2. Wyniki badań jakościowych	60
5.2.1. Wyniki mikroskopii bezpośredniej	60
5.2.2. Wyniki hodowli bakteryjnych	62
5.3. Analiza gatunków i grup wyhodowanych drobnoustrojów.....	64
5.3.1. Dynamika zmian gatunków i grup w T1-T6.....	64
5.3.2. Zależność międzygatunkowa i międzygrupowa drobnoustrojów	67
5.3.3. Analiza czasu pobytu drobnoustrojów w ranie	68
5.3.4. Częstość występowania drobnoustrojów w trzech głównych parametrach rany	72

5.3.4.1. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od typu owrzodzenia	72
5.3.4.2. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od wielkości rany	74
5.3.4.3. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od wieku rany.....	76
5.4. Wyniki badań ilościowych	78
5.4.1. Wyniki mikroskopii bezpośredniej w ocenie półilościowej oraz posiewu ilościowego.....	78
5.4.2. Analiza liczebności drobnoustrojów w ranie	79
5.4.3. Analiza liczebności drobnoustrojów w podstawowych parametrach rany	83
5.4.4. Analiza poprawy klinicznej i wyznaczenie profilu gojenia się rany.....	86
6. Dyskusja	91
7. Wnioski.....	112
8. Streszczenie	114
9. Summary	120
10. Piśmiennictwo	126
11. Załączniki.....	141
11.1. Ankieta jednorazowa	141
11.2. Formularz obserwacji rany.....	142
11.3. Instrukcja pobierania wymazów.....	144
11.4. Diagnostyka laboratoryjna.....	147
11.5. Formularz informacji dla pacjenta	151
11.6. Formularz zgody na udział w badaniu	152
11.7. Ocena liczby drobnoustrojów.....	153
11.8. Struktura klasyfikacyjna bakterii.....	154
11.9. Dynamika tygodniowa.....	156
11.10. Przypadki kliniczne.....	158
11.10.1. Przypadek 1.....	158
11.10.2. Przypadek 2	159
11.11. Spis rysunków, fotografii i tabel.....	161
11.11.1. Rysunki.....	161
11.11.2. Fotografie	161
11.11.3. Tabele.....	162

Wykaz skrótów użytych w pracy

Skrót	Znaczenie/Rozwinięcie
AI-2	Autoinduktor-2
AK	amikacyna
AMC	amoksycylina z kwasem klawulanowym
ang.	angielski
ATA	atmosfera absolutna, jednostka ciśnienia
ATP	adenozynotrójfosforan
BHI	rodzaj płynnego podłoża, bulion mózgowo-sercowy
C	witamina C
CDO	(ang. <i>Continuous Delivery of non-pressurized Oxygen</i>) – terapia ciągła tlenem normobarycznym
CFU	(ang. <i>Colony Forming Units</i>) - jednostki tworzące kolonie
CIP	ciprofloksacyna
CLSI	(ang. <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>) – Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych
cm ²	centymetr kwadratowy, jednostka powierzchni
cm ³	centymetr sześcienny, jednostka objętości
CNA	podłoże agarowe z 5% krwią baranią i z kwasem nalidyksowym
CNS	(ang. <i>Coagulase Negative Staphylococcus</i>) – <i>Staphylococcus</i> koagulazo-ujemny
CO ₂	dwutlenek węgla
COS	podłoże agarowe z 5% krwią baranią
CRAB	(ang. <i>Carbapenem Resistant Acinetobacter baumannii</i>) - <i>Acinetobacter baumannii</i> oporny na karbapenemy
CRPA	(ang. <i>Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> oporny na karbapenemy
CX41	oznaczenie stosowanego mikroskopu (Olympus CX41)
CXM	cefuroksym
DA	klindamycyna
DFU	(ang. <i>Diabetic Foot Ulcer</i>) – owrzodzenie stopy cukrzycowej
DOX	doksycyklina

ES β L	(ang. <i>Extended Spectrum β-lactamases</i>) - β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym
et al.	(ang. <i>et all</i>) - i inni
EUCAST	(ang. <i>European Committee of Antibiotics Susceptibility Testing</i>) – Komitet Europejski ds. oznaczania lekowrażliwości na antybiotyki
EWMA	(ang. <i>European Wound Management Association</i>) – Europejskie Towarzystwo Leczenia Ran
g	gram, jednostka masy
GM	gentamycyna
HBOT	(ang. <i>Hiperbaric Oxygen Therapy</i>) - terapia tlenem hiperbarycznym
ICD-10	(ang. <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>) - Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych
IDSA	(ang. <i>The Infectious Diseases Society of America</i>) – Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych
Inf.	(ang. <i>infinity</i>) - oznaczenie nieskończoności
IPM	imipenem
KMHiRM	Klinika Medycyny Hiperbarycznej i Ratownictwa Morskiego
LT	oznaczenie aparatu Microflex LT, Bruker Daltonik
maks.	wartość maksymalna
MALDI-TOF	(ang. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight</i>) – desorpcja laserowa z udziałem matrycy z analizą czasu przelotu
MCK	agar McConkey
MIC	(ang. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) – minimalne stężenie hamujące
mies.	miesiące
m.in.	między innymi
min.	wartość minimalna
ml	mililitr, cm ³ , jednostka objętości
MLSb	(ang. <i>resistance Macrolides Linkozamides Streptogramin b</i>) – oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminę b
mm	milimetry
mmHg	milimetry słupa rtęci, jednostka ciśnienia
MRSA	(ang. <i>Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus</i>) - Staphylococcus aureus oporny na metycylinę
MW176S	oznaczenie zestawu Sigma Transwab® używanego w pracy

MWE	(ang. <i>Medical Wire & Equipment</i>) – nazwa firmy produkującej m.in. podłoża transportowe
MZ	metronidazol
N	liczba przypadków, badań lub innych elementów
n.e.	w naszej erze
NERDS	(ang. <i>Nonhealing wound, Exudative wound, Red and bleeding wound, Debris on the wound, Smell or unpleasant odor</i>) – skrót ułatwiający zapamiętanie objawów infekcji miejscowej w ranie: brak gojenia, wysięk z rany, zaczerwienienie i krwawienie, włóknik w ranie, nieprzyjemny zapach
nT	liczba tygodni
OR	(ang. <i>odds ratio</i>) – iloraz szans - stosunek szans wystąpienia danego zdarzenia w jednej grupie do szansy jego wystąpienia w innej grupie
ord.nov.	(łac. <i>ordo novum</i>) – nowy rząd (systematyka)
p	(ang. <i>probability value, p-value</i>) - prawdopodobieństwo testowe (statystyka)
p.n.e.	przed naszą erą
PG(-)	pałeczki Gram-ujemne
pH	ujemny wykładnik stężenia jonów wodorowych, odczyn roztworu
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
Q25	kwartył 25%
Q50	mediana
Q75	kwartył 75%
QS	(ang. <i>Quorum Sensing</i>) - sygnały wyczuwania liczebności bakterii w biofilmie
QQ	(ang. <i>Quorum Quenching</i>) – zahamowanie sygnałów wyczuwania liczebności bakterii w biofilmie
R	język programowania, środowisko obliczeń statystycznych
rhEGF	(ang. <i>Recombinant Human Epidermal Growth Factor</i>) – rekombinowany ludzki czynnik wzrostu naskórka
rhFGF	(ang. <i>Recombinant Human Fibroblast Growth Factor</i>) - rekombinowany ludzki czynnik wzrostu fibroblastów
rhPDGF	(ang. <i>Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor</i>) - rekombinowany ludzki płytkopochodny czynnik wzrostu
rRNA	(ang. <i>ribosomal Ribonucleic acid</i>) - rybosomalny kwas rybonukleinowy

RTG	rentgenogram
r.ż.	rok życia
SD	(ang. <i>standard deviation</i>) - odchylenie standardowe
spp.	(ang. <i>species</i>) - gatunki
STONEES	(ang. <i>Size increasing, Temperature, Os exposed, New breakdown, Edema/erythema, Exudate, Smell</i>) - skrót ułatwiający zapamiętanie objawów infekcji głębokiej w ranie: powiększenie rozmiaru, uwidocznienie kości, pogorszenie stanu, obrzęk/zaczerwienienie, zapach
SXT	trimetoprim z sulfametoksazolem
T1-T6	tygodnie od 1 do 6
TIME	(ang. <i>Tissue debridement, Infection control, Moisture, Edges</i>) – system opieki nad raną – oczyszczenie tkanek, kontrola infekcji, kontrola nawilżenia, brzegi
TOT	(ang. <i>Topical Oxygen Therapy</i>) –tlenoterapia miejscowa
TWO ₂	(ang. <i>Topical Wound Oxygen</i>) – miejscowa tlenoterapia ran wysokociśnieniowa, cykliczna
tzw.	tak zwany
VRE	(ang. <i>Vancomycin Resistant Enterococcus</i>) – <i>Enterococcus</i> oporny na wankomycynę
vs.	(łac. <i>versus</i>) – w przeciwieństwie do
W	test statystyczny Wilcoxona
w.	wiek
WHO	(ang. <i>World Health Organization</i>) – Światowa Organizacja Zdrowia
wpw	w polu widzenia
wsp.	współpracownicy
β-hem	hemoliza typu β (całkowita)
μl	mikrolitr, jednostka objętości
ZSC	zespół stopy cukrzycowej

1. Wstęp

Człowiek zajmuje się leczeniem ran od początku swojego istnienia. Niestety, nie dysponujemy wiedzą, jak wyglądała opieka nad raną w czasach prehistorycznych, do naszych czasów dotrwały jedynie informacje o leczeniu ran, zapisane przed 2-3 tysiącami lat, po powstaniu pisma. Jak podaje Broughton i wsp. (1), pierwszy znany dokument opisujący czynności związane z opieką nad raną został napisany na tabliczkach glinianych około 2100 roku p.n.e. Podano w nim sposób, w jaki należy zaopatrzyć ranę po jej wystąpieniu: po przemyciu piwem i gorącą wodą, należało założyć opatrunek z mieszanki ziół, maści i oleju, a następnie zabandażować ranę. Autor ten wspomina również, że najstarszy papirus egipski zachowany do naszych czasów, został napisany prawdopodobnie około 1700 roku p.n.e. Nazwano go Papirusem Smitha od nazwiska kolekcjonera, który zakupił to cenne dzieło w 1862 od Mustafy Aghy, a następnie przekazał Nowojorskiemu Towarzystwu Historycznemu. W papirusie można znaleźć informacje na temat leczenia ran otwartych poprzez aplikowanie do nich miodu, oleju i gazy. Kolejne starożytne dzieło, *Corpus Hippocraticum*, czyli zbiór pism lekarskich różnych autorów, wydane zostało w IV w. p.n.e. i przypisywane jest Hipokratesowi. Kolejne, cenne dla rozwoju nauk medycznych dzieło *De Medicina* Celsusa z pierwszego wieku naszej ery było pierwszą księgą z zakresu medycyny wydanej drukiem w 1478 roku przez Gutenberga. Są w niej zamieszczone liczne opisy, uwagi i wnioski dotyczące gojenia ran. Na podstawie obserwacji, Starożytni uznali, że zanieczyszczenie ran i ciała obce w ranie zaburzają prawidłowe gojenie, podkreślano więc wagę utrzymania czystości w ranie (1,2). Forrest podaje, że Galen (129-200 n.e.),

który zdobył doświadczenie w opiece nad ranami jako lekarz gladiatorów, przekazał potomnym swoją teorię, jakoby naturalnym procesem w gojeniu rany było jej ropienie (2). Stanowisko to przetrwało aż do XIX wieku. Do czasów Semmelweisa (1818-1865) ropienie było traktowane jako nieodłączny, prawidłowy etap w przebiegu gojenia ran. Semmelweis przyczynił się do poprawienia opieki nad raną, a poprzez wdrożenie praktyki higienicznego mycia rąk obniżono stopień zanieczyszczenia bakteryjnego ran, co umożliwiło prawidłowe gojenie (3). Kolejne lata przyniosły serię odkryć w patogenezie zakażeń. Pasteur (1822-1895) przedstawił teorię odpowiedzialności mikroorganizmów za zakażenie, Lister w roku 1865 po raz pierwszy zastosował antyseptykę w chirurgii, natomiast Koch ostatecznie potwierdził, że za zakażenie odpowiedzialne są mikroorganizmy (Nagroda Nobla w 1905) (4–7). Prawdziwy przełom w medycynie dokonał się jednakże po odkryciu penicyliny przez Fleminga (lata 20 XX wieku) (8,9). Zastosowanie penicyliny, a następnie również innych antybiotyków, umożliwiło leczenie zakażeń, dzięki czemu gojenie ran przebiegało sprawniej. Nadal jednak obserwuje się, że niektóre rany gojeniu się nie poddają, pomimo zastosowania nowoczesnych metod leczenia. Dlatego też obecnie poszukiwane są nie tylko nowe rozwiązania terapeutyczne, ale także wykorzystywane są stare metody w nowy, bardziej ukierunkowany sposób.

Problem trudności w gojeniu ran nasila się zauważalnie w starszych grupach wiekowych (10–13). Wydłużenie średniej długości życia ludzi oraz zwiększenie częstości występowania chorób tzw. cywilizacyjnych, związanych z zanieczyszczeniem środowiska, stosowaniem używek, niemalże nieograniczonym dostępem do żywności oraz siedzącym trybem życia prowadzą do zwiększonej zapadalności na cukrzycę, miażdżycę

tętnic, niewydolność żylną. Szacuje się, że w Polsce około 500 tysięcy osób boryka się z problemem rany przewlekłej. Podaje się, że u osób z zaawansowaną niewydolnością żylną owrzodzenie występuje u około 20% tej subpopulacji. W populacji osób po 65 roku życia u 3% występuje trudno gojąca się rana (14). Ocenia się też, że zespół stopy cukrzycowej dotyczy 5-10% osób dorosłych z cukrzycą (15). Ze względu na to, że choroby tzw. cywilizacyjne nie występują u zwierząt w podobnej formie jak u ludzi, badania nad gojeniem ran są utrudnione. W warunkach doświadczalnych niewykonalne jest sprowokowanie wystąpienia niewydolności żylniej lub tętniczej i rany przewlekłej u zwierząt, dlatego każde badanie w populacji ludzkiej, zwiększające naszą wiedzę w tym zakresie, jest bardzo cenne.

1.1. Definicje ran przewlekłych

Ogólna definicja rany to: uszkodzenie ciągłości anatomicznej tkanki (14,16). Uszkodzenie takie dotyczy skóry i błon śluzowych, może wystąpić na skutek urazu mechanicznego, chemicznego, termicznego lub działania energii promienistej.

Ze względu na głębokość wyróżnia się następujące rodzaje ran:

- nadżerki lub otarcia, gdzie dochodzi do płytkiego uszkodzenia struktur powłok (jedynie uszkodzenie naskórka, nabłonka błon śluzowych),
- rany powierzchowne lub owrzodzenia, gdzie ubytek struktur powłok jest głębszy, obejmuje nie tylko skórę, ale również i tkankę podskórną,

- głębokie, towarzyszącym uszkodzeniem struktur głębokich: ścięgien, mięśni, nerwów, naczyń,
- powikłane, w których dochodzi do penetracji do jam ciała lub uszkodzenia narządów (14).

Zazwyczaj podaje się, że wygojenie rany powinno nastąpić w ciągu 4-8 tygodni (10,17–19). Inni autorzy podają, że okres ten jest dłuższy i powinien zakończyć się w ciągu 3 miesięcy (20–23). Trudności z gojeniem można jednak rozpoznać na wcześniejszym etapie, już po 2-4 tygodniach można je wykazać poprzez monitorowanie pola powierzchni rany. Brak zmniejszenia pola powierzchni o 20-40% wskazuje na trudności z gojeniem (22). Z obserwacji wynika, że część ran może ulec wygojeniu po kilku miesiącach a nawet latach, niektóre nie wygoją się wcale. Rany, w których proces gojenia przebiega w sposób nieprawidłowy, zaś samo gojenie trwa dłużej niż 4-12 tygodni, nazywa się ranami przewlekłymi lub trudno gojącymi się (ang. *non-healing wounds*).

1.2. Rodzaje ran przewlekłych

Rany przewlekłe występują zazwyczaj na kończynach dolnych w okolicy podudzia i stopy. Według Krasowskiego i Kruka, najczęstszą przyczyną owrzodzeń podudzi jest niewydolność żylna, która powoduje wystąpienie owrzodzenia w 75-80% przypadków. Zdecydowanie rzadziej obserwuje się owrzodzenia na tle niewydolności tętniczej (8%). Owrzodzenia powstałe w przebiegu cukrzycy (zespół stopy cukrzycowej) stanowią około 3% ran przewlekłych zlokalizowanych na kończynach dolnych. Pozostałe rodzaje ran przewlekłych występują rzadko, przyczyną ich wystąpienia są

zazwyczaj choroby autoimmunologiczne (zapalenie naczyń), urazy, choroba popromienna, choroba nowotworowa, ucisk i inne (14).

Klarowny podział ran przewlekłych jest stosowany przez WHO, gdzie w ICD-10 wyróżnia się następujące rodzaje ran przewlekłych (24):

1. Owrzodzenia kończyn dolnych (ang. *leg ulcers*), a wśród nich owrzodzenia żyłne (ang. *venous*), tętnicze (ang. *arterial*) oraz niesklasyfikowane (ang. *non-classified*).
2. Owrzodzenia w tzw. zespole stopy cukrzycowej (ang. *diabetic foot ulcers*).
3. Odleżyny (ang. *pressure ulcers*).
4. Inne choroby, w tym *Pyodermia gangrenosum* oraz zgorzel (ang. *gangrene*).

1.3. Patomechanizm powstawania owrzodzeń kończyn dolnych

Owrzodzenie żyłne powstaje w efekcie występowania nadciśnienia żylnego, które prowadzi do zastoju krwi żyłnej. Następnie elementy morfotyczne krwi, w tym leukocyty, przemieszczają się poza ścianę naczyń, zaś ich aktywacja prowadzi do wywołania reakcji zapalnej. W wyniku indukcji procesu zapalnego dochodzi do wzrostu przepuszczalności naczyń włosowatych, czego konsekwencją jest obrzęk. Bogatobiałkowy płyn przesiąkowy powoduje odkładanie się fibryny wokół naczyń mikrokrażenia oraz powstawanie hemosyderyny z rozpadłych erytrocytów, co wraz z przewlekłym procesem zapalnym prowadzi do pobudzenia melanogenezy. Ma miejsce również aktywacja fibroblastów,

która rozpoczyna proces włóknienia, czego obrazem jest stwardnienie skóry. W zaawansowanej postaci niewydolności żyłnej, wskutek niedostatecznego zaopatrzenia w krew oraz nadmiernego zastoju żylnego, występuje rozpad tkanek i powstanie martwicy, przy czym rozpad ten obejmuje zarówno naskórek, skórę właściwą i tkankę podskórną – tworzy się owrzodzenie (25,26).

Na podłożu owrzodzenia tętniczego (niedokrwiennego) leży miażdżyca tętnic, przewlekła choroba zapalna i wytwórcza. W miażdżycy obserwuje się odkładanie lipoprotein w ścianie naczyń tętniczych, zmiany włóknisto-wytwórcze, pogrubienie błony wewnętrznej ściany naczynia, zaburzenia hemodynamiczne i powstawanie zakrzepów. W wyniku zwężenia światła tętnic, dochodzi do niedostatecznego ukrwienia tkanek, co prowadzi do ich martwicy i rozpadu. Ubytek tkanek obejmuje naskórek, skórę właściwą, tkankę podskórną oraz mięśniową w obszarze pogorszonej perfuzji. W wyniku zmniejszenia dostawy tlenu, składników odżywczych oraz rozpuszczalnych mediatorów zaangażowanych w naprawę tkanek, regeneracja jest znacznie ograniczona, co doprowadza do powstania ran przewlekłych (27).

Charakterystyczną postacią rany przewlekłej występującej w przebiegu cukrzycy jest tzw. zespół stopy cukrzycowej. Patomechanizm wystąpienia tego typu zmian jest złożony, gdyż oprócz patologii małych naczyń (mikroangiopatia), występują również zmiany w średnich i dużych naczyniach tętniczych (makroangiopatia). Bardzo ważną komponentą tego zespołu jest również polineuropatia obwodowa, która, oprócz zmian w odbieraniu bodźców czuciowo – ruchowych, doprowadza do zmian w zakresie układu autonomicznego, co przyczynia się do nieprawidłowej dystrybucji krwi (14,27). Mikroangiopatia są to zmiany bezpośrednio

związane z hiperglikemią i nasilonymi procesami nieenzymatycznej glikacji białek (m.in. kolagenu, składników błony komórkowej erytrocytów i płytek krwi, czynników krzepnięcia), co prowadzi do uszkodzenia drobnych naczyń krwionośnych oraz do wystąpienia zaburzeń przepływu krwi w mikrokrażeniu. W wyniku tych procesów dochodzi do dysfunkcji śródbłonna naczyń, zwiększenia przepuszczalności ścian naczyń, patologicznej reakcji na działanie tlenu azotu rozszerzające naczynia oraz wystąpienie większej skłonności prozakrzepowej. Wszystkie te procesy prowadzą do postępującego pogorszenia utlenowania tkanek. Makroangiopatia w odróżnieniu od miażdżycy dotyczy tętnic poniżej kolana, małych tętnic stopy oraz tętnicy głębokiej uda, ma charakter wieloodcinkowy i rozsiany, prowadzi do zamknięcia światła naczyń i niedokrwienia zaopatrywanego obszaru i w efekcie wystąpienie martwicy. Taka martwica dotyczy najczęściej dystalnych części kończyn dolnych i jest najczęstszą przyczyną amputacji palców. Po amputacji mogą występować problemy z gojeniem, co prowadzi do powstania trudno gojącej się rany (11,12,28,29).

1.4. Procesy naprawcze w ranie, gojenie ran

Gojenie rany jest to proces, w którym procesy biologiczne występujące w ranie prowadzą do jej zamknięcia. Widoczne cechy gojenia rany to: zmniejszenie się rany, obkurczenie brzegów, powstanie strupa i blizny.

Proces gojenia rany na poziomie komórkowym i molekularnym jest procesem złożonym i rozpoczyna się natychmiast po jej wytworzeniu. W odpowiedzi na powstanie urazu uwalniane są mediatory zapalne, które doprowadzają do powstania miejscowego obrzęku i niedotlenienia.

W miejscu wynaczynionej krwi gromadzą się płytki krwi, dochodzi do zagęszczenia, wzrostu lepkości krwi i agregacji erytrocytów oraz utworzenia skrzepu. Skrzep zapobiega dalszej utracie płynów i elektrolitów z rany i ogranicza zanieczyszczenia pochodzące ze środowiska zewnętrznego. W następnym etapie lokalne naczynia krwionośne ulegają obkurczeniu, co wiąże się ze spowolnieniem przepływu krwi, przechodzeniem białek osocza i ułatwia diapedezę komórek układu białokrwinkowego. Początkowo pojawiają się neutrofile, które rozpoczynają fagocytozę drobnoustrojów i zniszczonych tkanek, następnie migrują makrofagi, rozwija się faza zapalna, która trwa 3-4 dni. Obserwuje się zaczerwienienie (rozszerzenie naczyń przez prostacyklinę i prostaglandyny A i D), zwiększone ucieplenie i obrzęk (przechodzenie elementów białkowych i surowicy przez prostaglandyny E₂ i F_{2α}), upośledzenie funkcji oraz ból (działanie na obwodowe nocyceptory przez prostaglandyny I₂, E i E₂).

Po około 48 godzinach z obwodu rany ku jej wnętrzu zaczynają migrować fibroblasty. Niektóre z nich ulegają transformacji w miofibroblasty, co prowadzi do obkurczenia rany. Fibroblasty zaczynają produkować substancję stanowiącą podstawę dla nowo tworzącej się ziarniny złożoną z glikozaminoglikanów oraz proteoglikanów, jak również czynnik wzrostu keratynocytów oraz kolagen, przekształcający się z czasem w elastyczne włókna kolagenowe. W tym czasie namnażają się również komórki śródbłonna, pobudzane przez autokrynne czynniki wzrostowe, co prowadzi do rewaskularyzacji tkanek. Namnażanie keratynocytów odbywa się w nieuszkodzonym naskórku, który sąsiaduje z raną przez podział komórek warstwy podstawnej naskórka i ich migrację z obwodu rany ku jej środkowi. Keratynocyty napełniają pod wytworzony

skrzep lub na obecną ziarninę. Różnicowanie komórek naskórka następuje po pokryciu całej powierzchni rany przez keratynocyty. Równocześnie z procesem wytwórczym współistnieje proces degradacji – zachodzi proces apoptozy naczyń krwionośnych, degradacja fibrynowego skrzepu oraz tymczasowej ziarniny, spowalniana jest migracja i proliferacja fibroblastów. Czerwono zabarwiona ziarnina przekształcana jest w bladą tkankę z dużą ilością włókien kolagenowych (kolagen typu I zastępuje stopniowo kolagen typu III). Skóra pokrywająca wygojoną ranę jest pozbawiona gruczołów i mieszków włosowych, nie występują w niej również melanocyty (10,12,26,27,30).

1.5. Czynniki wpływające na gojenie ran

Na procesy gojenia wpływają zarówno czynniki miejscowe, jak i ogólne.

Do czynników miejscowych można zaliczyć: obecność drobnoustrojów, ich duża liczebność (powyżej 10^5 CFU w 1 ml treści z rany lub 1 g tkanki), procesy niszczące ziarninę (urazy, uszkodzenie chemiczne, fizyczne), brak tlenu i substancji odżywczych, nadmiar enzymów proteolitycznych (działanie jatrogenne oraz związane z obecnością drobnoustrojów), obfity wysięk (podwyższenie stężenia mediatorów stanu zapalnego oraz aktywnych metaloproteinaz), wysuszenie rany, obecność tkanek martwiczych, obecność ciała obcego w ranie, lokalizacja rany, działanie promieniowania jonizującego na ranę, zimno, stosowanie miejscowe antybiotyków i środków odkażających (12,14,16,31–36).

Obecność drobnoustrojów w ranie nie jest przypadkowym zjawiskiem. Szereg czynników ze strony samej rany, jak: zmiana pH środowiska rany,

obniżenie temperatury w okolicy rany (niewydolność krążenia), maceracja rany (nieprawidłowe opatrunki) oraz inne opisane powyżej, zwiększa możliwość jej zakażenia (37). Drobnoustroje dostają się na powierzchnię rany bezpośrednio po jej powstaniu (38). W badaniach nad bakteriologią ran oparzeniowych wykazano, że jako pierwsze pojawiają się drobnoustroje Gram-dodatnie: gronkowce lub paciorkowce. Z czasem skład mikrobiologiczny rany ulega zmianie: zwiększa się liczba gatunków w ranie, liczebność bakterii w płynie tkankowym, a już w piątej dobie dominują bakterie Gram-ujemne (34,39–43).

Do czynników ogólnych można zaliczyć: patologie układu naczyniowego prowadzące do niedostatecznego ukrwienia (patologia naczyń tętniczych) lub zaburzeń odpływu krwi i wtórnie - do zmniejszenia natlenienia tkanek (patologia żylna), również czynniki prowadzące do niedożywienia, niedobiałczenia (nasilony katabolizm), niedobór witamin i pierwiastków śladowych (witamina A, C, jony metali Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , leki (cytostatyki, glikokortykosterydy), choroby ogólnoustrojowe: cukrzyca, dna moczanowa, niedokrwistość oraz palenie tytoniu, podeszły wiek (16,27).

1.6. Skóra jako rezerwuar drobnoustrojów

Skóra jest środowiskiem życia wielu gatunków drobnoustrojów. Drobnoustroje znajdujące się na powierzchniach ciała człowieka, wraz z ich genomem, przyjęto nazywać mikrobiomem człowieka. Na mikrobiom człowieka składają się mikroby reprezentujące odrębne nisze ekologiczne powierzchni ciała. Naszą wiedzę na temat mikrobioty skóry poszerzają coraz doskonalsze metody wykrywania drobnoustrojów.

Metody stosowane w mikrobiologii konwencjonalnej zostały uzupełnione obecnie przez metody genetyczne, dzięki którym drobnoustroje są identyfikowane bez konieczności ich hodowli (23,44–48).

Badania nad mikrobiomem skóry u noworodków pozwoliły ustalić, kiedy i w jaki sposób jest ona zasiedlana przez drobnoustroje. Wiadomo, że skóra dzieci przedwcześnie urodzonych (do 34 tygodnia ciąży) nie stanowi prawidłowej bariery ochronnej. Dzieci te są w grupie szczególnego ryzyka zakażenia, ponieważ słabo rozwinięta warstwa rogowa naskórka jest łatwo pokonywana przez drobnoustroje. Natomiast po 40 tygodniu życia płodowego, bariera skórna jest w pełni rozwinięta, podobnie jak u osoby dorosłej (49).

Informacje dotyczące zróżnicowania drobnoustrojów na skórze noworodków uzyskano w badaniach wykorzystujących sekwencjonowanie rRNA. Okazuje się, że skład gatunkowy drobnoustrojów skóry noworodków urodzonych drogami natury jest podobny do matczynego. W sytuacji, gdy dziecko jest urodzone drogą cięcia cesarskiego skład gatunkowy mikroorganizmów na skórze nie tylko przypomina skład gatunkowy matki dziecka, ale także innych matek i noworodków, które występowały w tym czasie na oddziale. W przypadku występowania MRSA wśród pacjentów oddziału, można zaobserwować częstsze występowanie infekcji MRSA u noworodków, które przyszły na świat drogą cięcia cesarskiego (39,50–53).

Badanie składu gatunkowego mikroorganizmów zasiedlających skórę osób dorosłych wykazało duże zróżnicowanie w zależności od płci, wieku i lokalizacji miejsca pobrania próbki. Różnice w składzie mikrobiomu skóry zaobserwowano pomiędzy obszarami: okolice łojotokowe, gdzie dominuje *Propionibacterium spp.*, wilgotne – dominują *Corynebacterium*

spp., β -*Proteobacteria* i *Staphylococcus spp.* i suche – dominują *Corynebacterium spp.* i β -*Proteobacteria* (54).

Flora skóry może ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników: potu, łoju, środków myjących, stosowanych antybiotyków. Murray i wsp. do drobnoustrojów pospolicie kolonizujących skórę zalicza rodzaje: *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida*, *Malassezia* (55). Szczególnie faworyzowana na skórze jest obecność *Corynebacterium* i *Staphylococcus*, gdyż mają one możliwość wzrostu w środowisku o niskim pH (około 5), jakiego stwierdza się na jej powierzchni (47).

Drobnoustroje mogą bytować na skórze stale (mając zdolność do namnażania się w gruczołach łojowych i potowych są trudne do usunięcia) lub kolonizować ją tylko przejściowo (nie mają zdolności namnażania się na skórze, są mniej trwale z nią związane). Niektóre drobnoustroje nie są w stanie przebywać na skórze przez dłuższy czas, ze względu na toksyczne działanie kwaśnego środowiska skóry oraz kwasów tłuszczowych (*Streptococcus*), natomiast pałeczki Gram-ujemne oraz drożdżaki z rodzaju *Candida* zasiedlają chętniej miejsca wilgotne (55).

1.7. Diagnostyka mikrobiologiczna ran przewlekłych

W ramach diagnostyki mikrobiologicznej ran przewlekłych pobiera się materiał tkankowy pobrany metodą biopsji, aspirat tkankowy lub treść z powierzchni rany metodą wymazu. Metodą referencyjną jest nadal biopsja tkankowa. W wyniku biopsji uzyskuje się wycinek tkanki w formie dysku, najczęściej o średnicy 5 mm, głębokości do 4 mm (tak zwaną z ang.

punch biopsy). Po pobraniu wycinka lub aspiratu mogą wystąpić powikłania w postaci krwawienia, zaburzeń gojenia, nadkażenia rany, zaś samo pobranie jest bolesne. Dlatego też ogranicza się wskazania do wykonania biopsji diagnostycznej w przypadku ran przewlekłych (56). Wielu autorów podaje, że nie jest konieczne pobieranie biopsji do badania mikrobiologicznego. Porównywali oni odzysk drobnoustrojów z materiałów pobieranych dwiema metodami: wymazu i biopsji i wykazali, że wymaz posiany metodą ilościową jest równie wartościowy, jak tkanka posiana tą metodą (57–64) lub nawet jest bardziej użyteczny w prognozowaniu gojenia niż tkanka (32,65).

Metoda pobierania wymazu z rany została opisana przez Levine'a i wsp. w 1976 roku (61) oraz Donovana w 2009 roku (66). Levine zaleca pobieranie wymazu z obszaru 1 cm² po uciśnięciu wymazówki do momentu uwidocznienia płynu tkankowego, a następnie obracanie wymazówki przez pięć sekund. Donovan opisuje pobieranie wymazu z dużego obszaru rany metodą „zig-zag” - obracając wymazówkę należy połączyć 10 punktów w okolicy brzegów rany, poruszając się po całym polu jej powierzchni.

Następnym etapem jest posiew uzyskanego materiału. Najwięcej informacji wnosi wykonanie posiewu ilościowego, ponieważ określenie liczebności drobnoustrojów jest pomocne dla oceny tendencji gojenia. Podkreśla się, że niska liczebność bakterii w materiale tkankowym z rany jest wartością prognostyczną gojenia. Zazwyczaj przyjmuje się wartość 10⁵, a według niektórych autorów 10⁶ CFU/g tkanki (67–71). Drobnoustroje występujące w ranie w liczebności poniżej tej wartości nie stanowią przeszkody w prawidłowym gojeniu rany, jednakże, jeśli występują w liczebności powyżej tej wartości, stan rany utrzymuje się bez widocznej

poprawy lub może ulec pogorszeniu. Według niektórych autorów również posiew pólnościowy niesie tę informację – wzrost na III i IV kwadrancie odpowiada w przybliżeniu liczebności 10^5 CFU/ml (60,72).

Metody hodowlane są szeroko stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej ran przewlekłych. Zaletą ich jest ich szeroka dostępność oraz niska cena, w porównaniu do metod genetycznych. Dzięki postępowi techniki poprawiała się jakość, precyzja i szybkość metod identyfikacyjnych. Nową metodą identyfikacji, stosowaną coraz powszechniej w laboratoriach mikrobiologicznych, jest spektrometria masowa (MALDI-TOF). W spektrometrii masowej podstawą jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu (tu: zjonizowanych fragmentów białek bakteryjnych). W tej metodzie desorpcja przebiega łagodnie, w sposób, który nie uszkadza cząsteczek białek bakteryjnych, a tylko je wybija ze specjalnie przygotowanej matrycy (MALDI - ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Następnie analizowany jest czas przelotu i masa cząstki po dotarciu do detektora (TOF - ang. *Time of Flight*), który uwidocznił się w postaci widma masowego. Za prace nad tą metodą spektrometrii K. Tanaka, J.B. Fenn oraz K. Wutrich otrzymali w 2002 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii (73,74). Odpowiednie oprogramowanie analizuje otrzymane widma masowe oraz, porównując je z widmem wzorcowym dla danego gatunku, ustala identyfikację badanego szczepu. Zastosowanie spektrometrii masowej w mikrobiologii jest krokiem milowym w diagnostyce klinicznej. Przede wszystkim, dzięki zastosowaniu tej metody, skraca się znacznie czas identyfikacji badanego szczepu, co przekłada się na szybsze uzyskanie wyniku posiewu. Spektrometr masowy umożliwia również identyfikację wielokrotnie większej liczby gatunków niż metody biochemiczne (75,76).

Uzupełnieniem metod hodowlanych jest metoda mikroskopii bezpośredniej, która umożliwia szybką ocenę obecności drobnoustrojów. Materiał tkankowy lub płyn z rany наносzony jest na szkiełko mikroskopowe i, po zabarwieniu metodą Grama, oglądany pod powiększeniem 1000-krotnym. Metoda ta ma szczególne znaczenie w ocenie bakteriologicznej ran oparzeniowych, jednakże również w diagnostyce ran przewlekłych była powszechnie wykorzystywana i opisywana przez wielu autorów (34,57,61,77).

1.8. Obecność drobnoustrojów w ranie przewlekłej: kontaminacja, kolonizacja i kolonizacja krytyczna

Zjawiskiem powszechnym w ranach przewlekłych jest obecność różnych gatunków drobnoustrojów na ich powierzchni (72,78,79). Drobnoustroje te pochodzą z rąk, ubrania i sprzętu osób pielęgnujących ranę lub dostają się na jej powierzchnię na drodze migracji i przeniesienia własnej flory fizjologicznej w okolice rany, mogą pochodzić także z wody lub powietrza (80,81). Zasadlanie rany następuje od pierwszych chwil po jej wystąpieniu. Stwierdzono, że po kilku minutach po wystąpieniu rany urazowej znajdują się na niej bakterie, co potwierdzały dodatnie wyniki posiewów. Po sześciu godzinach w ranie obecne są drobnoustroje w liczebności 10^3 - 10^4 CFU/g tkanki, zaś po 12 i po 24 godzinach 10^5 CFU/g tkanki (82).

Zjawiska, które są związane z obecnością drobnoustrojów w ranie, są opisane w literaturze jako: kontaminacja (zanieczyszczenie), kolonizacja, kolonizacja krytyczna (brak gojenia lub infekcja miejscowa), zakażenie rany z inwazją okolicznych tkanek (33,81,83–85).

Z kontaminacją mamy do czynienia, gdy drobnoustroje występują w ranie, lecz nie namnażają się. Obecność ich ma zazwyczaj charakter przejściowy, liczebność jest niska, procesy gojenia rany nie są zaburzone. Jeśli na powierzchni rany występują drobnoustroje, które namnażają się w ranie, ale nie stwierdza się widocznych oznak infekcji, takie zjawisko nazywamy kolonizacją. Kolonizacja jest wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Wprowadzone dodatkowo pojęcie kolonizacji krytycznej opiera się na ocenie liczebności drobnoustrojów: liczebność drobnoustrojów przekracza poziom krytyczny, ale nie występują jeszcze oznaki infekcji inwazyjnej, z zajęciem okolicznych tkanek. Proces zapalny obejmuje jedynie obszar rany lub obserwowany jest brak gojenia. Ziarnina w ranie ma kolor głębokiej czerwieni lub szary, wzrasta „kruchość” rany, zwiększa się ilość wysięku, pojawiają się dolegliwości bólowe. Stwierdzenie kolonizacji krytycznej jest wskazaniem do wdrożenia leczenia miejscowego (12,17,33,77,85–91).

1.9. Obecność drobnoustrojów w ranie przewlekłej: infekcja

Do zakażenia rany przewlekłej dochodzi w przypadku inwazji tkankowej drobnoustrojów obecnych w biofilmie, na skórze okolicy rany lub pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Zazwyczaj ma to miejsce w przypadku niewłaściwej pielęgnacji rany, zaniedbań higienicznych, urazów, obniżenia odporności ogólnej i miejscowej w przypadku istniejącej kolonizacji rany oraz ekspozycji na drobnoustroje inwazyjne, które nie są składnikami biofilmu rany. Niektóre patogeny mają szczególnie wysoki potencjał chorobotwórczy – są to przede wszystkim paciorkowce

β -hemolizujące (największa inwazyjność, grupa A, G, C według Lancefield) oraz beztlenowa laseczka *Clostridium perfringens*. Do wywołania objawów zakażenia wystarczy liczebność tych drobnoustrojów rzędu 10^3 CFU/g tkanki. Inne drobnoustroje, takie jak *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, wykazują się również inwazyjnością, jednakże liczba ich musi przekroczyć 10^5 CFU/g tkanki, aby widoczne były cechy infekcji w ranie. Zakażenie może nie ograniczyć się tylko do obszaru rany, ale także rozprzestrzenić się na okoliczne tkanki (mięśnie, kości, stawy) lub do krwi. Posocznica w przebiegu zakażenia rany przewlekłej jest niezwykle rzadkim powikłaniem, jednakże zawsze należy się liczyć z możliwością jej wystąpienia, szczególnie w przypadku zakażenia drobnoustrojami inwazyjnymi u pacjentów ze skrajnym obniżeniem sprawności układu immunologicznego.

1.10. Biofilm w ranie przewlekłej

Po zasiedleniu powierzchni rany, bakterie tworzą małe skupiska zwane mikrokoloniami, które są łączone ze sobą przez bezpostaciową substancję pozakomórkową nazywaną macierzą pozakomórkową. Mikrokolonie wraz z macierzą są przyczepione do powierzchni, tworząc biofilm, który w miarę upływu czasu ulega organizacji w zorganizowaną trójwymiarową strukturę ze społecznością drobnoustrojów jednego lub wielu gatunków (44,92). Drobnoustroje w tej strukturze zajmują około 1/3 ogólnej objętości, mikrokolonie są rozproszone w strukturze biofilmu, zaś komunikują się pomiędzy sobą za pomocą mechanizmów *quorum sensing* (sygnały wyczuwania liczebności) oraz *quorum quenching* (hamowanie sygnałów) (93). Struktura biofilmu zapewnia dostęp substancji odżywczych oraz

usuwanie metabolitów drobnoustrojów poprzez system kanałów otaczających mikrokolonie wewnątrz biofilmu. Drobnoustroje wewnątrz tej struktury charakteryzują się zwolnionym metabolizmem oraz są chronione przez substancję białkową o charakterze śluzowym przed czynnikami zewnętrznymi, na przykład mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza, penetracją antybiotyków i przeciwciał. Te właściwości sprawiają, że drobnoustroje wewnątrz biofilmu są niewrażliwe na działanie antybiotyków (23,92,94–97). Natomiast biofilm na powierzchni rany jest źródłem zakażenia okolicznych tkanek oraz punktem wyjścia zakażenia uogólnionego, gdyż bakterie zanurzone w śluzie cały czas się namnażają w zwolnionym tempie i podlegają zmianom fenotypowym warunkującym ich oporność i zjadliwość (89,91,98). Miejscowe opatrunki, antybiotyki i antyseptyki nie są skuteczne w usuwaniu biofilmu. Najlepszą obecnie stosowaną metodą jest mechaniczne jego usuwanie z powierzchni rany – ang. *wound debridement* (91,99).

1.11. Leczenie ran przewlekłych

Rana przewlekła jest wypadkową patologicznych procesów w organizmie, które doprowadziły do jej wystąpienia, co sprawia, że wygojenie rany jest bardzo utrudnione. Dlatego też leczenie wymaga podejścia holistycznego do pacjenta. Przede wszystkim należy aktywnie poszukiwać przyczyny wystąpienia rany (uraz, ucisk, samoistne pęknięcie, zakłucie, ugryzienie przez zwierzę), a następnie rozstrzygnąć, czy rana występuje w przebiegu niewydolności naczyniowej (żylna, tętnicza) lub w cukrzycy oraz wziąć pod uwagę inne, rzadkie schorzenia, takie jak: piodermia zgorzelinowa, raki i chłoniaki skóry, porfiria, sferocytoza i inne. Bardzo ważne jest, aby

wyeliminować czynniki utrudniające gojenie rany lub poprawić warunki gojenia poprzez kontrolę glikemii, ciśnienia tętniczego, eliminację używek (alkohol, nikotyna), wzrost aktywności fizycznej. Istotny jest również stan odżywienia – zarówno niedożywienie, jak i otyłość utrudniają prawidłowe gojenie. Immunosupresja hamuje procesy gojenia oraz zwiększa ryzyko infekcji, dlatego należy uzupełnić wywiad o obecność infekcji reowirusowej, nowotwory, choroby reumatologiczne i niedobory odporności oraz stosowane leki, takie jak: glikokortykosteroidy, metotreksat, cyklosporyna czy też leki przeciwnowotworowe. Leki flebotropowe i przeciwzakrzepowe: sulodeksyd, diosmina oraz cilostazol i leki obniżające poziom cholesterolu mają bardzo korzystny wpływ na procesy gojenia. W planowaniu opieki nad raną przewlekłą ważny jest tryb życia pacjenta – jego codzienne funkcjonowanie, możliwość skorzystania z opieki osób najbliższych lub dostęp do procedur medycznych (27,44,100).

Prawidłowe ukierunkowanie leczenia może być wdrożone po ustaleniu rodzaju patologii naczyniowej – żylna (owrzodzenie żyłne), tętnicza (owrzodzenie tętnicze), z ucisku (odleżyna, stopa cukrzycowa), neuropatia, deformacja w obrębie stopy. Różnicowanie pomiędzy niewydolnością żylną a inną przyczyną wystąpienia trudno gojącej się rany jest niezwykle istotne, gdyż terapią z wyboru w niewydolności żylniej jest kompresjo-terapia przy użyciu bandażu lub innych opatrunków uciskowych oraz, przy istniejącej komponente limfatycznej, stosowanie pompy pneumatycznej. Gdy powyższe sposoby zawodzą, należy podjąć interwencję chirurgiczną dotyczącą żył głębokich, powierzchownych lub perforatorów. W niewydolności tętniczej ucisk pogłębia patologię niedokrwienną, w pierwszej kolejności należy rozważyć leczenie operacyjne w celu udrożnienia naczyń i poprawy ukrwienia (13,27).

W roku 2002 grupa ekspertów leczenia ran opisała prosty model opieki nad raną przewlekłą, który może być zastosowany również przez pacjentów, w literaturze funkcjonujący w postaci akronimu TIME. Koncepcja ta opisuje kluczowe etapy nadzoru nad łożyskiem rany. Poszczególne litery akronimu oznaczają działania, jakie należy podjąć lub elementy, o których należy szczególnie pamiętać na danym etapie leczenia:

T – ang. *Tissue debridement* (oczyszczenie tkanek)

I – ang. *Infection control* (nadzór nad infekcją)

M – ang. *Moisture* (nawilżenie rany)

E – ang. *Edges* (brzeży rany) (101–103).

Leczenie każdej rany przewlekłej zaczyna się od jej oczyszczenia (ang. *debridement*). Optymalną metodę oczyszczenia należy dobrać w zależności od etiologii rany (owrzodzenia tętnicze należy potraktować bardzo delikatnie), umiejętności leczącego oraz preferencji i możliwości finansowych pacjenta. Najbardziej skuteczne jest oczyszczenie mechaniczne (skalpel, łyżeczka chirurgiczna, ultradźwięki, nóż wodny) – usuwa się martwicę, włóknik, biofilm, stosuje się również oczyszczenie enzymatyczne, przy użyciu preparatów enzymatycznych oraz larw *Lucilia sericata*. Powolny efekt autolityczny można uzyskać przy pomocy hydrożeli i hydrokoloidów. Wysoką aktywność oczyszczającą wykazują także alginiany, miód Manuka oraz opatrunki hydrowłókniste i poliakrylanowe z lipokoloidami (15,17,89,100,101,104–110).

Koniecznym działaniem terapeutycznym powstrzymującym przed rozwojem infekcji jest stosowanie preparatów z komponentą przeciwbakteryjną – mają one za zadanie redukcję liczby drobnoustrojów do bezpiecznej dla procesu gojenia rany. Przy braku objawów infekcji

wokolicy rany (cellulitis, ropień) oraz ogólnych zaleca się leki przeciwbakteryjne do stosowania miejscowego. Eliminację drobnoustrojów można uzyskać również poprzez zastosowanie terapii fagowej (111).

Prawidłowe gojenie może odbywać się w środowisku wilgotnym. Jeśli rana jest wysuszona, procesy ziarninowania i naskórkowania przebiegają wolniej, natomiast rany z obfitym wysiękiem (enzymy proteolityczne tkankowe i bakteryjne) należy zaopatrzyć opatrunkiem absorbcyjnym.

Właściwe opracowanie brzegów rany to element konieczny do inicjacji procesu epitelizacji, gdyż z brzegów rany napęczają fibroblasty oraz keratynocyty, doprowadzając do gojenia. Brzegi rany nie mogą wysychać, nie mogą podlegać też maceracji, gdyż może dojść do obumierania komórek naskórka (20,21,69,101,112).

Skuteczność prowadzonego leczenia może być oceniana m.in. poprzez obserwację łożyska rany, badanie mikrobiologiczne treści z rany, pomiar wymiarów rany (pole powierzchni). Po 4 tygodniach leczenia wyraźnie jest widoczna tendencja, czy gojenie będzie przebiegało sprawnie. Opisywano korzystny trend, jeśli w ciągu 4 tygodni leczenia powierzchnia rany zmniejszyła się o 50%. Wówczas wygojenie było prawdopodobne w 58%, jeśli nie, prawdopodobieństwo wygojenia rany wynosiło tylko 9% (33,113,114).

Inne metody leczenia są stosowane zazwyczaj, gdy rana nie poddaje się leczeniu pomimo zastosowania odpowiednich metod terapeutycznych. Jedną z nich jest terapia podciśnieniowa – umożliwia drenaż treści z rany, przyspiesza ziarninowanie, obkurczanie brzegów rany, umożliwia zamknięcie rany na drodze chirurgicznej (szew odroczone lub przeszczep) lub samoistne wygojenie.

Uznaną metodą jest terapia tlenem, a wśród nich najwcześniej wykorzystywane w medycynie hiperbaryczna terapia tlenowa (HBOT), zalecana szczególnie u pacjentów ze stopą cukrzycową. Terapia taka stosowana jest z powodzeniem w zespole stopy cukrzycowej oraz w ranach przewlekłych pochodzenia tętniczego – natlenowanie obszaru rany w ramach HBOT wspomaga ukrwienie tej okolicy i przyspiesza gojenie. Terapia tlenem jest również stosowana w leczeniu miejscowym (TOT - ang. *Topical Oxygen Therapy*). Wyróżnia się kilka typów tej terapii: terapia miejscowa wysokociśnieniowa cykliczna (TWO₂ – ang. *Topical Wound Oxygen*), stała niskociśnieniowa w komorze tlenowej, ciągła niskociśnieniowa – tlen dostarczany jest do opatrunku okluzyjnego poprzez dreny (CDO – ang. *Continuous Delivery of non-pressurized Oxygen*), terapia tlenem uwalniającym się ze specjalistycznych opatrunków oraz transfer tlenu z oczyszczonej hemoglobiny (spray) (11,115–121).

Innymi metodami są metody biofizyczne – udowodniono, że stymulacja elektryczna oraz promieniowanie elektromagnetyczne określonej długości powodują wzrost produkcji tlenu azotu oraz wielu czynników wzrostu, co skutkuje mobilizacją komórkową, angiogenezą oraz przyspieszeniem gojenia rany.

Inną metodą leczenia jest terapia biologiczna – w wyniku metod bioinżynierii uzyskano rekombinowane czynniki wzrostu – płytkowy (rhPDGF), fibroblastów (rhFGF) oraz naskórkowy (rhEGF). Dwa pierwsze stosuje się na ranę w postaci żelu lub aerozolu.

Terapia acellularna (skórna, owodniowa, kolagenowa) inicjuje angiogenezę, promuje tworzenie ziarniny i regenerację tkanek.

W wyniku metod bioinżynierii uzyskano możliwość terapii komórkowej, której przykładem jest substytut skóry, odpowiadający

właściami dwuwarstwowemu przeszczepowi skóry, który z powodzeniem można stosować do pokrycia czystych ran przewlekłych.

Duże nadzieje budzi również terapia multipotencjalnymi komórkami macierzystymi, które są zdolne do naprawy uszkodzeń skóry poprzez funkcję parakrynną – syntetyzują czynniki wzrostu i cytokiny, przyspieszając migrację komórek, ich proliferację i aktywność metaboliczną (13,17,69,99,101,105,108,122–124).

1.12. Zastosowanie HBOT w leczeniu ran przewlekłych

Zaopatrzenie tkanek w tlen i prawidłowe ciśnienie tlenu w tkankach jest podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za prawidłowe gojenie. Tlen jest kluczowym czynnikiem dla metabolizmu tlenowego i produkcji energii i jest wykorzystywany nie tylko aktywnego namnażania się komórek, ale również wchodzi w reakcję z wieloma cytokinami oraz jest substratem do tworzenia wolnych rodników przez neutrofile. Poprawia również elastyczność erytrocytów i redukuje agregację płytek krwi (125,126).

W sąsiedztwie rany przewlekłej dochodzi do hipoksji, ciśnienie tkankowe tlenu w tej sytuacji wynosi około 5 mmHg, natomiast rana wymaga do procesu gojenia ciśnienia tlenu około 20 mmHg. Dlatego też w ranie przewlekłej w sytuacji niskiego natlenowania powstaje więcej tkanek martwiczych, co sprzyja również kolonizacji bakteryjnej. Z jednej strony więc warunki w ranie przewlekłej ułatwiają wzrost drobnoustrojów, z drugiej – uniemożliwiają ich eliminację.

Zastosowanie HBOT poprawia warunki mikrokrążenia, poprawia metabolizm komórkowy, a zachowując międzykomórkowe poziomy ATP,

redukuje oksydacyjne uszkodzenie komórek, moduluje efekt niedokrwienia. HBOT stymuluje również proliferację fibroblastów, poprawia syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, zwiększa się tworzenie kolagenu i jego kumulacja, stymuluje wzrost naczyń i tworzenie sieci mikrokrążenia. HBOT zmniejsza również tworzenie obrzęku, zmniejsza uszkodzenie powstające w tkance niedokrwionej w wyniku reperfuzji poprzez zwiększenie produkcji wolnych rodników, moduluje odpowiedź immunologiczną. Zmniejsza procesy infekcyjne w ranie nie tylko wywołane przez bakterie beztlenowe, na które wywiera bezpośrednie działanie toksyczne, ale także bakterie tlenowe poprzez wzrost zdolności bakteriobójczych neutrocytów. Efekt bakteriobójczy HBOT opisano względem drobnoustrojów: *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* i *Enterococcus faecalis*. Ponadto, opisano efekt synergistyczny z niektórymi antybiotykami: linezolidem, wankomycyną, teikoplaniną, ciprofloksacyną oraz imipenemem (11,17,115,116,118,119,127–129).

Terapia tlenem hiperbarycznym polega na umieszczeniu pacjenta na 60-90 minut w komorze z podwyższonym ciśnieniem atmosferycznym 1,5 – 3 ATA (atmosfer absolutnych), co odpowiada 1520 mmHg, oraz podaniu pacjentowi do oddychania czysty tlen. Podczas oddychania tlen dyfunduje poprzez barierę pęcherzykową do krwi, gdzie nie tylko łączy się z hemoglobina, ale również, w warunkach zwiększonego ciśnienia, rozpuszcza się w surowicy i dociera droga układu krążenia do wszystkich tkanek i narządów.

Przeciwwskazaniem bezwzględnym do prowadzenia tego leczenia jest odma opłucnowa oraz możliwość jej powstania u pacjentów z rozedmą płuc. Innymi przeciwwskazaniami są niektóre choroby przewlekłe, takie jak: astma, POChP oraz padaczka, ciężka klaustrofobia. Czasowym

przeciwskazaniem do prowadzenia terapii są ostre stany gorączkowe, infekcje dróg oddechowych, uszu, nosa i zatok.

Wskazań do leczenia HBOT jest wiele, wymienia się przede wszystkim zator gazowy, zatrucie tlenkiem węgla, zamknięcie tętnicy siatkówki, inwazyjne zakażenia bakteriami beztlenowymi (zgorzel gazowa, zgorzel Fourniera), choroba dekompresyjna, zapalenie kości, szczególnie w przebiegu zespołu stopy cukrzycowej, przewlekłe rany kończyn dolnych, szczególnie z nasiloną komponentą tętniczą (115,117,127,130).

2. Cele pracy

Celem pracy była ocena statusu mikrobiologicznego owrzodzeń u pacjentów z raną przewlekłą leczonych tlenem hiperbarycznym i przeanalizowanie zmian w nim zachodzących w czasie 6 tygodni obserwacji oraz możliwego wpływu tych zmian na gojenie. W niniejszej pracy za status mikrobiologiczny uznano obecność mikroorganizmów w ranie w określonym składzie gatunkowym oraz w określonej liczebności. Aby zrealizować cel pracy, zdefiniowano następujące zadania badawcze:

1. Analizę gatunkową i grupową drobnoustrojów w ranie w zależności od: rodzaju owrzodzenia, czas trwania rany i pola powierzchni rany oraz stosowanej antybiotykoterapii oraz jej zmienność w czasie prowadzonego HBOT.
2. Analizę liczebności drobnoustrojów w materiale pobranym z rany w mikroskopii bezpośredniej oraz w posiewie.
3. Analizę liczebności drobnoustrojów w ranie w zależności od: rodzaju owrzodzenia, czas trwania rany i pola powierzchni rany oraz stosowanej antybiotykoterapii oraz jej zmienność w czasie prowadzonego HBOT.
4. Analizę gojenia rany w zależności od: rodzaju owrzodzenia, czasu trwania rany, pola powierzchni rany, gatunków lub grup drobnoustrojów oraz ich liczebności w ranie.
5. Wyznaczenia profilu gojenia się rany.

3. Materiały

Badanie obejmowało pacjentów, którzy zostali zakwalifikowani z powodu trudno gojącej się rany do leczenia tlenem hiperbarycznym (HBOT) w Klinice Medycyny Hiperbarycznej i Ratownictwa Morskiego w Gdyni (KMHiRM). Pacjenci byli kierowani przez lekarzy ze specjalnością: dermatologia, medycyna rodzinna oraz chirurgia. Zgodnie z zasadami pracy, lekarzem prowadzącym pacjenta był lekarz kierujący na HBOT, zaś lekarze KMHiRM ingerowali w leczenie pacjenta na drodze konsultacji.

Kwalifikacja do terapii tlenem hiperbarycznym odbywała się około dwóch tygodni przed rozpoczęciem leczenia. Jednym z wymagań do kwalifikacji u pacjenta z raną przewlekłą było przedstawienie wyniku posiewu wymazu z rany pobranego do 1-2 tygodni przed przystąpieniem do leczenia. Pacjent był zobligowany również do dostarczenia aktualnego zdjęcia RTG klatki piersiowej oraz, w przypadku zmian naczyniowych tętnic lub żył w badaniu dopplerowskim, konsultacji chirurga naczyniowego.

Leczenie tlenem hiperbarycznym w KMHiRM było związane z uczestnictwem pacjentów w trzydziestu jednogodzinnych sesjach w komorze hiperbarycznej, które odbywały się w trybie ambulatoryjnym pięć dni w tygodniu przez okres sześciu tygodni. Pacjenci mieli wyznaczoną stałą godzinę sesji HBOT od poniedziałku do piątku. Jeden raz w tygodniu dokonywano oceny rany. Podczas tego przeglądu rana była fotografowana oraz opisywana w systemie komputerowym, odnotowywano dolegliwości pacjenta oraz ustalano zalecenia dalszego postępowania z raną. Autorka niniejszego opracowania, na potrzeby niniejszego badania, dokonywała również pomiaru rany, dokumentacji

fotograficznej rany, pobierała wymaz z rany według ustalonej procedury oraz wypełniała odpowiednie kwestionariusze (Załącznik 11.1 i 11.2). Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

3.1. Kryteria włączenia i wyłączenia

Do badania kwalifikowano osoby skierowane na leczenie w KMHiRM w trybie ambulatoryjnym, u których stwierdzano obecność trudno gojącej się rany na kończynie dolnej. Pacjenci byli zapoznawani z procedurą udziału w badaniu oraz wyrażali świadomą zgodę na 6-tygodniową obserwację z towarzyszącym pobraniem wymazu na badanie mikrobiologiczne.

Przyjęto następujące kryteria włączenia pacjenta do badania:

1. Czas trwania rany był podstawowym kryterium włączenia pacjenta do badania. Przyjęto najkrótszy czas trwania rany 4 tygodnie od jej wystąpienia.
2. Do badania kwalifikowano rany zlokalizowane na podudziu lub w obrębie stopy, wykluczając lokalizację powyżej kolana.
3. Kolejnym kryterium była głębokość anatomiczna rany. Kwalifikowano do badania pacjentów z owrzodzeniem płytkim, obejmującym skórę i tkankę podskórną. Oceniano pacjentów po opracowaniu chirurgicznym rany, po usunięciu martwicy i zalegającego włókniaka.

4. Ostatnim kryterium była etiologia rany. Włączono do badania pacjentów z owrzodzeniem na tle niewydolności żylniej, tętniczej oraz innej, w tym owrzodzenia w zespole stopy cukrzycowej i pourazowe.

Z badania wyłączono:

1. Pacjentów nie zakwalifikowanych do HBOT przez lekarza KMHiRM.
2. Pacjentów w wieku poniżej 18 lat.
3. Pacjentów nie wyrażających zgody na udział w badaniu.
4. Pacjentów z raną zlokalizowaną powyżej kolana.
5. Pacjentów, którzy mieli owrzodzenie głębokie, drażące do ścięgien i kości.
6. Nie zakwalifikowano do udziału w badaniu pacjentów z raną przewlekłą o charakterze odleżyn oraz z ranami występującymi w przebiegu chorób układowych, z owrzodzeniem w przebiegu procesu nowotworowego, owrzodzeniem powstałym na skutek radioterapii.

3.2. Grupa badana

W badaniu przeprowadzonym w latach 2012 - 2016 udział wzięło 43 pacjentów w wieku 34-89 lat (średnia 69,3; mediana 72,0 lata), w tym 14 kobiet – 32,6% (średnia 74,7; mediana 75,0 lat) i 29 mężczyzn – 67,4% (średnia 66,7; mediana 66,0 lat). Powyższe dane są przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Wiek pacjentów z uwzględnieniem płci. Wyjaśnienie nagłówek kolumn znajduje się na stronie 53.

Płeć	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Wszyscy pacjenci	43	69,3	10,7	34,0	62,0	72,0	78,0	89,0
Kobiety	14	74,7	5,9	60,0	70,7	75,0	81,0	81,0
Mężczyźni	29	66,7	11,5	34,0	59,0	66,0	73,0	89,0

Rozkłady wieku kobiet i mężczyzn są statystycznie istotnie różne (Test Wilcoxon, $W=302,5$; $p<0,010$). W badanej grupie wiek kobiet był wyższy.

Sześciu z 43 pacjentów (11,63%) nie ukończyło 6-tygodniowego okresu obserwacji (trzech pacjentów – hospitalizacja, 1 zgon, 1 ciśnieniowa perforacja błony bębenkowej, 1 przeszczep skóry na owrzodzenie z dobrym efektem – wyleczenie), dodatkowo, jeden pacjent nie uczestniczył regularnie w sesjach w komorze hiperbarycznej (nieobecność w jednym tygodniu).

U badanych pacjentów przeanalizowano 46 ran (u trzech pacjentów analizowano jednocześnie dwie rany). Wszyscy pacjenci zostali włączeni do analiz, jednakże w pierwszym tygodniu uczestniczyło w badaniu 43 pacjentów (46 ran), w ostatnim tygodniu 37 pacjentów (40 ran).

Rany były zlokalizowane na podudziu (22 rany – 47,8%) lub na stopie (24 rany – 52,2%).

Podstawowymi parametrami oceny rany w niniejszym badaniu były: typ owrzodzenia (tętnicze, żyłne, inne oraz zespół stopy cukrzycowej obecny i nieobecny), czas trwania rany i pole powierzchni rany.

Czas trwania rany odnotowany w dniu przyjęcia na HBOT w KMHiRM wynosił od 1 miesiąca do 42 lat. Wielkość rany w pierwszym tygodniu obserwacji wynosiła od 1 cm² do 600 cm², w szóstym tygodniu od 0,2 cm² do 600 cm². W Tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące czasu trwania rany.

Tabela 2. Statystyki opisowe czasu trwania rany.

Zmienna	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Czas trwania w miesiącach	46	44,7	105,7	1	3	6	24	504

Pomiaru pola powierzchni ran dokonano w pierwszym tygodniu dla 45 ran. Sposób wykonania pomiarów podano w podrozdziale: Podział ran na grupy według kryterium czasu trwania i wielkości rany. Poniższa tabela zawiera informacje dotyczące pola powierzchni badanych ran (Tabela 3).

Tabela 3. Pole powierzchni ran w pierwszym tygodniu obserwacji (T1).

N	Pole powierzchni rany [cm²]						
	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
45	85,9	174,7	1	4,2	12	54,8	600

20 ran występowało u pacjentów, którzy chorowali na cukrzycę (20 z 46; 43,5%), w tym w 11 przypadkach ran (11 z 20; 55,0%) zdiagnozowano zespół stopy cukrzycowej. Dane te są przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Zależność występowania zespołu stopy cukrzycowej i cukrzycy.

Grupa	Zespół stopy cukrzycowej		Razem
	Nie	Tak	
Cukrzyca: Nie	26 (100%)	0 (0%)	26 (100%)
Cukrzyca: Tak	9 (45%)	11 (55%)	20 (100%)
Razem	35 (76,1%)	11 (23,9%)	46 (100%)

Rany podzielono na trzy grupy ze względu na dominującą komponentę patologii naczyniowej: tętniczą, żylną i inną (Tabela 5). W obserwowanej grupie badawczej najczęstszą przyczyną powstania owrzodzenia była niewydolność naczyniowa.

Tabela 5. Liczba i częstość występowania analizowanych typów owrzodzenia.

Typ owrzodzenia	Tętnicze	Żylne	Inne	Razem
Liczba ran (%)	18 (39,1%)	17 (37,0%)	11 (23,9%)	46 (100%)

Rany podzielono również ze względu na występowanie zespołu stopy cukrzycowej. W trzech przypadkach w zespole stopy cukrzycowej dominowała komponenta tętnicza. W sytuacjach, kiedy dla zespołu stopy cukrzycowej nie ustalono dominującej komponenty naczyniowej, zaliczono go do innego typu owrzodzenia. W grupie 11 pacjentów z inną patologią naczyniową u ośmiu rozpoznano zespół stopy cukrzycowej. Zależność typu owrzodzenia i wystąpienia zespołu stopy cukrzycowej przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Zależność występowania zespołu stopy cukrzycowej i typu owrzodzenia.

Kategoria	Tętnicze	Żylne	Inne
Stopa Cukrzycowa: Nie	15 (42,8%)	17 (48,6%)	3 (8,6%)
Stopa Cukrzycowa: Tak	3 (27,3%)	0 (0%)	8 (72,7%)

Charakterystyki statystyczne wieku pacjentów z raną przewlekłą typu tętniczego, żylnego oraz inną zamieszczono w Tabeli 7, natomiast charakterystyki wieku pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej i bez tego rozpoznania – w Tabeli 8.

Tabela 7. Wiek pacjentów z uwzględnieniem typu owrzodzenia.

Rodzaj owrzodzenia	N	Średnia wieku	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Tętnicze	18	69,3	12,3	34,0	62,5	72,5	78,2	85,0
Żylne	17	71,6	8,3	48,0	67,0	73,0	77,5	81,0
Inne	11	67,0	10,7	55,0	60,0	62,0	72,0	89,0

Tabela 8. Wiek pacjentów ze stopą cukrzycową.

Rodzaj owrzodzenia	N	Średnia wieku	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Stopa Cukrzycowa: Nie	35	69,5	10,7	34,0	64,0	72,0	78,0	85,0
Stopa Cukrzycowa: Tak	11	69,9	10,4	56,0	60,0	70,0	81,0	89,0

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy rozkładzie wieku pacjentów w typach owrzodzeń: tętniczego, żylnego i innych. Nie stwierdzono również różnic w rozkładzie wieku pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej.

W trakcie obserwacji pacjenci mieli stosowane opatrunki według zaleceń lekarzy kierujących na HBOT, były to opatrunki ze srebrem lub z miodem Manuka zakładane po dezynfekcji rany preparatem octenidyny z fenoksyetanołem (octenisept®) (131). 21 pacjentów (48,84%) było leczonych antybiotykami przez okres 1 do 4 tygodni. Jednego pacjenta w pierwszych dniach HBOT hospitalizowano i zastosowano imipenem dożylnie. U 1 pacjenta była stosowana miejscowo gentamycyna przez 7 dni. U wszystkich pacjentów były podawane antybiotyki celowane. Najczęściej stosowana była ciprofloksacyna (12 pacjentów), amoksycyлина z kwasem klawulanowym (5 pacjentów), klindamycyna (4 pacjentów), gentamycyna (2 pacjentów), cefuroksym (2 pacjentów). Pojedyncze kuracje odnotowano w przypadku następujących antybiotyków: trimetoprim/sulfametoksazol, metronidazol, doksycyklina, amikacyna, imipenem. Pacjenci przyjmowali najczęściej jeden antybiotyk (15 pacjentów), ale również dwa antybiotyki (3 pacjentów), a także trzy antybiotyki (3 pacjentów). Częstość stosowania antybiotyków w tygodniach od pierwszego do szóstego (T1-T6) zaprezentowano w Tabeli 9.

Tabela 9. Liczba ran i częstość stosowania antybiotyków w tygodniach T1-T6.

Antybiotyk	T1	T2	T3	T4	T5	T6
AMC	5 (10,9%)	2 (4,3%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	2 (4,3%)
CIP	8 (17,4%)	5 (10,9%)	6 (13,0%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)
AK	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)
DOX	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)

Antybiotyk	T1	T2	T3	T4	T5	T6
DA	2 (4,3%)	1 (2,2%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
CXM	2 (4,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
GM	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)
SXT	1 (2,2%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)
MZ	1 (2,2%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IPM	0 (0,0%)	1 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Bez antybiotyku	31 (67,4%)	35 (76,1%)	34 (73,9%)	33 (71,7%)	35 (76,1%)	34 (73,9%)
Brak danych	0 (0,0%)	2 (4,3%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	8 (17,4%)	6 (13,0%)

Tabela 10 przedstawia liczbę ran u pacjentów, u których stosowano antybiotyki. W sześciotygodniowym cyklu HBOT w ambulatorium przy KMHiRM pacjenci byli leczeni od jednego do trzech preparatów antybiotyków. W 21 ranach nie stosowano antybiotyków w czasie HBOT.

Tabela 10. Stosowanie antybiotyków.

Liczba antybiotyków	Liczba ran
Nie stosowano	21
Jeden antybiotyk	18
Dwa antybiotyki	4
Trzy antybiotyki	3

4. Metody badań

4.1. Metody kliniczne

Pacjenci, którzy uczestniczyli w badaniu, mieli zakładaną kartę pacjenta oraz kartę obserwacji rany, utworzone dla celów niniejszego badania (Załącznik 11.1 i 11.2). Przy każdej wizycie odnotowywano informacje dotyczące rany: wielkości, stanu dna rany, stanu brzegów rany, oceniano wygląd i zapach wysięku z rany, stan okolicznej skóry, ból przy zmianie opatrunków. Odnotowywano również stosowanie środków przeciwbakteryjnych miejscowo i ogólnie oraz ewentualne interwencje chirurgiczne.

Następnie przygotowano ranę do pobierania wymazu, aby pozbyć ją włókniaka, wydzieliny oraz resztek opatrunku – według instrukcji utworzonej dla celów tego badania oraz pobrano wymazy treści z rany metodą Donovaną (duże rany) lub Levine'a (małe rany). Po powierzchni dużej rany przetaczano wymazówką, kreśląc kilkakrotnie znak zbliżony do litery „Z” (tzw. „zig-zag”). Wykonywano na powierzchni rany 10 ruchów w postaci linii łączących 10 punktów marginesu rany, oddalonych około 0,5 cm od jej brzegów. Obracano wymazówkę kilkakrotnie, aby równomiernie rozprowadzić na niej materiał i wysycić ją w całości płynem z powierzchni rany. Rany o małym polu powierzchni (około 1 cm² lub mniejszym), na którym nie można zastosować metody Donovaną, były wymazywane metodą Levine'a. Do powierzchni rany przykładano wymazówkę i uciskano nią ranę do czasu pojawienia się płynu

tkankowego oraz kilkakrotnie obracano wymazówką w miejscu ucisku przez okres 5 sekund (Załącznik 11.3).

Do pobierania treści z rany używano zestawów Sigma Transwab® MW176S (MWE). Podłoże było tak dobrane, aby zapewnić właściwe warunki transportu drobnoustrojom tlenowym oraz beztlenowym. Dodatkowo, unikalnym elementem zestawu, była wymazówka wykonana z poliuretanu, o wyjątkowej chłonności oraz właściwości zwiększonego zwrotnego uwalniania zawartości próbki do specjalistycznego podłoża (132,133). Po pobraniu materiał umieszczano w podłożu transportowym płynnym, wchodzącym w skład zestawu. Transport materiału odbywał się w temperaturze pokojowej, a posiewu dokonywano w ciągu 1 godziny od pobrania (Załącznik 11.4).

4.1.1. Podział ran na grupy według kryterium czasu trwania i pola powierzchni rany

Na użytek niniejszego opracowania, podzielono rany na trzy grupy ze względu na ich czas trwania odnotowany w pierwszym tygodniu badania (T1). Pierwszą grupę stanowiły rany, które wystąpiły do 3 miesięcy przed rozpoczęciem badania (na potrzeby niniejszego badania nazwano ją grupą: rany „młode”) drugą grupę – rany, które trwały od powyżej 3 miesięcy do ukończenia 1 roku (rany „średnie”) oraz trzecią - rany trwające powyżej 1 roku od rozpoczęcia badania (rany „stare”). Częstość w grupach czasu trwania rany zostały przedstawione w Tabeli 11.

Tabela 11. Liczba i częstość klasyfikacji czasu trwania rany.

Zmienna	≤ 3 miesięcy	Powyżej 3 do 12 miesięcy	> 12 miesięcy
Czas trwania rany	14 (30,4%)	16 (34,8%)	16 (34,8%)

Na fotografiach poniżej zobrazowano rany z trzech grup ze względu na czas ich trwania.



Fotografia 1. Rana „młoda”, trwająca 4 tygodnie, pacjent 12420.



Fotografia 2. Rana „średnia”, trwająca 8 miesięcy, pacjent 13243.



Fotografia 3. Rana „stara”, trwająca 12 lat, pacjent 15485.

Pomiarów ran dokonano w dwóch wymiarach (horyzontalnym i wertykalnym), pierwszego i szóstego tygodnia obserwacji (T1 i T6). Proces mierzenia ran odbywał się przy pomocy jednorazowej linijki. Pole powierzchni obliczono przez pomnożenie dwóch wymiarów rany, według Sheehana i wsp. (114). Na użytek pracy przyjęto podział na trzy klasy pola powierzchni rany: rany o polu powierzchni do 1 cm^2 („małe”), rany o wielkości mieszczącej się w przedziale powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2 („średnie”), rany o polu powierzchni powyżej 10 cm^2 („duże”). W T1 pomiary wykonano dla 45 ran. Pomiar w T6 dotyczył 40 ran (Tabela 13). Fotografie poniżej przedstawiają wybrane rany z trzech kategorii wielkości.



Fotografia 4. Rana „mała” palucha (1 cm²), pacjent 12486.



Fotografia 5. Rana „średnia” podudzia (6 cm²), pacjent 13468.



Fotografia 6. Rana „duża” podudzia (250 cm²), pacjent 15044.

4.2. Metody laboratoryjne

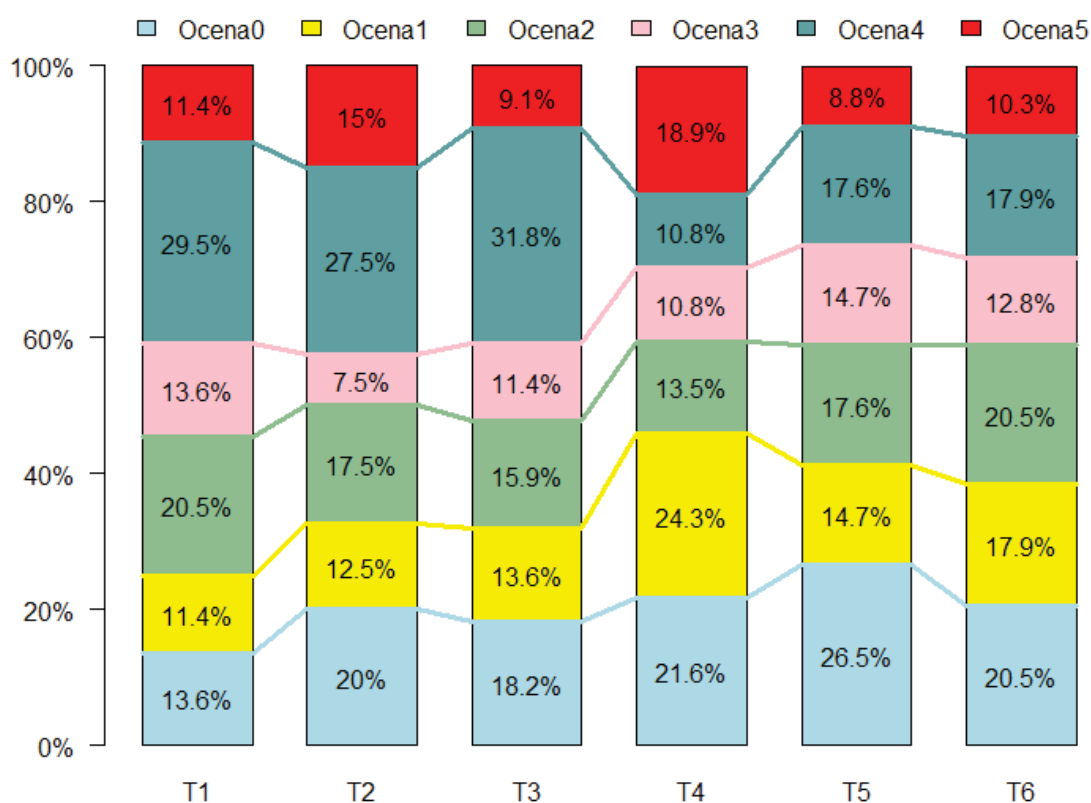
4.2.1. Metoda mikroskopii bezpośredniej

Preparat mikroskopowy treści z rany wykonano dla 238 z 251 próbek (94,82%). Oceniany był następnie przez autorkę pracy pod kątem obecności leukocytów oraz drobnoustrojów. W celu przygotowania preparatu, pobrany materiał zawieszony w podłożu transportowym nanoszono na podstawowe szkiełko mikroskopowe, a następnie, po wysuszeniu i utrwaleniu w płomieniu palnika, zabarwiano metodą Grama.

Preparat oceniano przy użyciu mikroskopu Olympus CX41 na powiększeniu okularu 10-krotnym oraz obiektywu 100-krotnym z imersją (łącznie powiększenie 1000 razy). Liczbę leukocytów zliczano w polu

widzenia na powiększeniu 100-krotnym, zaś liczbę drobnoustrojów zliczano w polu widzenia na powiększeniu 1000-krotnym. Wynik podawano w postaci pólnościowej z przyporządkowaną numeracją poszczególnych przedziałów od 0 do 5. Sposób interpretacji wyników badania mikroskopowego przedstawia Załącznik 11.7.

Na Rysunku 1 przedstawione są rozkłady oceny pólnościowej drobnoustrojów w metodzie mikroskopii bezpośredniej w kolejnych tygodniach obserwacji. Największy odsetek preparatów mikroskopowych, w których nie stwierdzono drobnoustrojów był odnotowany w T5 (Ocena: 0 w 26,5% preparatów), zaś największy odsetek preparatów bogatobakteryjnych odnotowano w T4 (Ocena: 5 w 18,9%).



Rysunek 1. Ocena pólnościowa drobnoustrojów w preparatach mikroskopowych w kolejnych tygodniach obserwacji.

4.2.2. Metoda posiewu, identyfikacja i oznaczenie lekowrażliwości drobnoustrojów

Badanie zaplanowano w ten sposób, aby przeprowadzić analizę jakościową i ilościową drobnoustrojów tlenowych. Posiewy te wykonywano na podłoża: Columbia agar z 5% krwią baranią (COS firmy bióMerieux), Columbia agar z 5% krwią baranią i z kwasem nalidyksowym (CNA firmy bióMerieux), McConkey agar (MCK firmy GRASO) metodą seryjnych rozcieńczeń przy użyciu ez kalibrowanych o objętości 10 µl oraz dodatkowo inokulowano podłoże płynne BHI ezą o objętości 10 µl. Każdorazowo posiew ilościowy był wykonany dwukrotnie, liczbę drobnoustrojów obliczono jako średnią z dwóch posiewów i przedstawiono na wyniku w postaci liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) w 1 ml. Posiewy na podłożach z 5% krwią baranią inkubowano w warunkach atmosfery tlenowej wzbogaconej CO₂ w temperaturze 35-37°C.

Dokonano również oceny drobnoustrojów beztlenowych. W pierwszym i szóstym tygodniu obserwacji wykonano posiew półilościowy na podłoże Columbia agar z 5% krwią baranią z nałożeniem krążka bibułowego nasączonego gentamycyną. Posiew inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 35-37°C wykorzystując saszetkę Genbag anaer (bióMerieux). Technikę wykonania posiewów na podłoża stałe i płynne opracowaną przez autorkę pracy przedstawia Załącznik 11.4.

Identyfikacji drobnoustrojów dokonywano za pomocą aparatu Microflex LT (firmy Bruker Daltonik), z unikalnym systemem MALDI Biotyper, w którym identyfikacja przebiega przy użyciu metody spektrometrii masowej (MALDI-TOF) (134). Badanie wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Zaletą tej metody po pierwsze jest fakt, że do identyfikacji potrzebna jest bardzo niewielka ilość drobnoustrojów, wystarczy fragment kolonii bakteryjnej, po drugie, niezmiernie krótki czas

oczekiwania na wynik identyfikacji (2-5 minut), po trzecie, wielokrotnie większe spektrum oznaczanych gatunków (około 5 tysięcy różnych gatunków), w porównaniu do metod biochemicznych, które różnicują około 300 gatunków. Dlatego też tylko wyjątkowo identyfikację przeprowadzano przy użyciu aparatu Vitek 2 Compact (bióMerieux), w którym identyfikowane są drobnoustroje metodą biochemiczną (135). Zarówno podczas wykonywania identyfikacji, jak i lekowrażliwości na aparacie Vitek 2 Compact, postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Do wyhodowanych szczepów wykonano oznaczenie wrażliwości na antybiotyki metodą automatyczną (Vitek 2 Compact, bióMerieux) lub metodą dyfuzyjno – krążkową (Kirby-Bauera). Ocenę wrażliwości na antybiotyki wykonano według EUCAST (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) oraz CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (136,137). Wyjątkowo dokonywano jedynie odczytu stref zahamowania wzrostu w mm lub MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) bez interpretacji klinicznej (brak odpowiednich tablic do interpretacji wyników). W celu uzupełnienia diagnostyki, wykonano w wybranych przypadkach oznaczenie mechanizmu lekooporności (ESBL, MLSb) oraz inne testy konieczne dla potwierdzenia izolacji szczepów wielolekoopornych z określonym mechanizmem oporności (MRSA, VRE, ESBL, CRPA, CRAB).

4.2.3. Klasyfikacja drobnoustrojów

Ze względu na zaplanowane wykonanie analizy porównawczej wyników badań posiewu, 59 gatunków drobnoustrojów tlenowych podzielono na grupy. Wykaz izolowanych gatunków uszeregowany od najczęściej

występujących przedstawia Załącznik 11.9. Identyfikację podziału na grupy przedstawia Załącznik 11.8.

Kryterium podziału na grupy uwzględnia budowę drobnoustroju oraz jego potrzeby wzrostowe na podłożach sztucznych, niektóre cechy biochemiczne i serologiczne, możliwe do potwierdzenia podstawowymi testami dostępnymi w laboratorium mikrobiologicznym. W niektórych przypadkach uwzględnia także potencjalną patogenność lub brak patogenności w ranie oraz częstość występowania w wymazach z ran. Podział ten pozwolił na utworzenie 10 grup o różnej charakterystyce. Wyodrębniono dwie grupy, w których umiejscowiono po jednym gatunku drobnoustroju: *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Kolejne grupy to: *Helcococcus*, *Streptococcus* β -hemolizą, *Streptococcus anginosus* group, *Enterococcus*, *Enterobacterales*, pałeczki Gram-ujemne niefermentujące, *Staphylococcus* koagulazo-ujemny (CNS). Dla pozostałych gatunków drobnoustrojów utworzono grupę „Inne”. W skład tej grupy weszły drobnoustroje najczęściej niepatogenne, rzadko występujące w posiewach wymazów z ran. W Tabeli 12 zawarte są informacje dotyczące liczby i częstości gatunków w grupach.

Tabela 12. Liczba i częstość gatunków drobnoustrojów w analizowanych grupach.

Grupa drobnoustrojów	Liczba gatunków w grupie (%)
<i>S. aureus</i>	1 (1,7%)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (1,7%)
<i>Helcococcus</i>	2 (3,4%)
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	2 (3,4%)
<i>Streptococcus anginosus</i> group	3 (5,1%)
<i>Enterococcus</i>	3 (5,1%)
<i>Enterobacterales</i>	14 (23,7%)
PG(-) niefermentujące	12 (20,3%)
CNS	6 (10,2%)

Grupa drobnoustrojów	Liczba gatunków w grupie (%)
Inne	15 (25,4%)
Razem	59 (100%)

4.3. Metody statystyczne

W ramach statystycznej analizy opisowej, jako miarę położenia, przyjęto średnią i pięć nieparametrycznych charakterystyk Tukey'a: minimum (min.), kwartył 25% (Q25), mediana (Q50), kwartył 75% (Q75) i maksimum (maks.). Jako miarę rozrzutu przyjęto odchylenie standardowe (SD). Wyniki analiz zmiennych jakościowych przedstawiono przy pomocy tablic kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego.

Statystyczna analiza porównawcza zmian poszczególnych charakterystyk analizowanych wielkości (statystyka decyzyjna) przebiegała w oparciu o testy statystyczne. W przypadku porównań zmiennych ilościowych zdecydowano się na stosowanie metod opartych na teorii testów nieparametrycznych. W związku z tym decyzja o różnicy miar położenia była podejmowana w oparciu o test Wilcoxon'a stosowany dla prób zależnych lub niezależnych. W opracowaniach opartych na pakiecie Statistica, w przypadku testów niezależnych, używa się nazwy test U-Mana Whitneyego. W przypadku porównania badanej wielkości w kilku grupach stosowano tak samo testy Wilcoxon'a jako testy post-hoc. Dla globalnego porównania rozkładów, łącznie w kilku badanych podgrupach (więcej niż 2) stosowany był test Kruskala-Wallis'a. Zmienne jakościowe standardowo porównywane były na bazie dokładnego testu Fishera (*Fisher Exact test*). W przypadku większej liczby kategorii wykorzystywano również test Chi-kwadrat (χ^2) Pearsona.

Jako regułę przyjęto, by przy każdej decyzji zaznaczyć test przy pomocy którego weryfikowano postawioną hipotezę będącą podstawą decyzji, wartość statystyki testowej i poziom istotności odpowiadający błędowi pierwszego rodzaju dla tej hipotezy. Jako graniczny poziom przyjęto $p = 0,05$. W przypadku poziomu istotności mniejszego od 0,001 pisano zawsze $p < 0,001$. Jeśli poziom istotności był poniżej 0,05, to podejmowano decyzję o istotności różnicy lub częstości.

Obliczenia zostały wykonane z użyciem środowiska obliczeń statystycznych R w wersji 3.4.0.

5. Wyniki

5.1. Wyniki analizy głównych parametrów ran

Parametry, które określono, to typ owrzodzenia z podziałem na żyłne, tętnicze i inne oraz z podziałem na obecność lub nieobecność zespołu stopy cukrzycowej. Kolejnym istotnym, mierzalnym parametrem był czas trwania rany oraz pole powierzchni rany obliczone w dwóch momentach czasowych: w T1 oraz T6. Parametr pola powierzchni w T1 i T6 wykorzystano do konstrukcji wskaźnika oceny gojenia rany (patrz opis strona 57).

W Tabeli 13 podano informacje na temat pola powierzchni ran w T1 i T6 w trzech przedziałach pola powierzchni.

Tabela 13. Liczba i częstość klasyfikacji pola powierzchni rany.

Parametr	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
T1 Powierzchnia rany	3 (6,7%)	18 (40,0%)	24 (53,3%)
T6 Powierzchnia rany	10 (25,0%)	11 (27,5%)	19 (47,5%)

W pierwszym tygodniu obserwacji tylko trzy rany z 45 poddanych pomiarowi (6,7%) miały pole powierzchni mniejsze lub równe od 1 cm^2 , w grupie o średniej powierzchni (w tabeli oznaczono jako „Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2 ”) było 18 ran (40,0%), w grupie dużych ran - 24 rany (53,3%). W ostatnim tygodniu obserwacji na 40 ran występowało 10 (25,0%) małych ran, średnich - 11 (27,5%), dużych - 19 ran (47,5%).

Kolejna Tabela prezentuje wyniki opisujące pole powierzchni badanych ran (Tabela 14).

Tabela 14. Pola powierzchni ran w T1 i T6.

Tydzień obserwacji	N	cm ²						
		Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
T1	45	85,9	174,7	1	4,2	12	54,8	600
T6	40	89,2	184,2	0,2	1,1	9	47,2	600

Pole powierzchni rany było w T6 statystycznie istotnie mniejsze niż w T1 (Test Wilcoxon, $W=370,0$; $p<0,001$).

Zbadano także różnice w polu powierzchni ran w T1 i T6. W Tabeli 15 przedstawiono wyniki obliczeń zmiany pola powierzchni rany.

Tabela 15. Różnica pola powierzchni ran pomiędzy T6 i T1 [w cm²].

N	Pole powierzchni rany - różnica [cm ²]						
	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
40	-6,0	13,8	-56,0	-5,4	-1,7	0,0	16,5

Stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie pola powierzchni rany w T6 w odniesieniu do T1 (Test Wilcoxon, $W = 370,00$, $p < 0,001$).

Tabela 16 pokazuje zmiany przynależności ran do grup według kryterium ich wielkości po czasie 6 tygodni leczenia.

Tabela 16. Migracja pola powierzchni rany w grupach według kryterium wielkości.

Kategoria T1	≤ 1 cm ²	Powyżej 1 cm ² do 10cm ²	> 10 cm ²	Razem
≤ 1 cm ²	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Powyżej 1 cm ² do 10 cm ²	6 (40%)	8 (53,3%)	1 (6,7%)	15 (100%)
> 10 cm ²	1 (4,6%)	3 (13,6%)	18 (81,8%)	22 (100%)
Razem	10 (25,0%)	11 (27,5%)	19 (47,5%)	30 (100%)

Otrzymany wynik jest zgodny z wcześniej uzyskaną zależnością, to znaczy w T6 pole powierzchni rany statystycznie istotnie maleje (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[4] = 29,9$, $p < 0,001$). Na przykład średnia rana w T1 w 40%

zmałała, w 53% pozostała taka sama, a w 6,7% wzrosła. Ran dużych było 22 i 18 pozostało dużymi, ale 18% (4 rany) uległy zmniejszeniu. W 40% średnie rany uległy zmniejszeniu.

Wprowadzona została równocześnie kategoria związana ze zmianą pola powierzchni rany pomiędzy T1 i T6. Przyjęto, że proces gojenia rany był pozytywny, jeśli spadek pola powierzchni rany przekroczył 20% początkowej powierzchni rany. W tym sensie 42,5% ran miało poprawę (Tabela 17).

Tabela 17. Liczba ran i częstość w przypadku gojenia rany i bez gojenia.

Zmienna	Bez gojenia	Gojenie
Liczba ran (%)	23 (57,5%)	17 (42,5%)

Zadano pytanie o to, jaki jest związek typu owrzodzeń i czasem trwania rany. W tym celu przeprowadzono analizę zależności typu owrzodzenia od trzech ustalonych wcześniej przedziałów czasowych czasu trwania rany. Wyniki przedstawiono w Tabeli 18 i 19.

Tabela 18. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a czas trwania rany.

Kategoria	≤ 3 miesiące	Powyżej 3 do 12 miesięcy	> 12 miesięcy
Tętnicze	5 (27,8%)	6 (33,3%)	7 (38,9%)
Żyłne	3 (17,7%)	5 (29,4%)	9 (52,9%)
Inne	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0 (0%)

Nie stwierdzono różnic w rozkładzie czasu trwania rany w owrzodzeniach żylnym, tętniczym i innym, natomiast wykazano, że rany w zespole stopy cukrzycowej trwały statystycznie istotnie krócej niż pozostałe (Tabela 19 poniżej).

Tabela 19. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a czas trwania rany.

Kategoria	≤ 3 miesiące	Powyżej 3 do 12 mies.	> 12 miesięcy
Stopa Cukrzycowa: Nie	7 (20%)	12 (34,3%)	16 (45,7%)
Stopa Cukrzycowa: Tak	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0 (0%)

Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w częstości występowania ran „młodych” w przypadku, gdy rana była raną stopy cukrzycowej (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2]=10,3$; $p < 0,006$). W przypadku stopy cukrzycowej częściej występowały rany „młode”.

Kolejnym punktem oceny była zależność pomiędzy typem owrzodzenia a polem powierzchni badanych ran (wielkością ran). Ze względu na dwa terminy obserwacji ran (T1 i T6) przeanalizowano zależność typu owrzodzenia i pola powierzchni rany dwukrotnie: dla tygodnia T1 oraz T6.

Wyniki analiz są przedstawione w Tabelach 20-23.

Tabela 20. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a pole powierzchni rany w T1.

Kategoria w T1	≤ 1 cm²	Powyżej 1 cm² do 10cm²	> 10 cm²
Tętnicze	3 (17,6%)	7 (41,2%)	7 (41,2%)
Żylne	0 (0%)	4 (23,5%)	13 (76,5%)
Inne	0 (0%)	7 (63,6%)	4 (36,4%)

Stwierdzono statystycznie istotny związek typu owrzodzenia i pola powierzchni rany w T1 (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[4]=10,4$; $p < 0,035$). W ranach o typie Żylne najczęściej występują rany większe (76,5% vs. 41,2% i 36,4%), w ranach o typie Inne nie ma ran małych, a w typie Tętnicze ma miejsce zrównoważenie wielkości z przewagą ran średnich i dużych.

Tabela 21. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a pole powierzchni rany w T6.

Kategoria w T6	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
Tętnicze	5 (33,3%)	3 (20%)	7 (46,7%)
Żyłne	3 (17,7%)	4 (23,5%)	10 (58,8%)
Inne	2 (25%)	4 (50%)	2 (25%)

Dla T6 nie stwierdzono różnic w rozkładzie pola powierzchni w różnych typach.

Tabela 22. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a pole powierzchni rany w T1.

Kategoria w T1	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
Stopa Cukrzycowa: Nie	3 (8,8%)	10 (29,4%)	21 (61,8%)
Stopa Cukrzycowa: Tak	0 (0%)	8 (72,7%)	3 (27,3%)

Tabela 23. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a pole powierzchni rany w T6.

Kategoria w T6	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
Stopa Cukrzycowa: Nie	8 (25%)	6 (18,8%)	18 (56,2%)
Stopa Cukrzycowa: Tak	2 (25%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)

W stopie cukrzycowej rany są w T1 i w T6 statystycznie istotnie mniejsze (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[4]=6,7$ i $7,0$; $p < 0,035$ i $p < 0,030$).

5.2. Wyniki badań jakościowych

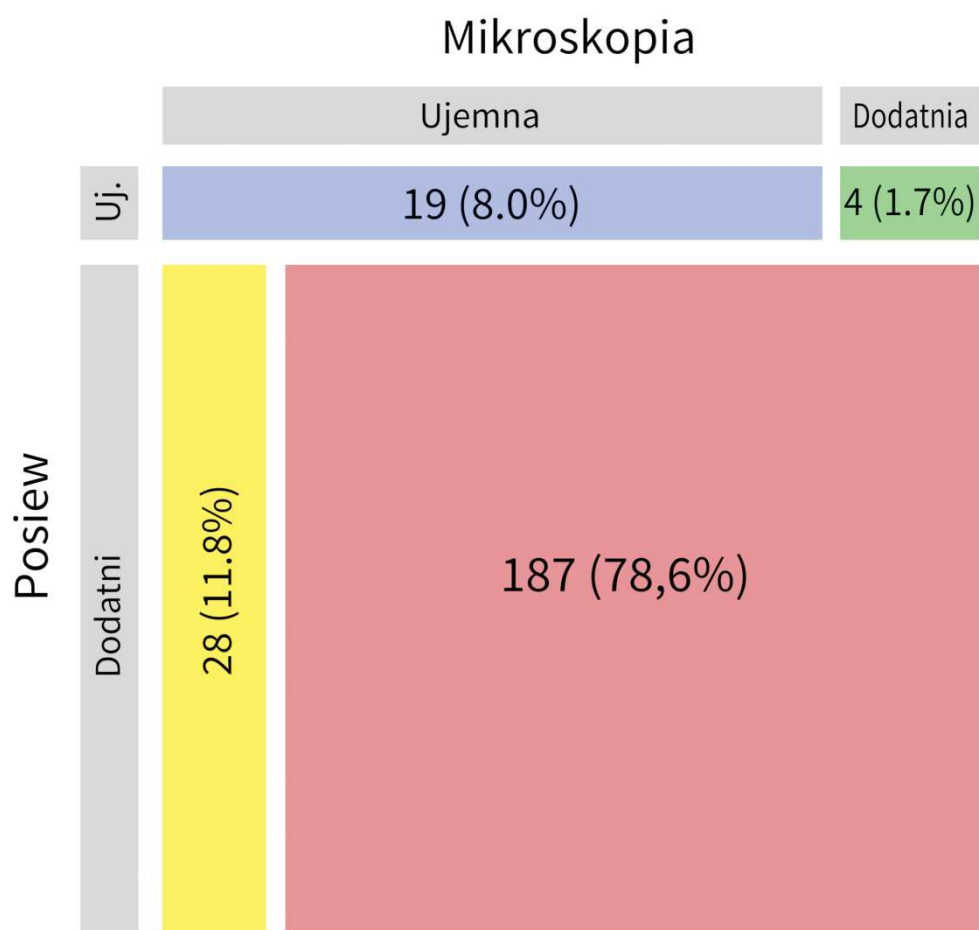
5.2.1. Wyniki mikroskopii bezpośredniej

Za wynik dodatni badania mikroskopowego uznano taki, w którym stwierdzano obecność komórek bakteryjnych w barwieniu metodą Grama. Za wynik dodatni posiewu uznano taki, gdzie wyhodowano drobnoustroje, niezależnie od ich liczebności. Występowanie wyników dodatnich i ujemnych przedstawia Tabela 24, zaś podsumowanie wyników badania mikroskopowego i badania posiewu w całym badaniu przedstawia Rysunek 2.

Tabela 24. Liczba oraz częstość wyników dodatnich i ujemnych w metodzie mikroskopii i posiewu, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba dodatnich wyników, y - liczba wykonanych badań, % - odsetek dodatnich wyników dla rodzaju badania.

Rodzaj badania	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Razem
Preparat Grama	38/44 (86,4%)	32/40 (80,0%)	36/44 (81,8%)	29/37 (78,4%)	25/34 (73,5%)	31/39 (79,5%)	191/238 (80,3%)
Posiew	42/46 (91,3%)	38/43 (88,4%)	42/45 (93,3%)	35/39 (89,7%)	32/38 (84,2%)	37/40 (92,5%)	226/251 (90,0%)

Posiew dodatni występuje statystycznie istotnie częściej niż mikroskopia dodatnia. Liczba wyników dodatnich w posiewie wynosi 226 z 251 (90,0%), natomiast liczba dodatnich wyników w mikroskopii wynosi 191 z 238 (80,3%) (dokładny test Fishera, $p < 0,023$). Częstość dodatnich wyników mikroskopii wynosiła 73,5% do 86,4%, obserwowano większy odsetek dodatnich posiewów – od 84,2% do 93,3%. Najwyższy odsetek dodatnich wyników mikroskopii bezpośredniej obserwowano na początku badania (T1), najwyższy odsetek dodatnich posiewów odnotowano w T3. Zgodność wyników dodatnich w obu metodach występowała w 78,6% (Rysunek 2).



Rysunek 2. Liczba oraz częstość wyników dodatnich i ujemnych w metodzie mikroskopii i posiewu.

5.2.2. Wyniki hodowli bakteryjnych

Dodatni wynik posiewu tlenowego uzyskano w 90,0% wymazów z ran, wyhodowano 59 różnych gatunków drobnoustrojów tlenowych, 30 Gram-dodatnich (50,8%), 29 Gram-ujemnych (49,2%). Nie stwierdzono obecności grzybów. Wykaz wyhodowanych drobnoustrojów (nazwa pełna i skrócona) przedstawiono w tabeli w Załączniku 11.8.

Trzy gatunki występowały w częstości powyżej 40% (na 46 ran): *P. aeruginosa*, *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. Kolejne 7 z 59 gatunków drobnoustrojów (11,9%) występowało w częstości od 10% - 26,1% ran. Były to: *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helcococcus kunzii*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus agalactiae*. Pozostałe 49 gatunków występowało w częstości poniżej 9%. Dodatkowo, znacząca liczba gatunków 26 (44,1% z 59) pojawiło się tylko w jednym posiewie z rany (2,2% na 46 ran). W tabeli w Załączniku 11.9 przedstawiono liczbę i częstość występowania gatunków bakterii tlenowych izolowanych z wymazów z ran.

W każdym z posiewów zidentyfikowano od 0 do 9 gatunków bakterii tlenowych jednocześnie, przy czym, w 6-tygodniowym okresie obserwacji, w ranach znajdowano od 1 do 12 różnych gatunków. Średnia liczba gatunków przypadających na ranę wynosiła 2,5 (od 0,2 do 7,2).

Wzrost bakterii beztlenowych uzyskano w 8 ranach u 8 pacjentów (17,4% ran). W pierwszym tygodniu obserwacji bakterie beztlenowe były obecne w 3 ranach, co stanowi 6,98% na 46 ran (w 2 ranach na początku i na końcu obserwacji, trzeci pacjent nie ukończył badania) w szóstym tygodniu obserwacji w 7 ranach, w tym w 5 nowych (17,5% na 40 ran kończących badanie). Bakterie beztlenowe występowały w hodowli mieszanej z bakteriami tlenowymi we wszystkich przypadkach.

W 3 ranach z 8 (37,50%) występowały jednocześnie dwa gatunki bakterii beztlenowych, w pozostałych 5 z 8 (62,5%) stwierdzano jeden gatunek. W 2 ranach drobnoustroje te występowały zarówno na początku, jaki i na końcu okresu obserwacji. W 1 ranie tylko na początku, w 5 ranach bakterie beztlenowe stwierdzano tylko w ostatnim tygodniu badania. Wyhodowano łącznie 8 gatunków drobnoustrojów beztlenowych, których wykaz oraz częstość występowania w badanych ranach zamieszczono w Tabeli 25.

Tabela 25. Wykaz wyhodowanych gatunków bakterii beztlenowych.

Nazwa	Nazwa pełna	Liczba ran	% z 46
<i>A. murdochii</i>	<i>Anaerococcus murdochii</i>	1	2,2
<i>B.fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	1	2,2
<i>B.ovatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	1	2,2
<i>B.uniformis</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	1	2,2
<i>F.magna</i>	<i>Finegoldia magna</i>	3	6,5
<i>F.varium</i>	<i>Fusobacterium varium</i>	1	2,2
<i>P.anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1	2,2
<i>P.gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	4,3

Określenie wrażliwości bakterii na antybiotyki oraz zidentyfikowanie mechanizmów oporności pozwoliło na uzyskanie informacji o częstości występowania szczepów opornych. Występowanie szczepów opornych stwierdzono u 11 pacjentów z 43 (25,6%), w tym równoczesne występowanie 2 szczepów opornych stwierdzono u 2 osób. Najczęstszym mechanizmem oporności było wytwarzanie przez pałeczki Gram-ujemne β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ES β L). W 5 ranach z 46 (10,9%) stwierdzono ES β L-dodatni szczep: *E. coli* w 2 przypadkach, *K. pneumoniae* w 2 przypadkach oraz *P. mirabilis* w 1 przypadku. W 3 ranach (6,5%) obecny był wielooporny szczep *A. baumannii* (w tym

w 1 przypadku oporny na karbapenemy), w 1 ranie (2,2%) wielooporny szczep *P. aeruginosa*, w 3 ranach (6,5%) obecny był *Stenotrophomonas maltophilia* (naturalna oporność na wiele grup antybiotyków) oraz z 1 rany (2,2%) wyhodowano *Staphylococcus lugdunensis* oporny na metycylinę. Nie wyhodowano *S. aureus* opornego na metycylinę (MRSA).

Szczepy wielolekooporne występowały statystycznie częściej w ranach „starych” niż w pozostałych grupach (test Wilcoxon, $W=240,5$, $p\text{-value} \leq 0.048$), można więc wnioskować, że im dłuższy czas trwania rany, tym wyhodowanie wielolekoopornego szczepu jest bardziej prawdopodobne.

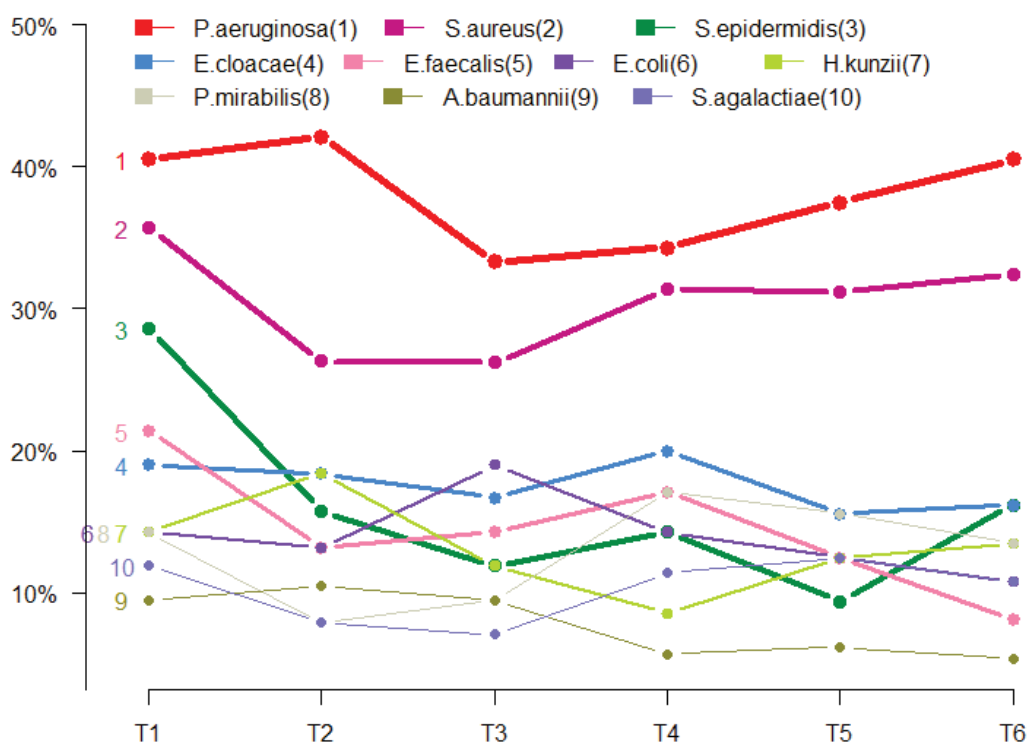
5.3. Analiza gatunków i grup wyhodowanych drobnoustrojów

5.3.1. Dynamika zmian gatunków i grup w T1-T6

Analizowano proces zmian gatunkowych w obrębie owrzodzenia. W celu zobrazowania zmian gatunkowych w obrębie rany, utworzono wykres składu gatunkowego drobnoustrojów w ranie i ich zmian w czasie. Przykładowe wykresy zamieszczono w Załączniku 11.10. Stwierdzono, że na początku okresu obserwacji dominowały gatunki: *P. aeruginosa* 40,5% ran, *S. aureus* 35,7% ran, *S. epidermidis* 28,6% ran. Na końcu okresu obserwacji dominowały gatunki: *P. aeruginosa* 40,5% ran, *S. aureus* 32,4% ran, zaś w 16,2% ran znajdowano następujące drobnoustroje: *S. epidermidis*, *E. cloacae*. Dla 10 najczęściej występujących (dominujących) gatunków zmiany częstości występowania drobnoustrojów przedstawiono w Tabeli 26 oraz na Rysunku 3.

Tabela 26. Dynamika częstości [w %] występowania dominujących gatunków drobnoustrojów tlenowych w sześciu tygodniach obserwacji w ranach, w których pobierano posiew.

Gatunek drobnoustroju	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>P. aeruginosa</i>	40,5	42,1	33,3	34,3	37,5	40,5
<i>S. aureus</i>	35,7	26,3	26,2	31,4	31,2	32,4
<i>S. epidermidis</i>	28,6	15,8	11,9	14,3	9,4	16,2
<i>E. cloacae</i>	19	18,4	16,7	20	15,6	16,2
<i>E. faecalis</i>	21,4	13,2	14,3	17,1	12,5	8,1
<i>E. coli</i>	14,3	13,2	19	14,3	12,5	10,8
<i>H. kunzii</i>	14,3	18,4	11,9	8,6	12,5	13,5
<i>P. mirabilis</i>	14,3	7,9	9,5	17,1	15,6	13,5
<i>A. baumannii</i>	9,5	10,5	9,5	5,7	6,2	5,4
<i>S. agalactiae</i>	11,9	7,9	7,1	11,4	12,5	10,8



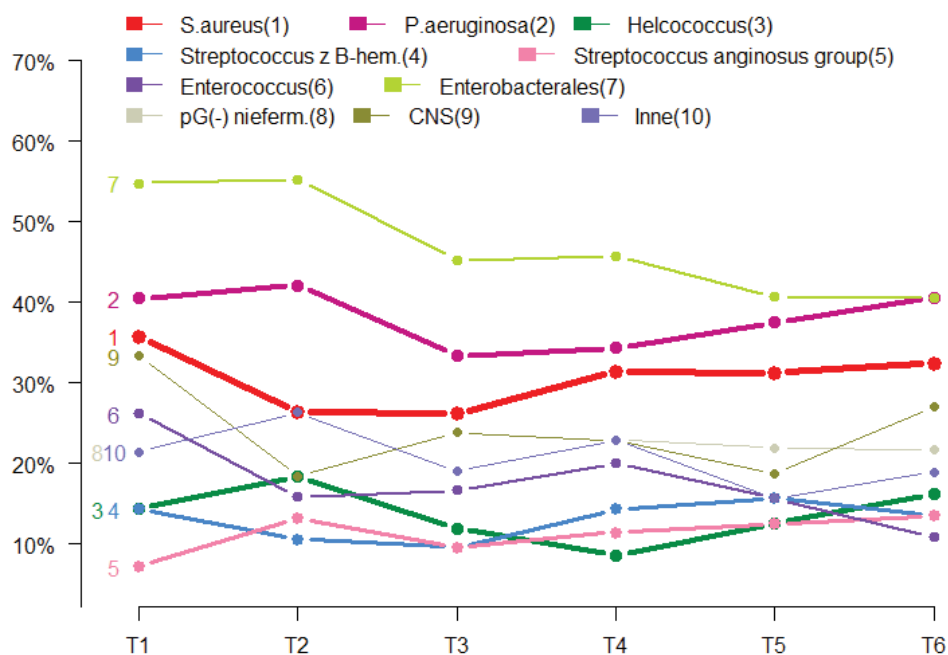
Rysunek 3. Zmiany częstości występowania dominujących gatunków drobnoustrojów.

Nie można wskazać, że dla jakiegoś drobnoustroju jest statystycznie istotna różnica w częstości występowania.

Przeanalizowano częstość występowania grup drobnoustrojów (Załącznik 11.9) w sześciu tygodniach obserwacji. Wyniki analizy zamieszczono w Tabeli 27 oraz na Rysunku 4.

Tabela 27. Dynamika częstości [w %] występowania grup drobnoustrojów w sześciu tygodniach obserwacji w ranach, w których pobierano posiew.

Nazwa grupy	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>S. aureus</i>	35,7	26,3	26,2	31,4	31,2	32,4
<i>P. aeruginosa</i>	40,5	42,1	33,3	34,3	37,5	40,5
<i>Helcococcus</i>	14,3	18,4	11,9	8,6	12,5	16,2
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	14,3	10,5	9,5	14,3	15,6	13,5
<i>Streptococcus anginosus</i> group	7,1	13,2	9,5	11,4	12,5	13,5
<i>Enterococcus</i>	26,2	15,8	16,7	20	15,6	10,8
<i>Enterobacterales</i>	54,8	55,3	45,2	45,7	40,6	40,5
PG(-) niefermentujące	21,4	26,3	19	22,9	21,9	21,6
CNS	33,3	18,4	23,8	22,9	18,8	27
Inne	21,4	26,3	19	22,9	15,6	18,9



Rysunek 4. Zmiany częstości występowania 10 grup drobnoustrojów.

Również po obserwacji występowania częstości grup nie można wskazać, że dla jakiejś grupy jest statystycznie istotna różnica.

5.3.2. Zależność międzygatunkowa i międzygrupowa drobnoustrojów

Zadano pytanie, czy niektóre bakterie z grupy 10 dominujących gatunków są zdecydowanie częstsze. Odpowiedź jest pozytywna. Wykazano, że *P. aeruginosa* występuje statystycznie istotnie częściej niż wszystkie pozostałe z wyjątkiem *S. aureus* i *S. epidermidis*. Dwa ostatnie gatunki występują statystycznie istotnie częściej niż *E. coli*, *H. kunzii*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *S. agalactiae*. Wyniki analiz dla *P. aeruginosa* przedstawiono w Tabeli 28.

Tabela 28. Porównanie częstości występowania najczęściej występującego gatunku (*P. aeruginosa*) z innymi dominującymi gatunkami występującymi w ranach z częstością powyżej 10%.

Porównanie częstości występowania <i>P. aeruginosa</i>					OR	Dokładny test Fishera
	Bakteria 1	Liczba ran	Bakteria 2	Liczba ran		p-value
1	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>S. aureus</i>	19	0,839	0,417
2	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>S. epidermidis</i>	19	0,839	0,417
3	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>E. cloacae</i>	12	0,424	0,041
4	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>E. faecalis</i>	11	0,378	0,024
5	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>E. coli</i>	9	0,294	0,007
6	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>H. kunzii</i>	7	0,217	0,001
7	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>P. mirabilis</i>	7	0,217	0,001
8	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>A. baumannii</i>	5	0,148	0,001
9	<i>P. aeruginosa</i>	21	<i>S. agalactiae</i>	5	0,148	0,001

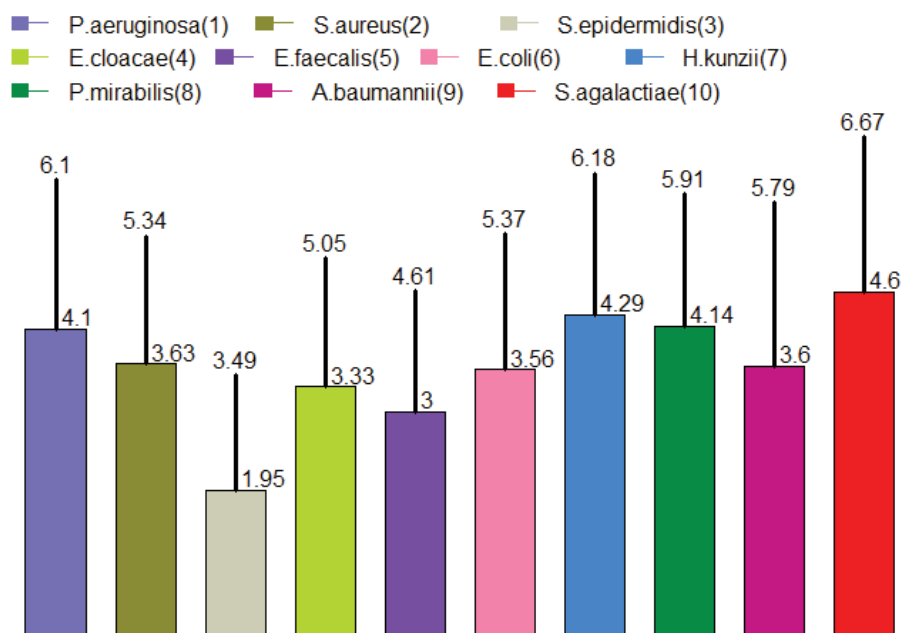
5.3.3. Analiza czasu pobytu drobnoustrojów w ranie

Zwrócono uwagę na fakt, że niektóre gatunki drobnoustrojów obserwowano w ranie przez kilka tygodni, niektóre przez krótszy okres 1-2 tygodni. Postawiono hipotezę, że czas pobytu drobnoustrojów w ranie może być związany z właściwościami gatunkowymi lub przynależnością grupową izolatów. Wyniki zostały przedstawione w Tabelach 29-32 oraz na Rysunkach 5 i 6.

Tabela 29. Czas pobytu w ranie [w tyg.] 10 dominujących gatunków.

Gatunek drobnoustroju	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
<i>P. aeruginosa</i>	21	4,1	2	1	2	5	6	6
<i>S. aureus</i>	19	3,63	1,71	1	2	4	5	6
<i>S. epidermidis</i>	19	1,95	1,54	1	1	1	4	5
<i>E. cloacae</i>	12	3,33	1,72	1	2	3	5	6
<i>E. faecalis</i>	11	3	1,61	1	1	3	4	6
<i>E. coli</i>	9	3,56	1,81	1	2	3	5,5	6
<i>H. kunzii</i>	7	4,29	1,89	1	3	4	6	6
<i>P. mirabilis</i>	7	4,14	1,77	1	3	4	6	6
<i>A. baumannii</i>	5	3,6	2,19	2	2	2	6	6
<i>S. agalactiae</i>	5	4,6	2,07	1	3	5	6	6

Najdłuższy czas pobytu w ranie miały: *S. agalactiae*, *H. kunzii*, najkrótszy *S. epidermidis* i *E. faecalis*. W Tabeli 30 przedstawiono wyniki dla najczęściej występującego gatunku (*P. aeruginosa*). Średni czas pobytu *P. aeruginosa* był statystycznie istotnie dłuższy niż czas pobytu *S. epidermidis* oraz *E. faecalis*.



Rysunek 5. Czas pobytu 10 najczęstszych gatunków drobnoustrojów w tygodniach.

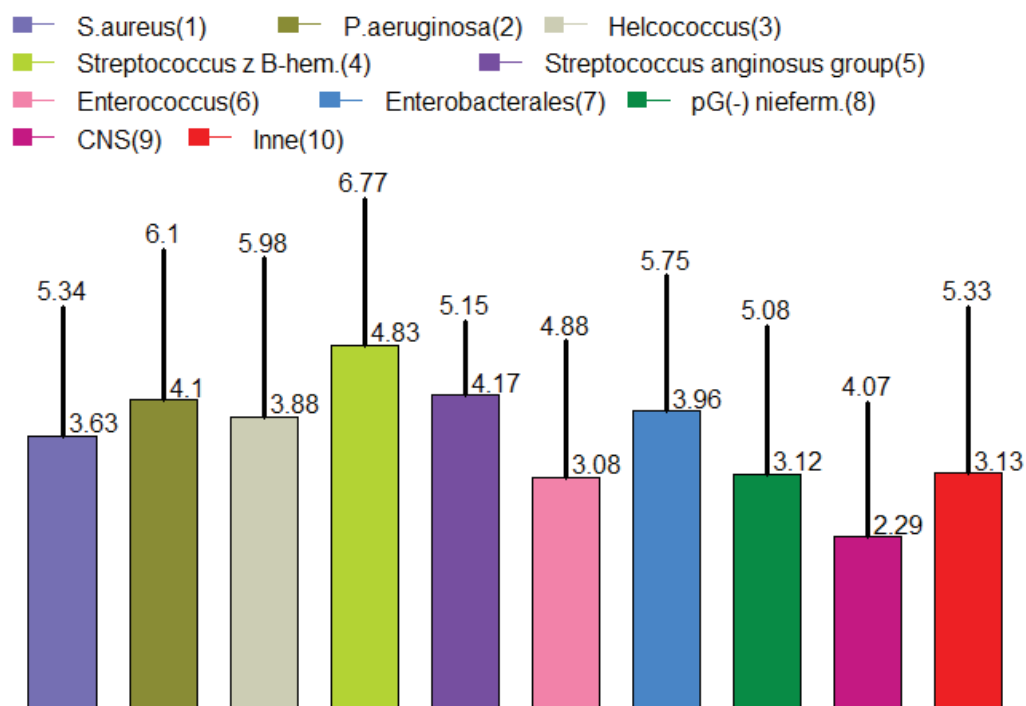
Tabela 30. Zależności międzygatunkowe średniego czasu pobytu drobnoustrojów w ranach na przykładzie *P. aeruginosa*.

Gatunek 1	Średni czas pobytu 1	Gatunek 2	Średni czas pobytu 2	Test Wilcozona
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>S. aureus</i>	3,63	W = 239,0 p = 0,1375
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>S. epidermidis</i>	1,95	W = 319,5 p < 0,0003
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>E. cloacae</i>	3,33	W = 153,5 p = 0,1465
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>E. faecalis</i>	3	W = 156,0 p = 0,0501
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>E. coli</i>	3,56	W = 110,0 p = 0,2360
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>H. kunzii</i>	4,29	W = 70,5 p = 0,4344
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>P. mirabilis</i>	4,14	W = 76,0 p = 0,4456
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>A. baumannii</i>	3,6	W = 56,0 p = 0,4067
<i>P. aeruginosa</i>	4,1	<i>S. agalactiae</i>	4,6	W = 46,0 p = 0,3304

Rozpatrując grupy drobnoustrojów obserwujemy inną zależność. Najdłużej w ranie utrzymywały się następujące grupy: *Streptococcus* z β -hem. (4,83 tygodnia), *Streptococcus anginosus* group (4,17 tygodnia), oraz *P. aeruginosa* (4,1 tygodnia). Pozostałe grupy występują także w znacznej długości, chociaż w niektórych przypadkach statystycznie istotnie krótszej (por. Tabela 31 i 32 oraz Rysunek 6).

Tabela 31. Czas pobytu w ranie grup drobnoustrojów w tygodniach.

Grupa drobnoustrojów	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
<i>S. aureus</i>	19	3,63	1,71	1	2	4	5	6
<i>P. aeruginosa</i>	21	4,1	2	1	2	5	6	6
<i>Helcococcus</i>	8	3,88	2,1	1	1,5	4	6	6
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	6	4,83	1,94	1	4	5,5	6	6
<i>Streptococcus anginosus</i> group	6	4,17	0,98	3	3,75	4	4,5	6
<i>Enterococcus</i>	13	3,08	1,8	1	1	3	4	6
<i>Enterobacterales</i>	27	3,96	1,79	1	2	4	6	6
PG(-) niefermentujące	16	3,12	1,96	1	1,25	2,5	5,5	6
CNS	24	2,29	1,78	1	1	1	4	6
Inne	15	3,13	2,2	1	1	2	6	6



Rysunek 6. Czas pobytu w ranie 10 grup drobnoustrojów w tygodniach.

Tabela 32. Zależności międzygatunkowe średniego czasu pobytu drobnoustrojów w ranach na przykładzie grupy *Streptococcus* β -hem.

Grupa 1	Średni czas pobytu	Inne grupy	Średni czas pobytu	Test Wilcoxon
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	<i>Streptococcus anginosus</i> group	4,17	W = 26,5 p = 0,0787
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	<i>Enterococcus</i>	3,08	W = 60,0 p < 0,0297
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	<i>Enterobacterales</i>	3,96	W = 101,0 p = 0,1669
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	PG(-) niefermentujące	3,12	W = 68,0, p = 0,0651
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	CNS	2,29	W = 119,5 p < 0,0040
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	Inne	3,13	W = 60,0 p = 0,1116
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	<i>P. aeruginosa</i>	4,1	W = 50,0 p = 0,2145
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	4,83	<i>S. aureus</i>	3,63	W = 29,0 p < 0,0341

Z przeprowadzonej analizy wynika, że nie można wskazać wartości progowej (ang. *threshold*) wskazującej na podział grup na grupy dłużej i krócej przebywające w ranie.

Przeanalizowano zależność występowania dominujących gatunków oraz grup drobnoustrojów i stosowaną antybiotykoterapią – nie wykazano statystycznie istotnych różnic z wyjątkiem *P. mirabilis*, którego występowanie było statystycznie istotnie częstsze u pacjentów przyjmujących antybiotyki (p-value ≤ 0.048). Jeden izolat wieloopornego szczepu *P. mirabilis* (ES β L - dodatni) wykryto w ranie u pacjenta ze stosowaną antybiotykoterapią. W analizie grupami drobnoustrojów, dla *Enterobacterales*, do których należy *P. mirabilis*, nie wykazano takiej zależności.

5.3.4. Częstość występowania drobnoustrojów w trzech głównych parametrach rany

5.3.4.1. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od typu owrzodzenia

Przeanalizowano częstość, z jaką najczęściej hodowane gatunki drobnoustrojów występują w różnych typach owrzodzeń w dwóch podziałach ze względu na etiologię: żylnym, tętniczym i innym oraz w obecnym zespole stopy cukrzycowej i nieobecnym. Wyniki są zamieszczone w Tabelach 33 i 34.

Tabela 33. Występowanie grup drobnoustrojów w kategoriach owrzodzenia, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran danego typu, % - odsetek ran danego typu z wyhodowanym drobnoustrojem.

Grupa drobnoustrojów	Występowanie w:		Inne
	owrzodzeniu tętniczym	owrzodzeniu żylnym	
<i>P. aeruginosa</i>	9/18 (50)	7/17 (41,2)	5/11 (45,5)
<i>S. aureus</i>	6/18 (33,3)	8/17 (47,1)	5/11 (45,5)
<i>S. epidermidis</i>	7/18 (38,9)	8/17 (47,1)	4/11 (36,4)
<i>E. cloacae</i>	3/18 (16,7)	6/17 (35,3)	3/11 (27,3)
<i>E. faecalis</i>	2/18 (11,1)	4/17 (23,5)	5/11 (45,5)
<i>E. coli</i>	2/18 (11,1)	3/17 (17,6)	4/11 (36,4)
<i>H. kunzii</i>	2/18 (11,1)	4/17 (23,5)	1/11 (9,1)
<i>P. mirabilis</i>	3/18 (16,7)	2/17 (11,8)	2/11 (18,2)
<i>A. baumannii</i>	0/18 (0)	0/17 (0)	5/11 (45,5)
<i>S. agalactiae</i>	1/18 (5,6)	2/17 (11,8)	2/11 (18,2)

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w częstości występowania drobnoustrojów w kategorii Żylne, Tętnicze, Inne dla najczęściej występujących gatunków bakterii, poza specyficznym występowaniem *A. baumannii*, gdzie jest statystycznie istotna różnica (Chi-kwadrat, $\chi^2[2]=17,8$; $p < 0,001$). Analizowano również drobnoustroje w podziale na 10 grup. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami.

W kolejnym podziale ze względu na stwierdzenie obecności zespołu stopy cukrzycowej częstość gatunków 10 najczęściej występujących drobnoustrojów jest przedstawiona w Tabeli 34.

Tabela 34. Występowanie dominujących gatunków drobnoustrojów w kategoriach owrzdzenia z zespołem stopy cukrzycowej i bez, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran danego typu, % - odsetek ran danego typu z wyhodowanym drobnoustrojem.

Gatunek drobnoustroju	Zespół stopy cukrzycowej	
	Nieobecny	obecny
<i>P. aeruginosa</i>	17/35 (48,6)	4/11 (36,4)
<i>S. aureus</i>	14/35 (40,0)	5/11 (45,5)
<i>S. epidermidis</i>	14/35 (40,0)	5/11 (45,5)
<i>E. cloacae</i>	9/35 (25,7)	3/11 (27,3)
<i>E. faecalis</i>	7/35 (20,0)	4/11 (36,4)
<i>E. coli</i>	5/35 (14,3)	4/11 (36,4)
<i>H. kunzii</i>	6/35 (17,1)	1/11 (9,1)
<i>P. mirabilis</i>	4/35 (11,4)	3/11 (27,3)
<i>A. baumannii</i>	1/35 (2,9)	4/11 (36,4)
<i>S. agalactiae</i>	2/35 (5,7)	3/11 (27,3)

W analizowanym kryterium można uznać przypadek *A. baumannii* 3,2% vs. 36,4% za statystycznie istotny (dokładny test Fishera, $p < 0,012$). Jest to podobna sytuacja do analizowanego wcześniej występowania gatunków – w kryterium „Inne”, gdzie u 8 z 11 pacjentów rozpoznano zespół stopy cukrzycowej, *A. baumannii* wyróżniał się również spośród innych bakterii. Analiza drobnoustrojów w 10 grupach nie wykazała różnic istotnych statystycznie w występowaniu grup drobnoustrojów w zespole stopy cukrzycowej i u osób bez rozpoznania tego zespołu.

5.3.4.2. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od wielkości rany

Przeanalizowano, czy wielkość rany ma związek z zasiedlaniem jej przez drobnoustroje. W tym celu przeanalizowano częstość występowania drobnoustrojów w ranach w trzech kategoriach wielkości w pierwszym i szóstym tygodniu HBOT. Wyniki przedstawione są w Tabelach 35 i 36.

W obserwowanych tygodniach (T1 i T6) rozkład procentowy dominujących gatunków drobnoustrojów nie wykazuje statystycznie istotnych różnic. Nie wykazano preferencji któregoś z gatunków do rany małej, średniej lub dużej.

Podobną analizę przeprowadzono dla grup drobnoustrojów. W T1 statystycznie istotnie częściej występował jako podgrupa *S. aureus* (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2] = 6,3$; $p < 0,043$) w ranach dużych, powyżej 10 cm². W T6 nie zaobserwowano tej zależności. Inną zależność odnotowano dla podgrupy *Enterobacterales*, która w T1 występuje w ranach bez preferencji do rany małej, średniej lub dużej i nie występuje statystycznie istotna różnica, natomiast w T6 podgrupa ta występuje statystycznie istotnie częściej niż inne w ranach większych (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2] = 6,9$; $p < 0,033$).

Tabela 35. Występowanie grup drobnoustrojów w T1 w trzech kategoriach wielkości ran, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.

Grupa drobnoustroju	≤ 1 cm²	Powyżej 1 cm² do 10 cm²	> 10 cm²
<i>S. aureus</i>	0/3 (0)	5/18 (27,8)	14/24 (58,3)
<i>P. aeruginosa</i>	1/3 (33,3)	8/18 (44,4)	12/24 (50)
<i>Helcococcus</i>	1/3 (33,3)	1/18 (5,6)	6/24 (25)
<i>Streptococcus</i> z β-hem.	0/3 (0)	2/18 (11,1)	4/24 (16,7)
<i>Streptococcus anginosus</i> group	1/3 (33,3)	1/18 (5,6)	4/24 (16,7)
<i>Enterococcus</i>	1/3 (33,3)	4/18 (22,2)	8/24 (33,3)
<i>Enterobacterales</i>	1/3 (33,3)	11/18 (61,1)	14/24 (58,3)
PG(-) niefermentujące	2/3 (66,7)	6/18 (33,3)	8/24 (33,3)
CNS	3/3 (100)	11/18 (61,1)	10/24 (41,7)
Inne	2/3 (66,7)	6/18 (33,3)	7/24 (29,2)

Tabela 36. Występowanie gatunków drobnoustrojów w T6 w trzech kategoriach wielkości ran przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.

Gatunek drobnoustroju	≤ 1 cm ²	Powyżej 1 cm ² do 10 cm ²	> 10 cm ²
<i>S. aureus</i>	2/10 (20)	5/11 (45,5)	12/19 (63,2)
<i>P. aeruginosa</i>	3/10 (30)	5/11 (45,5)	12/19 (63,2)
<i>Helcococcus</i>	1/10 (10)	1/11 (9,1)	5/19 (26,3)
<i>Streptococcus</i> z β-hem.	1/10 (10)	1/11 (9,1)	4/19 (21,1)
<i>Streptococcus anginosus</i> group	1/10 (10)	1/11 (9,1)	4/19 (21,1)
<i>Enterococcus</i>	2/10 (20)	3/11 (27,3)	6/19 (31,6)
<i>Enterobacterales</i>	2/10 (20)	8/11 (72,7)	12/19 (63,2)
PG(-) niefermentujące	3/10 (30)	5/11 (45,5)	6/19 (31,6)
CNS	8/10 (80)	7/11 (63,6)	7/19 (36,8)
Inne	4/10 (40)	2/11 (18,2)	6/19 (31,6)

5.3.4.3. Częstość występowania drobnoustrojów w zależności od wieku rany

Przeanalizowano występowanie drobnoustrojów w ranach, które pojawiły się do 3 miesięcy przed leczeniem HBOT (rany „młode”, powyżej 3 miesięcy do 12 miesięcy (rany „średnie”) oraz powyżej 12 miesięcy przed rozpoczęciem leczenia HBOT (rany „stare”) (Tabela 11 str. 44).

W ranach „młodych” *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* występowały z tą samą częstością (35,7%), w ranach „średnich” najczęściej występował *S. epidermidis* (75%), zaś w ranach „starych” *S. aureus* (75%). Interesujące są dwa przypadki *S. aureus* i *S. epidermidis* w których jest różnie (Tabela 37).

Stwierdzono, że w rany w których jest *S. aureus* są statystycznie istotnie częściej ranami „starymi” (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2]=13,1$; $p < 0,001$). Natomiast dla *S. epidermidis* są to „średnie” (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2]=11,8$;

$p < 0,003$). Nie stwierdzono różnicy w czasie trwania rany dla ran, w których występował *P. aeruginosa*.

Tabela 37. Liczba i częstość występowania dominujących gatunków drobnoustrojów w zależności od wieku rany, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.

Gatunek drobnoustroju	≤ 3 miesiący	Powyżej 3 do 12 miesiący	> 12 miesiący
<i>P. aeruginosa</i>	5/14(35,7)	8/16(50)	8/16(50)
<i>S. aureus</i>	5/14(35,7)	2/16(12,5)	12/16(75)
<i>S. epidermidis</i>	4/14(28,6)	12/16(75)	3/16(18,8)
<i>E. cloacae</i>	4/14(28,6)	2/16(12,5)	6/16(37,5)
<i>E. faecalis</i>	4/14(28,6)	4/16(25)	3/16(18,8)
<i>E. coli</i>	5/14(35,7)	2/16(12,5)	2/16(12,5)
<i>H. kunzii</i>	1/14(7,1)	2/16(12,5)	4/16(25)
<i>P. mirabilis</i>	4/14(28,6)	2/16(12,5)	1/16(6,2)
<i>A. baumannii</i>	3/14(21,4)	2/16(12,5)	0/16(0)
<i>S. agalactiae</i>	3/14(21,4)	1/16(6,2)	1/16(6,2)

Przeprowadzono analizę dla grup drobnoustrojów. Wyniki są takie same dla *S. aureus* (rany „stare” są częstsze), oraz dla grupy CNS, której głównym reprezentantem jest *S. epidermidis*, rany „średnie” występują statystycznie istotnie częściej niż pozostałe (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2]=8,3$; $p < 0,016$) (Tabela 38).

Tabela 38. Liczba i częstość występowania grup drobnoustrojów w zależności od wieku rany, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.

Grupa drobnoustrojów	≤ 3 miesiący	Powyżej 3 do 12 miesiący	> 12 miesiący
<i>S. aureus</i>	5/14 (35,7)	2/16 (12,5)	12/16 (75)
<i>P. aeruginosa</i>	5/14 (35,7)	8/16 (50)	8/16 (50)

Grupa drobnoustrojów	≤ 3 miesięcy	Powyżej 3 do 12 miesięcy	> 12 miesięcy
<i>Helcococcus</i>	2/14 (14,3)	2/16 (12,5)	4/16 (25)
<i>Streptococcus</i> z β-hem.	3/14 (21,4)	1/16 (6,2)	2/16 (12,5)
<i>Streptococcus anginosus</i> group	1/14 (7,1)	1/16 (6,2)	4/16 (25)
<i>Enterococcus</i>	5/14 (35,7)	4/16 (25)	4/16 (25)
<i>Enterobacterales</i>	9/14 (64,3)	7/16 (43,8)	11/16 (68,8)
PG(-) niefermentujące	5/14 (35,7)	3/16 (18,8)	8/16 (50)
CNS	5/14 (35,7)	13/16 (81,2)	6/16 (37,5)
Inne	4/14 (28,6)	5/16 (31,2)	6/16 (37,5)

5.4. Wyniki badań ilościowych

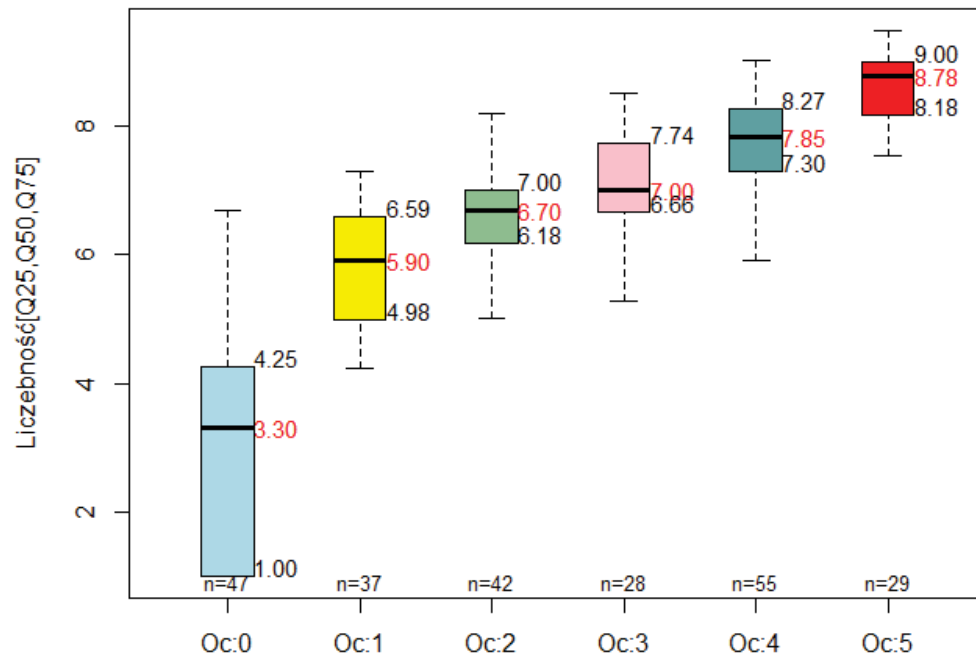
5.4.1. Wyniki mikroskopii bezpośredniej w ocenie półilościowej oraz posiewu ilościowego

Przeanalizowano wyniki oceny mikroskopowej treści z rany i porównano je z wynikami posiewu ilościowego. Oceny dokonywano według Załącznika 11.7. Wyniki zaprezentowano w Tabeli 39 oraz na Rysunku 7. W miejsce $\log_{10}(0) = -\text{inf.}$ przyjęto wartość równą 1.

Tabela 39. Ocena półilościowa drobnoustrojów metodą mikroskopii bezpośredniej a liczebność w posiewie ilościowym [\log_{10}]. N – liczba ocenianych ran w mikroskopii.

Punktacja	N	Średnia [\log_{10}]	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Ocena: 0	47	2,9	1,8	1,0	1,0	3,3	4,3	6,7
Ocena: 1	37	5,4	1,8	1,0	4,8	5,9	6,6	7,3
Ocena: 2	42	6,7	0,8	4,7	6,2	6,7	7,0	8,7
Ocena: 3	28	7,1	0,8	5,3	6,6	7,0	7,8	8,5
Ocena: 4	55	7,7	0,7	5,9	7,3	7,8	8,3	9,0
Ocena: 5	29	8,6	0,6	6,7	8,1	8,8	9,1	9,5

Liczebność vs. Mikroskopia



Rysunek 7. Liczebność drobnoustrojów w posiewie [\log_{10}] a mikroskopia (półilościowo) tygodniami.

Wszystkie liczebności są statystycznie istotnie rosnące (Test Wilcoxona; $p < 0,05$). To znaczy, że dla wyższego poziomu oceny w mikroskopii wartość logarytmu liczebności jest statystycznie istotnie wyższa.

5.4.2. Analiza liczebności drobnoustrojów w ranie

W wykonanych posiewach treści z ran oceniano liczebność drobnoustrojów, czyli liczbę wyhodowanych kolonii bakteryjnych w przeliczeniu na 1 ml treści z rany (CFU/ml) oraz analizowano, jak zmienia się ona pod wpływem wybranych czynników. Występowanie liczebności w posiewach ilościowych z ran zaprezentowano w Tabeli 40.

Tabela 40. Liczebność drobnoustrojów w posiewach ilościowych z ran.

Liczebność drobnoustrojów w ranie w CFU/ml	Liczba posiewów (%)
10 ⁹	9/251 (3,6)
10 ⁸	49/251 (19,5)
10 ⁷	59/251 (23,5)
10 ⁶	58/251 (23,1)
10 ⁵	24/251 (9,6)
10 ⁴	14/251 (5,6)
10 ³	9/251 (3,6)
Poniżej 10 ³	4/251 (1,6)
0	25/251 (10,0)

Znacząca większość posiewów z ran zawierała drobnoustroje w liczebności 10⁶ i powyżej (łącznie 69,7%). Posiewy, w których nie stwierdzono wzrostu drobnoustrojów, stanowiły 10% wszystkich badań.

Następnie zbadano dynamikę liczebności drobnoustrojów w sześciu tygodniach obserwacji. W każdym z tygodni zliczano liczbę bakterii w posiewie z rany, a otrzymane wyniki sumaryczne przedstawiono w Tabeli 41. W miejsce $\log_{10}(0) = -\text{inf}$ przyjęto wartość równą 1.

Tabela 41. Statystyki opisowe liczebności drobnoustrojów w ranie tygodniami [\log_{10}]. N – liczba ran z wykonanym posiewem.

Tydzień obserwacji	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
T1	46	6,5	2,1	1	6,0	6,7	7,9	9,5
T2	43	6,3	2,3	1	5,5	7,0	7,8	9,1
T3	45	6,4	2,2	1	5,9	7,0	7,7	9,5
T4	39	5,9	2,4	1	4,5	6,6	8,0	9,2
T5	38	6,0	2,5	1	5,0	7,0	7,9	9,3
T6	40	6,3	2,2	1	5,3	6,7	8,1	9,2

Nie stwierdzono różnic w rozkładach tygodniowych liczebności i dlatego liczebność została potraktowana łącznie w postaci mediany liczebności tygodniowych dla każdej z ran. Wyliczona nowa zmienna została nazwana „liczebnością globalną” (obejmuje globalnie 6 tygodni) i będzie wykorzystywana w kolejnych analizach. Wyniki otrzymane dla tej zmiennej przedstawiono w Tabeli 42.

Tabela 42. Statystyki opisowe globalnej liczebności tygodniowo [\log_{10}].

Kategoria	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Liczebność globalna	46	6,5	1,9	1	6	6,8	7,7	8,9

Dla sprecyzowania obserwacji liczebności drobnoustrojów dokonano podziału na dwie grupy: poniżej 10^5 (wariant I) oraz poniżej 10^6 (wariant II). Wartości te zostały wybrane, gdyż, zgodnie ze współczesną wiedzą, ta liczebność nie zaburza procesów gojenia ran (korzystny czynnik wpływający na gojenie) (Wstęp, strona 25).

Ze względu na to, że liczebność drobnoustrojów była oceniana tygodniowo, w badaniu rany mogły występować różnice w kolejnych tygodniach. Ustalono więc na początku liczbę tygodni w których występował pierwszy i drugi wariant liczebności. Niskie wartości liczebności drobnoustrojów przez 6 tygodni (poniżej 10^5 CFU/ml) obserwowano tylko w 2 ranach (4,3%), a wyższe wartości (poniżej 10^6 CFU/ml) w 5 ranach (10,9%). Zwraca uwagę fakt, że w większości tygodniowych obserwacji ran zaobserwowano liczebność drobnoustrojów co najmniej 10^5 CFU/ml (63,1%), a u prawie połowy (47,8%) - co najmniej 10^6 CFU/ml. Dane te są przedstawione w Tabeli 43.

Tabela 43. Liczba tygodni (nT) dla łącznej liczby ran dla liczebności <math> < 10^5 </math> i <math> < 10^6 </math>.

Kategoria	nT 0	nT 1	nT 2	nT 3	nT 4	nT 5	nT 6
Liczebność <math> < 10^5 </math>	29/46 (63,1%)	1/46 (2,2%)	8/46 (17,4%)	3/46 (6,5%)	1/46 (2,2%)	2/46 (4,3%)	2/46 (4,3%)
Liczebność <math> < 10^6 </math>	22/46 (47,8%)	6/46 (13,0%)	5/46 (10,9%)	3/46 (6,5%)	4/46 (8,7%)	1/46 (2,2%)	5/46 (10,9%)

Analizowano hipotezy dotyczące czasu pozostawiania rany w liczebności wariantu I oraz wariantu II. Obliczono charakterystyki czasu stanu rany w wariancie I i II dla dominujących drobnoustrojów. Zostały one zaprezentowane w Tabeli 44 i 45.

Tabela 44. Statystyki opisowe czasu trwania w ranach 10 dominujących drobnoustrojów w liczebności <math> < 10^5 </math> (w tygodniach).

Gatunek drobnoustroju	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
<i>P. aeruginosa</i>	21	1,1	1,84	0	0	0	2	6
<i>S. aureus</i>	19	1,05	1,68	0	0	0	2	6
<i>S. epidermidis</i>	19	1,42	1,84	0	0	0	2	6
<i>E. cloacae</i>	12	0,83	1,27	0	0	0	2	3
<i>E. faecalis</i>	11	0,36	1,21	0	0	0	0	4
<i>E. coli</i>	9	0,78	1,56	0	0	0	1,5	4
<i>H. kunzii</i>	7	0,29	0,76	0	0	0	0	2
<i>P. mirabilis</i>	7	0,29	0,76	0	0	0	0	2
<i>A. baumannii</i>	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i>	5	1,2	1,64	0	0	0	3	3

Tabela 45. Statystyki opisowe czasu trwania w ranach 10 dominujących drobnoustrojów w liczebności <math> < 10^6 </math> (w tygodniach).

Gatunek drobnoustroju	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
<i>P. aeruginosa</i>	21	1,52	2,18	0	0	0	2,5	6
<i>S. aureus</i>	19	1,47	1,98	0	0	0	4	6
<i>S. epidermidis</i>	19	1,79	1,99	0	0	2	3	6
<i>E. cloacae</i>	12	1,08	1,68	0	0	0	2,75	4
<i>E. faecalis</i>	11	0,73	1,79	0	0	0	1	6
<i>E. coli</i>	9	1,22	2,22	0	0	0	2,5	6

Gatunek drobnoustroju	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
<i>H. kunzii</i>	7	0,57	1,51	0	0	0	0	4
<i>P. mirabilis</i>	7	0,86	1,07	0	0	1	1	3
<i>A. baumannii</i>	5	0,2	0,45	0	0	0	0,5	1
<i>S. agalactiae</i>	5	1,6	2,19	0	0	0	4	4

A. baumannii nie występował w ranach w liczebności poniżej 10^5 CFU/ml. Najkrócej spośród innych dominujących w posiewach drobnoustrojów w liczebności poniżej 10^5 występowały *H. kunzii* i *P. mirabilis*, natomiast w liczebności poniżej 10^6 *A. baumannii* występował jedynie przez 1 tydzień.

Najdłużej w liczebności poniżej 10^5 i poniżej 10^6 utrzymywał się *S. epidermidis* (średnio 1,42 tygodnia). *P. aeruginosa* występował w ranach w liczebności poniżej 10^6 średnio 1,52 tygodnia.

5.4.3. Analiza liczebności drobnoustrojów w podstawowych parametrach rany

Otrzymaną globalną liczebność drobnoustrojów przeanalizowano dla ran o różnym czasie trwania, różnej wielkości oraz w zależności od stwierdzonego rozpoznania (typu owrzodzenia). W celu zobrazowania zmian liczebności drobnoustrojów w obrębie rany, utworzono wykres składu gatunkowego drobnoustrojów w ranie i ich zmian w czasie. Przykładowe wykresy zamieszczono w Załączniku 11.10.

Dla ran o różnym czasie trwania wyniki analizy podano w Tabeli 46. Największą globalną liczebność w ranie obserwowano dla ran trwających powyżej 12 miesięcy.

Tabela 46. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla 3 różnych okresów trwania rany [\log_{10}].

Kategoria	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
≤ 3 miesiące	14	6,3	1,8	1	5,5	7	7,4	8,2
Powyżej 3 do 12 miesięcy	16	6	2,3	1	6	6,5	7,1	8,9
> 12 miesięcy	16	7,2	1,3	5,1	6,2	7,2	8,4	8,9

Okazało się, że nie występowały statystycznie istotne różnice w czasie trwania rany dla liczebności globalnej.

Kolejną analizę przeprowadzono dla ran o różnym polu powierzchni przy pierwszym pomiarze rany w T1 oraz ostatnim w T6. Największą medianę i maksimum globalnej liczebności w pierwszym tygodniu zaobserwowano w ranach dużych (mediana 7,1, maksimum 8,9), jednakże nie były to statystycznie istotne różnice (Tabela 47).

Tabela 47. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T1 [\log_{10}].

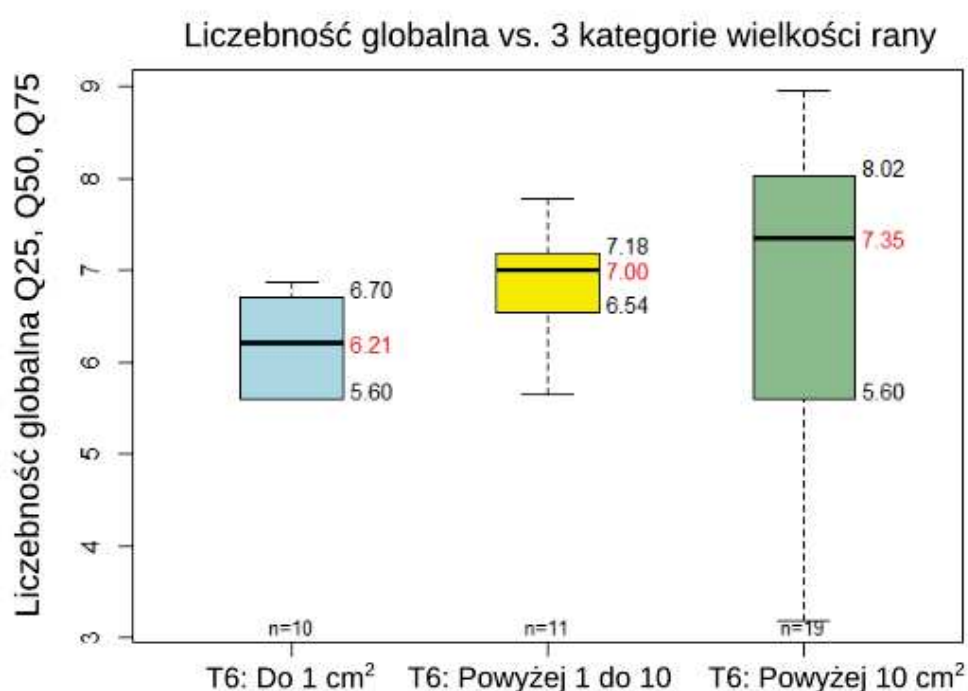
Kategoria w T1	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
≤ 1 cm ²	3	7,2	1,2	6,2	6,2	6,9	8,5	8,5
Powyżej 1 cm ² do 10cm ²	18	6,3	1,6	1	5,9	6,6	7	8,2
> 10 cm ²	24	6,5	2,2	1	5,5	7,1	8	8,9

W ostatnim tygodniu obserwacji największą medianę oraz maksymalną wartość globalnej liczebności obserwowano również w ranach dużych (Tabela 48).

Tabela 48. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T6 [\log_{10}].

Kategoria w T6	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
≤ 1 cm ²	10	5,5	2,5	1	4,5	6,2	6,7	8,5
Powyżej 1 cm ² do 10cm ²	11	6,8	0,8	5,3	6,5	7	7,2	8,2
> 10 cm ²	19	6,6	2	1	5,2	7,3	8,1	8,9

W tym przypadku analiza wykazała, że w T6 małe rany mają globalną liczebność statystycznie istotnie niższą niż średnie (Test Wilcoxona, $W = 30,0$, $p < 0,039$). Odczytywać to należy w ten sposób, że dla małych ran liczebność jest niższa (mediana $6,2 \cdot 10^6$), a w większych ranach stabilizuje się na poziomie 10^7 (Rysunek 8). Bardzo istotnym wydaje się fakt, że w grupie ran małych w T6 aż 8 ran z 10 (80%) stanowiły rany, w których doszło do gojenia, w tym wszystkie 4 rany, których pole powierzchni zmniejszyło się o ponad 90%.



Rysunek 8. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T6 [\log_{10}].

Zbadano także zależność pomiędzy liczebnością drobnoustrojów w ranie a typem owrzodzenia. Obliczenia przeprowadzono dla typu żylnego, tętniczego oraz innych, a także dla drugiego podziału: obecności i nieobecności zespołu stopy cukrzycowej. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie globalnej liczebności (Tabela 49 i 50). Zarówno dla owrzodzeń tętnicznych, żylnych i innych obserwowano

zbliżone wartości globalnej liczebności drobnoustrojów (mediana 6,7-6,9), jedynie w zespole stopy cukrzycowej mediana wynosiła 7,0, bez statystycznie istotnej różnicy w stosunku do pozostałych typów ran.

Tabela 49. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla różnych typów owrzodzenia (tętnicze, żyłne, inne) [\log_{10}].

Typ	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Tętnicze	18	6,8	1,5	3,2	6,2	6,9	7,9	8,9
Żyłne	17	6,5	1,8	1	5,8	6,8	7,7	8,9
Inne	11	5,9	2,5	1	5,6	6,7	7,6	8,2

Tabela 50. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla obecnego zespołu stopy cukrzycowej i braku tego rozpoznania [\log_{10}].

	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Stopa Cukrzycowa: Nie	35	6.36	2.08	1.00	5.65	6.78	7.88	8.95
Stopa Cukrzycowa: Tak	11	6.95	0.78	5.60	6.42	7.00	7.63	8.15

5.4.4. Analiza poprawy klinicznej i wyznaczenie profilu gojenia się rany

Wygojenie rany jest zakończeniem etapu leczenia rany przewlekłej. Niestety, do całkowitego wygojenia nie doszło w żadnej z obserwowanych ran. Odnotowano jedynie znaczące zmniejszenie pola powierzchni (powyżej 90%) w czterech ranach (4 z 40 – 10%), co wskazuje na tendencję do całkowitego wygojenia. Należy pamiętać, że w ranie na podłożu naczyniowym gojenie jest długotrwałym procesem, trudno więc po sześciu tygodniach oczekiwać, że rana wygoi się całkowicie. Dlatego przyjęto, jak już wcześniej opisano, redukcję pola powierzchni rany powyżej 20% za wskaźnik gojenia (strona 57).

Zadano pytanie: który z typów owrzodzenia wykazuje znacząco częściej niż inny tendencję gojenia. W tym celu oceniono typy owrzodzeń

w kategorii: Bez gojenia i Gojenie. Wyniki analiz przedstawione są w Tabeli 51 i 52.

Tabela 51. Typ owrzodzenia a gojenie rany.

Kategoria	Bez gojenia	Gojenie
Tętnicze	11 (73,3%)	4 (26,7%)
Żylne	9 (52,9%)	8 (47,1%)
Inne	3 (37,5%)	5 (62,5%)

Tabela 52. Typ owrzodzenia: w kategorii: stopa cukrzycowa a gojenie rany.

Kategoria	Bez gojenia	Gojenie
Stopa Cukrzycowa: Nie	20 (62,5%)	12 (37,5%)
Stopa Cukrzycowa: Tak	3 (37,5%)	5 (62,5%)

Obserwowano, że gojenie najczęściej występowało u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej (62,5%), najrzadziej w owrzodzeniach typu tętniczego (26,7%). Nie stwierdzono jednakże statystycznie istotnych różnic w rozkładzie częstości gojenia (opartego na spadku 20% powierzchni) w różnych typach owrzodzeń.

Analizowano również, jak w ranach z wyznaczonych klas pola powierzchni przebiega gojenie. Przeprowadzono osobną analizę dla T1 i T6. Wyniki umieszczono w Tabeli 53 i 54.

Tabela 53. Gojenie vs. Pole powierzchni rany w T1.

Kategoria	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
Bez gojenia	2 (8,7%)	7 (30,4%)	14 (60,9%)
Powyżej 20%	1 (5,9%)	8 (47%)	8 (47,1%)

Nie stwierdzono różnicy w częstościach kategorii pola powierzchni rany w grupach gojenia.

Tabela 54. Gojenie vs. Pole powierzchni rany w T6.

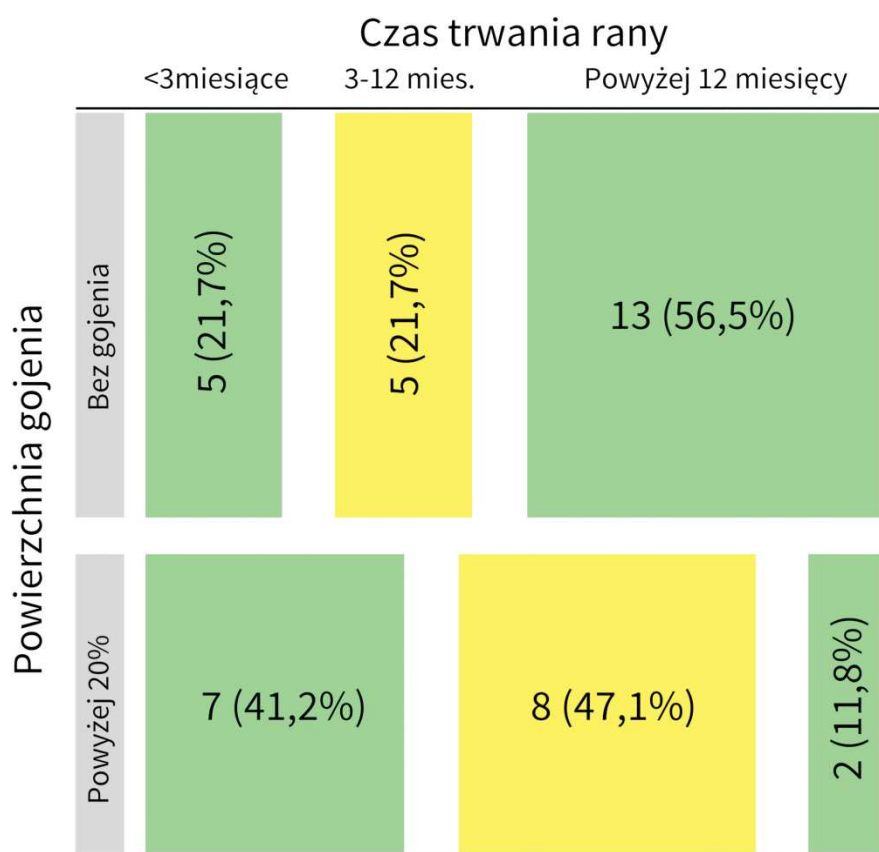
Kategoria	$\leq 1 \text{ cm}^2$	Powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2	$> 10 \text{ cm}^2$
Bez gojenia	2 (8,7%)	7 (30,4%)	14 (60,9%)
Powyżej 20%	8 (47,1%)	4 (23,5%)	5 (29,4%)

Stwierdzono, że rany w których nie było procesu gojenia, mają statystycznie istotnie częściej większą powierzchnię (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2] = 8,0$; $p < 0,019$).

Zadano pytanie, czy gojenie jest zależne od czasu trwania rany. Przeprowadzona analiza dla trzech kategorii wieku rany wykazała, że rany, w których nie było procesu gojenia, są statystycznie istotnie częściej starsze (Test Chi-kwadrat, $\chi^2[2] = 8,4$; $p < 0,015$) niż rany, w których występowało gojenie (Tabela 55, Rysunek 9).

Tabela 55. Gojenie vs. Czas trwania rany.

Kategoria	≤ 3 miesięcy	Powyżej 3 do 12 miesięcy	> 12 miesięcy
Bez gojenia	5 (21,8%)	5 (21,7%)	13 (56,5%)
Powyżej 20%	7 (41,2%)	8 (47%)	2 (11,8%)



Rysunek 9. Gojenie vs. Czas trwania rany.

Zastanawiano się również, jakie gatunki lub grupy drobnoustrojów można powiązać z ranami w stanie gojenia. Nie stwierdzono jednakże statystycznie istotnych różnic dla 10 dominujących gatunków drobnoustrojów. Dla grup drobnoustrojów wykazano statystycznie istotną różnicę u *Streptococcus anginosus* group (dokładny test Fishera, $p < 0,03$). W przypadku obecności drobnoustrojów z tej grupy, w ranie statystycznie istotnie częściej nie dochodzi do gojenia (Tabela 56).

Tabela 56. Liczba i częstość grup drobnoustrojów dla ran bez gojenia i z cechami gojenia.

Grupa drobnoustrojów	Bez gojenia	Gojenie
<i>S. aureus</i>	13/23 (56,5)	6/17 (35,3)
<i>P. aeruginosa</i>	12/23 (52,2)	8/17 (47,1)
<i>Helcococcus</i>	5/23 (21,7)	2/17 (11,8)
<i>Streptococcus</i> z β -hem.	2/23 (8,7)	4/17 (23,5)

Grupa drobnoustrojów	Bez gojenia	Gojenie
<i>Streptococcus anginosus</i> group	6/23 (26,1)	0/17 (0)
<i>Enterococcus</i>	7/23 (30,4)	4/17 (23,5)
<i>Enterobacterales</i>	16/23 (69,6)	6/17 (35,3)
PG(-) niefermentujące	10/23(43,5)	4/17(23,5)
CNS	13/23(56,5)	9/17(52,9)
Inne	8/23(34,8)	4/17(23,5)

Do analizy związku liczebności drobnoustrojów z gojeniem rany wykorzystano parametr globalnej liczebności, opisywany w rozdziale „Analiza liczebności drobnoustrojów w podstawowych parametrach rany”, na stronie 83.

Zadano pytanie, czy proces gojenia ma związek z liczebnością drobnoustrojów. Analiza globalnej liczebności drobnoustrojów dla ran gojących się i niegojących wykazała niższe wartości globalnej liczebności dla ran gojących się (mediana 6,54 vs. 7,0). Nie jest to jednak różnica statystycznie istotna (Tabela 57).

Tabela 57. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla ran z gojeniem i bez.

	N	Średnia	SD	Min.	Q25	Q50	Q75	Maks.
Bez gojenia	23	6.85	1.41	3.19	6.02	7.00	7.97	8.95
Gojenie	17	5.79	2.43	1.00	5.45	6.54	7.40	8.49



Rysunek 10. Gojenie rany. Obserwacje w T1, T3, T5, T6.

6. Dyskusja

Rany przewlekłe dotyczą najczęściej populacji osób w wieku podeszłym. Prace poświęcone problemowi ran trudno gojących się najczęściej opisują pacjentów z medianą wieku powyżej 60 lat. Uważa się, że przyczyną powstania zaburzeń gojenia tkanek jest nieprawidłowa odpowiedź starszego organizmu na stres związany z ich niedotlenieniem lub stres oksydacyjny, obserwowane najczęściej w uszkodzeniu typu hipoksja – reperfuzja, które ma miejsce w niewydolności naczyniowej zarówno tętniczej jak i żylniej, częściej u osób w starszej grupie wiekowej (138). W wyniku niedotlenienia dochodzi do wzrostu ATP w ranie oraz obniżenia pH płynu międzykankowego (metabolizm beztlenowy, kumulacja mleczanów). ATP-zależne mechanizmy transportu prowadzą do wzrostu Ca^{2+} , co prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek. Pomimo, że w kolejnym etapie dochodzi do reperfuzji i tym samym przywrócenia odpowiedniego stężenia tlenu, w wyniku nagromadzenia neutrocytów w niedotlenionych tkankach i działania mechanizmów prozapalnych postępuje ich uszkodzenie. Ze względu na powtarzające się incydenty hipoksja – reperfuzja, możliwości naprawcze są ograniczone (139,140). W efekcie obserwuje się 3-4 krotny wzrost liczby pacjentów z owrzodzeniem żylnym po 80 roku życia w porównaniu z osobami w przedziale wiekowym 65-70 lat (141,142). O'Brien i wsp. opisał populację irlandzką w 1998 roku, gdzie częstość występowania ran przewlekłych wynosi średnio 0,12%, z tego owrzodzenia żylna stanowią 81%, zaś tętnicze 16,3% (143). W niemieckim badaniu prowadzonym w latach 2010-2012 przez Heyer i wsp. rany przewlekłe stanowiły problem 0,42% badanych, zaś najczęstszym rozpoznaniem było „owrzodzenie podudzi”

bez sprecyzowania etiologii (0,3% badanych). Owrzodzenia żyłne rozpoznano u 0,16% osób, tętnicze u 0,04%, zespół stopy cukrzycowej u 0,1% populacji osób dorosłych (144). Obszerne dane brytyjskie opracowane przez Guesta i wsp. w latach 2012-2013 przedstawiają problem ran przewlekłych w 1,5% populacji badanej (145). W Polsce brak jest aktualnych wyników analiz populacyjnych. Zakrojone na szeroką skalę badania, obejmujące ponad 40 tysięcy pacjentów, były przeprowadzone przez Jawienia i wsp., wyniki ich opublikowano w 2003 roku (146). Pomimo tak obszernej analizy, ograniczono się jedynie do oceny częstości występowania niewydolności żyłnej oraz występowania ran przewlekłych na tle tej niewydolności. Oszacowano, że częstość występowania aktywnych owrzodzeń żylnych w Polsce to 0,5% populacji osób dorosłych, zaś częstość osób z zaawansowaną niewydolnością żylną, u których stwierdzono występowanie owrzodzeń łącznie: wyleczonych i aktywnych wynosi średnio 1,5% (146).

W niniejszym opracowaniu nie przeprowadzono oceny częstości występowania ran przewlekłych w populacji ogólnej. Przeanalizowana grupa osób reprezentowała jedynie wycinek populacji pacjentów borykających się z tym problemem, była niejako wyselekcjonowana i ograniczona do podopiecznych KMHiRM w Gdyni.

W badanej grupie średnia wieku pacjentów wyniosła 69,3 lata. Średnia wieku pacjentów z niegojącymi się ranami kończyn dolnych podawana przez różnych autorów zależała od rodzaju owrzodzenia oraz badanej populacji. Obserwowany średni wiek pacjentów dla populacji irlandzkiej wynosił 72,3 lata (143), dla angielskiej (Londyn) 75 lat (147), dla pacjentów z Serbii 61,4 lat (148), z Włoch 69,6 lat (149), dla pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej w badaniach prowadzonych w USA 63,8 lat (150),

dla chorych w Wielkiej Brytanii z owrzodzeniami o etiologii naczyniowej z wykluczeniem zespołu stopy cukrzycowej 75 lat (151).

W polskim badaniu populacyjnym Jawień i wsp. zwraca uwagę na problem częstszego występowania niewydolności żylniej u kobiet niż u mężczyzn (35,3% vs. 27,9%), jednakże skrajna postać niewydolności żylniej (owrzodzenie) występowała częściej u mężczyzn niż u kobiet (0,7% vs. 0,5%). W niniejszej pracy mężczyźni byli dominującą częścią grupy badanej (67,4%), a kobiety były znacząco starsze niż mężczyźni – średnia wieku kobiet wynosiła 74,7 lat, średnia wieku mężczyzn 66,7 lat. Podobny rozkład wieku związany z płcią zaobserwował Baker i wsp. oraz Lim i wsp. w badanej populacji w Australii (152,153). Przeprowadzone analizy nie wykazały różnic w średniej wieku pacjentów związanej z rozpoznaniem owrzodzenia tętniczego, żylnego i stopy cukrzycowej, jednakże Apollonio i wsp. zwraca uwagę na to, że owrzodzenia o etiologii żylniej występują w starszych grupach wiekowych częściej niż inny typ owrzodzeń (149).

W niniejszej dysertacji opisywano rany następującymi wybranymi parametrami oceny klinicznej:

1. Rodzaj owrzodzenia (etiologia)
2. Czas trwania rany
3. Pole powierzchni rany
4. Gojenie rany

Etiologia owrzodzeń wśród badanych pacjentów, była niezwykle zróżnicowana. Ze względu na tę różnorodność, zdecydowano się na dwa podziały ran uwzględniając ich etiologię. Pierwszy podział dotyczył zmian naczyniowych dużych tętnic oraz żył. Wszystkie pozostałe rany, nie mieszczące się w tych dwóch kategoriach, wydzielono jako inną grupę. Nie była ona jednakże jednorodna. Dominowali pacjenci z zespołem stopy

cukrzycowej, ale też zakwalifikowano tu pacjentów z raną pourazową. Drugi podział wyznaczyli pacjenci z zespołem stopy cukrzycowej. Według definicji, zespół stopy cukrzycowej jest to owrzodzenie i/lub destrukcja tkanek głębokich w połączeniu z zaburzeniami neurologicznymi oraz chorobami naczyń obwodowych w różnym stopniu zaawansowania (154). Osoby, u których nie rozpoznano tego zespołu, stanowiły osobną grupę do analiz. Ocenia się, że zespół stopy cukrzycowej rozwija się u 0,6-2% osób z cukrzycą typu I oraz 12-18% osób z cukrzycą typu II (155). Najgroźniejszym powikłaniem tej choroby jest infekcja, która może zakończyć się utratą kończyny lub zgonem. W badanej grupie pacjentów u jednej osoby wystąpiło gwałtowne pogorszenie stanu kończyny, prawdopodobnie na tle infekcyjnym, zakończone zejściem śmiertelnym.

Czas trwania rany jest to czas nieskutecznego gojenia od momentu jej wystąpienia. Za czas trwania rany (ang. *wound duration*) przyjmuje się czas od momentu powstania rany do dnia pierwszej obserwacji w danym ośrodku. W niniejszej pracy przyjęto czas trwania rany 4 tygodnie, jako czas różnicujący ranę przewlekłą od innych. Khanna i Tiwary (10) w ich obszernej monografii dotyczącej ran przewlekłych kończyn dolnych oraz Järbrink i wsp. (156) także przyjmują 4 tygodnie jako dolną granicę czasu trwania rany trudno gojącej się. Z kolei Werdin i wsp. podaje, że dopiero po 3 miesiącach od powstania rany możemy definiować ją jako przewlekłą (21). Wszyscy autorzy jednakże są zgodni, że po 12 tygodniach rana w prawidłowych warunkach powinna ulec wygojeniu. Okres pomiędzy 4 a 12 tygodniem jest szczególnie interesujący mikrobiologa, gdyż procesy patologiczne w łożysku rany trwają krótko, a środowisko bakteriologiczne rany jest niestabilne. Rany o tym czasie trwania wydzielono więc jako osobną grupę do analiz.

Kolejna ważna wartość w skali czasu trwania rany to 1 rok. Ze względu na to, że wielu autorów przyjmuje ten czas trwania rany do analiz ustalono na potrzeby niniejszego opracowania, że wydzielona zostanie grupa ran obejmująca rany o czasie trwania pomiędzy 3 a 12 miesięcy (157–159). Rany trwające powyżej 12 miesięcy od momentu wystąpienia stanowiły ostatnią grupę, którą analizowano w pracy. Ta grupa, ze względu na duże prawdopodobieństwo występowania stabilnej mikrobioty (biofilm), stanowiła kolejne ciekawe wyzwanie badawcze.

Czas trwania rany w grupie analizowanych ran wynosił średnio 44,1 miesiąca, mediana 6 miesięcy (min. 1 miesiąc; maks. 504 miesiące). Badacze w swoich publikacjach opisują różne grupy chorych. Najkrótszy średni czas trwania rany w swojej grupie badanej podaje Margolis i wsp. (150). Wynosił on 5,39 miesiąca, mediana 1 miesiąc, badanie dotyczyło pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej. Z kolei średni czas trwania rany w grupie pacjentów Milica i wsp., który badał pacjentów z owrzodzeniem żylnym wynosił 6,2 lat – od 4 miesięcy do 17 lat (148).

Pole powierzchni rany jest to parametr chętnie opisywany w literaturze. Badacze, w celu przeprowadzenia badań porównawczych, przyjmują różne podziały wielkości ran. Knighton i wsp. analizuje 6 przedziałów wielkości pola powierzchni ran (w cm^2 : poniżej 1, 1-2, 2-5, 5-10, 10-30 oraz powyżej 30) (157). Apollonio i wsp. przyjmuje 3 przedziały wielkości pola powierzchni ran (w cm^2 : poniżej 2, 2-4 oraz powyżej 4) (149). Rippon i wsp. ograniczył się do 2 przedziałów: ran mniejszych i większych od 10 cm^2 (159). Uwzględniając spostrzeżenia wyżej wymienionych autorów, w pracy ustalono następujący podział wielkości ran na trzy grupy: o polu powierzchni rany do 1 cm^2 włącznie, powyżej 1 cm^2 do 10 cm^2 oraz powyżej 10 cm^2 . Założono, że tak dobrane grupy pod względem wielkości

będą pomocne w wykryciu zależności pomiędzy występowaniem różnych gatunków drobnoustrojów. Nie stwierdzono jednak zależności pomiędzy polem powierzchni rany a występowaniem gatunków drobnoustrojów lub grup w ustalonych trzech przedziałach wielkości ran.

Z doświadczeń autorki pracy wynika, że pacjenci z raną nie poddającą się gojeniu początkowo zaopatrują ranę wypróbowanymi, domowymi sposobami. Nie mają początkowo świadomości skali problemu i, jeśli rana jest niewielka, szukają fachowej pomocy dopiero po kilku tygodniach trwania rany. Pacjenci z owrzodzeniem nawracającym zgłaszają się na wizytę w krótszym czasie po wystąpieniu rany. Jak podaje Marston, 28-56% wyleczonych owrzodzeń o etiologii żyłnej ulega nawrotowi w okresie 2 lat (160). Zaleca się więc leczenie pacjentów w wyspecjalizowanych ośrodkach, gdyż wielospecjalistyczne zespoły terapeutyczne odnoszą największe sukcesy w leczeniu ran przewlekłych (33), a nawrotowe występowanie owrzodzeń jest wskazaniem do interwencji chirurgicznej (13,159,160).

W licznych publikacjach widoczne jest staranie o wyznaczenie czynników predykcyjnych gojenia rany przewlekłej. Jednym z takich czynników jest wymieniony wcześniej czas trwania rany. Im dłuższy czas od momentu wystąpienia rany do rozpoczęcia leczenia w danym ośrodku, tym mniejsze prawdopodobieństwo jej wygojenia. Margolis i wsp. (161) podaje, że dwoma niezależnymi czynnikami wpływającymi na wygojenie rany są wielkość rany (oceniał dwa przedziały wielkości: mała poniżej 10 cm² oraz duża powyżej 10 cm²) i czas trwania rany. W innym opracowaniu Margolis i wsp. stwierdza, że dwoma głównymi czynnikami prognostycznymi wygojenia w ciągu 24 tygodni ma rana mała do 5 cm² pola powierzchni trwająca do 6 miesięcy (162). Rana duża, trwająca

powyżej 12 miesięcy, nie ulegnie wygojeniu z prawdopodobieństwem 78%, natomiast rana trwająca poniżej 12 miesięcy - 56%. Rana mała nie ulegnie wygojeniu w odpowiednio: 44% i 29%. Milic i wsp. (148) potwierdzają zaobserwowane obserwacje Margolisa i wsp. Według tego badacza, korzystnymi czynnikami sprzyjającymi gojeniu owrzodzenia żylnego są: powierzchnia owrzodzenia poniżej 20 cm², czas trwania rany poniżej 12 miesięcy, dobra reakcja na leczenie kompresyjne (zmniejszenie obwodu łydki o 3 cm w ciągu 50 dni) oraz występowanie wysp naskórka na więcej niż 10% pola powierzchni rany.

W niniejszej pracy obserwowano pacjentów przez 6 tygodni, nie jest to jednakże wystarczający czas na całkowite wygojenie rany przewlekłej. Podaje się, że dla wygojenia rany w zespole stopy cukrzycowej potrzeba średnio 20 tygodni, a dla owrzodzenia o etiologii żylniej 24 tygodnie. Często czas ten się wydłuża do 48-52 tygodni (148,151,163). Uwzględniając powyższe, za miarę gojenia przyjęto zmniejszenie pola powierzchni rany powyżej 20% (22,113,164). W obserwowanych ranach ponad 20% zmniejszenie pola powierzchni zaobserwowano w 17 na 40, które ukończyły badanie (42,5%), przy czym dwie rany z 17 trwały dłużej niż jeden rok (11,8%). Z drugiej strony, z 16 ran trwających powyżej 12 miesięcy gojenie zaobserwowano w 2 (12,5%). Rany te miały pole powierzchni większe niż 10 cm² oraz etiologię żylną. Odsetek gojących się ran dużych z czasem trwania powyżej 12 miesięcy w niniejszym badaniu nie różni się od obserwacji wyżej wymienionych autorów, jednakże w przypadku pacjentów omawianych w niniejszym opracowaniu proces gojenia nie był zakończony, więc nie można dokładnie porównywać uzyskanych wyników z wynikami innych badaczy. W analizowanych ranach gojenie przebiegało lepiej w przypadku ran mniejszych, nie udało

się jednakże wskazać granicznej wartości pola powierzchni rany z tendencją do gojenia. Podobna sytuacja w przeprowadzonych analizach statystycznych występowała, gdy analizowano zależność gojenia i czasu trwania rany. Wykazano, że brak gojenia występował częściej w ranach starszych. Wydaje się, że niemożność określenia kryterium wielkości i wieku rany w podobny sposób, jak cytowani autorzy prac, wynika z problemu zbyt małej liczebności grupy badanej. W dużej grupie pojedyncze odstające przypadki nie mają większego wpływu na wyniki badań statystycznych.

W obecnej pracy do charakterystyki ran wykorzystano wyniki badań mikrobiologicznych. Posłużyły one do realizacji celów badawczych, które opisano wcześniej („Cele pracy”, strona 34):

1. Analiza jakościowa, rozumiana jako analiza częstości występowania gatunków lub grup drobnoustrojów w okresie całego badania oraz tygodniami, analiza zależności międzygatunkowych oraz analiza występowania drobnoustrojów w określonych aspektach klinicznych.
2. Analiza ilościowa wyhodowanych drobnoustrojów, przez którą rozumiano ocenę liczebności drobnoustrojów w badaniu mikroskopii bezpośredniej treści pobranej z rany oraz liczebności kolonii wyrosłych na podłożach stałych w CFU/ml w okresie tygodniowym i globalnie oraz obserwację zmian tej liczebności w czasie obserwacji i w określonych parametrach ran.

Podstawowym założeniem przy projektowaniu niniejszego badania było to, że w ranie przewlekłej są obecne drobnoustroje. Ubytek skóry, podstawowej bariery ochronnej przed wszechobecnymi w środowisku mikroorganizmami, wypełnia się sukcesywnie drobnoustrojami. Uznaje

się, że po okresie wstępnej kolonizacji przez bakterie Gram-dodatnie, rana uzupełniana jest o kolejne gatunki – pałeczki Gram-ujemne oraz beztlenowce (101). Obserwację taką najczęściej przedstawiają badacze ran oparzeniowych, gdyż rany te są pod ścisłą kontrolą lekarską od początku ich powstania (40,165,166).

Rany oparzeniowe rzadko kolonizowane są przez bakterie beztlenowe (149). W przypadku infekcji ran o etiologii naczyniowej występującej do 4 tygodni od ich wystąpienia, uwzględnia się fakt „sukcesji” drobnoustrojów, formułując odpowiednie zalecenia terapeutyczne (w początkowym okresie ukierunkowanie leczenia na drobnoustroje Gram-dodatnie, po upływie 4 tygodni uwzględnienie w leczeniu drobnoustrojów Gram-ujemnych oraz beztlenowców) (167). W przypadku ran przewlekłych trudno jest określić pierwotną mikrobiotę, gdyż interwencja lekarska lub pielęgnarska ma miejsce po kilku dniach – tygodniach, czyli na późniejszym etapie kolonizacji bakteryjnej rany. Środowisko rany przewlekłej umożliwia koegzystencję wielu gatunków bakterii, a ich różnorodność oraz obfitość może świadczyć o korzystnych warunkach dla drobnoustrojów w ranie. Pomimo obecnych czynników obrony nieswoistej i swoistej gospodarza, narażenia na czynniki zewnętrzne środowiska, działanie toksycznych substancji chemicznych, jak antyseptyki i antybiotyki, drobnoustroje są w stanie trwać w ranie przez wiele tygodni, miesięcy, a nawet lat. Jest to możliwe jedynie po utworzeniu biofilmu ze składem gatunkowym sprzyjającym wzajemnemu przeżyciu mikroorganizmów.

W trakcie trwania badania obserwowano skład gatunkowy jedynie drobnoustrojów tlenowych oraz liczebność tych drobnoustrojów w ranach. Drobnoustrojami tlenowymi w ranach przewlekłych zajmowali się także:

Xu i wsp., Ratliff i wsp., Steer i wsp., Rhoads i wsp. (72,168–170). W trakcie trwania badania drobnoustroje beztlenowe były badane dwukrotnie: w pierwszym i szóstym tygodniu badania. Zawsze występowały w mieszanej hodowli z bakteriami tlenowymi. Były wyhodowane w trzech ranach, zaś na końcu obserwacji w siedmiu ranach. Zastanawiające jest, że pomimo terapii ukierunkowanej na drobnoustroje beztlenowe (HBOT), nie dochodzi do ich eradykacji z ran. Taką sytuację w ranach niepoddawanych HBOT opisywali już inni autorzy (171). Może ona być związana z obecnością trwałego biofilmu w ranach, w którym zdolne są przetrwać dzięki obecności bakterii zużywających tlen. Pojawienie się beztlenowców w pięciu ranach w ostatnim tygodniu obserwacji może świadczyć o dynamicznym rozwoju biofilmu.

W pracy podjęto próbę oceny zmienności składu bakteriologicznego rany w niekorzystnych dla drobnoustrojów warunkach. Zjawisko zmienności drobnoustrojów w ranie jest niezwykle rzadko analizowane przez badaczy. Jest to pierwsza, innowacyjna praca, w której podjęto się cotygodniowej obserwacji flory ran przewlekłych. W bazach danych PubMed i Scopus nie odnaleziono publikacji z podobną metodyką. Dodatkowo, nie znaleziono opublikowanych analiz, które byłyby przeprowadzone u pacjentów leczonych tlenem hiperbarycznym. Jest to pierwsze badanie analizujące zmienność drobnoustrojów w ranach przewlekłych podczas HBOT, obejmujące jednocześnie aspekt kliniczny i laboratoryjny. Dodatkowo, zaletą przeprowadzania badania, jest aspekt epidemiologiczny, ponieważ badana była polska populacja pacjentów. Pomiedzy krajami europejskimi mogą występować znaczne różnice w częstości występowania drobnoustrojów wieloopornych (172). Przykładem może być fakt, że grupie badanej nie odnotowano rany

skolonizowanej przez MRSA, a jest to powszechne zjawisko w populacji pacjentów Europy Zachodniej (33). Lekarze, opierający leczenie na wynikach autorów z innych krajów europejskich, mogą podejmować nieoptymalne decyzje terapeutyczne. Dodatkowo, badania mikrobiologiczne przeprowadzane w niniejszym badaniu były wpisane w naturalny proces leczenia pacjentów. Dla badacza ważnym wydawał się fakt, że wymazy treści z ran będą pobierane u pacjentów w trakcie leczenia, które sprzyjało eliminacji drobnoustrojów. Przede wszystkim HBOT umożliwiała lepsze utlenowanie rany, dzięki czemu zwiększała się ilość aktywnych związków, poprawiających warunki gojenia oraz usuwanie drobnoustrojów na drodze odporności nieswoistej. Drugim istotnym czynnikiem zmierzającym do eradykacji drobnoustrojów była podaż antybiotyku celowanego, który, pomimo utrudnień w penetracji do miejsca docelowego, jakim jest rana przewlekła, wywierał jednakże działanie obniżając potencjał inwazyjny drobnoustrojów. Kolejnym czynnikiem były właściwie dobrane opatrunki oraz opieka nad raną. Pacjent był pod opieką KMHiRM i miał dostęp do lekarza przez 5 dni w tygodniu, stosowane leczenie miejscowe lub ogólne było nadzorowane w sposób ciągły. Szczególnie duży wpływ na status mikrobiologiczny rany mogło mieć zastosowanie antybiotyków, dlatego analizowano ten aspekt osobno. Zasadne wydawały się więc częste (cotygodniowe) obserwacje składu bakteryjnego ran. Stosowanie antybiotyków w leczeniu ran przewlekłych jest szeroko dyskutowane. Niektórzy badacze podkreślają jednakże fakt, że antybiotyki podawane ogólnie nie wywierają istotnego wpływu na mikrobiotę powierzchni owrzodzenia, są użyteczne jedynie w przypadku występowania objawów inwazyjnego zakażenia rany,

a nadmierne stosowanie prowadzi do zwiększenia częstości występowania drobnoustrojów wieloopornych w ranie (173).

W wykonanych wymazach z 46 ran uzyskano wzrost 59 gatunków drobnoustrojów tlenowych, zaś łącznie z beztlenowymi uzyskano 67 różnych gatunków. Jest to o wiele większa liczba, niż w przypadku 46 ran duńskich badaczy (Gjødsbøl i wsp.). W badanych przez nich również 46 ranach (owrzodzenia żyłne), otrzymano w posiewie tlenowym i beztlenowym łącznie 37 gatunków, a identyfikacja była przeprowadzona standardowymi metodami mikrobiologicznymi oraz przy użyciu aparatu VITEK bioMérieux. Częstość ich występowania u Gjødsbøl była diametralnie różna od otrzymanej w niniejszym badaniu. Szczególnie dotyczy to *S. aureus* (u Gjødsbøl wykrywany był w znaczącej większości ran - 93,5%), *E. faecalis* (71,1%), a *P. aeruginosa* (52,2%) ran (36). Zazwyczaj autorzy podają, że *S. aureus* występuje w 40-88% ran, *P. aeruginosa* w 20-40%, inne pałeczki Gram-ujemne w 20-30%, *S. epidermidis* 14-25% (10,33,77,174). W wykonanych wymazach na potrzeby niniejszej pracy najczęściej izolowanym drobnoustrojem był *P. aeruginosa* (45,7% ran). W literaturze *P. aeruginosa* jest uznawany za kluczową bakterię powodującą zakażenia ran przewlekłych, główny składnik biofilmu w ranie, najczęściej jednak jest oceniany jako drugi co do częstości drobnoustrój (65,95,159,170,175). Kolejnym pod względem częstości w obecnej pracy był *S. aureus* (41,3% ran). Wielu autorów podaje, że gatunek ten jest zdecydowanie najczęściej izolowany z ran przewlekłych i, wraz ze *S. epidermidis*, jako pierwszy kolonizuje ranę (176). W badanych ranach częstość występowania gatunków drobnoustrojów ulegała nieznacznym wahaniom tygodniowym. Największą zmianę częstości - spadek powyżej 10 punktów procentowych pomiędzy T1 a T6 odnotowano dla

S. epidermidis (28,6% vs. 16,2%) i *E. faecalis* (21,4% vs. 8,1%). Dla grup drobnoustrojów obserwowano spadki powyżej 10 punktów procentowych w przypadku grupy *Enterococcus* (26,2% vs. 10,8%) oraz *Enterobacterales* – nazwa grupy pochodzi od nazwy nowego, politypowego rzędu ord.nov. obejmującego łącznie 7 rodzin - (54,8% vs. 40,5%) (177). Nie była to jednakże statystycznie istotna różnica. Częstość występowania gatunków może mieć związek z trwałością struktury biofilmu w ranie. Pośrednio o trwałości biofilmu można wnioskować badając czas pobytu drobnoustrojów w owrzodzeniu. Im czas pobytu jest dłuższy, tym struktura na powierzchni rany trwalsza. W tym celu przeanalizowano 10 dominujących gatunków drobnoustrojów oraz utworzone grupy tygodniami. Okazuje się, że w badanej grupie ran najdłużej utrzymywał się *S. agalactiae* (przez średnio 4,6 tygodni) i *H. kunzii* (4,29 tygodni). *P. aeruginosa* utrzymywał się w ranach również długo, bo 4,1 tygodni. Analiza statystyczna wykazała, że drobnoustrój ten występuje statystycznie istotnie dłużej niż *S. epidermidis* i *E. faecalis*. Dla innych gatunków nie wykazano tej zależności. Analiza dla grup drobnoustrojów potwierdziła, że najdłużej utrzymują się *Streptococcus* z β -hem. (4,83 tygodni), ale także *Streptococcus anginosus* group (4,17 tygodni). Nie było możliwości wskazania wartości progowej podziału na grupy dłużej i krócej bytujące w ranie. Przytoczonych danych nie można przedyskutować z innymi badaczami, gdyż nie znaleziono odpowiedniego doniesienia na ten temat.

Helcococcus spp. oraz grupa *Streptococcus anginosus* (nazywana również „grupą milleri”) są patogenami, które coraz częściej wykrywane są w próbkach bakteriologicznych różnego pochodzenia, prawdopodobnie ze względu na coraz doskonalsze metody identyfikacji drobnoustrojów,

jak m.in. spektrometr masowy MALDI-TOF (76). Przed jego wprowadzeniem do diagnostyki mikrobiologicznej, najlepszą metodą wykrywania tych drobnoustrojów było badanie genetyczne (178). Ze względu na wygląd kolonii, powolny wzrost oraz trudności w identyfikacji metodami tradycyjnymi, mogą one być pomijane w rutynowych badaniach mikrobiologicznych lub kwalifikowane jako drobnoustroje niepatogenne z grupy *Streptococcus viridans* (179). Niektórzy autorzy opisują inwazyjne zakażenia szyi i klatki piersiowej spowodowane przez te drobnoustroje, a także wykazują ich obecność w materiałach z ran, ropni, tkanek (180–183). W monografii poświęconej inwazyjnym zakażeniom wywołanym przez *Streptococcus anginosus* group (*S. anginosus*, *S. constellatus* oraz *S. intermedius*) Junckerstorff i wsp. przedstawia przypadki sepsy i zgonu wywołane przez te drobnoustroje (180). Pojawiają się pojedyncze doniesienia dotyczące infekcji wywołanej przez *H. kunzii* w zespole stopy cukrzycowej (184,185). Dochodzą również nowe dane na temat patogenności drobnoustrojów z grupy *Streptococcus anginosus* w zakresie tworzenia i utrzymania biofilmu. Wykazano bowiem, że niektóre szczepy (CF004) wytwarzają metabolity, które powodują zwiększenie produkcji ramnolipidów, flagelliny, egzotoksyn, elastazy i fenazyny przez *P. aeruginosa*. Metabolity te nazwano Autoinduktorem-2 (AI2) (186,187). Liczne prace wykazują, że AI-2 jest odpowiedzialny za umożliwienie komunikacji międzygatunkowej (48,188). Zwrócono uwagę na to, że *Streptococcus anginosus* group wpływają również na inne drobnoustroje i mogą odpowiadać za nawrotowość i przewlekłość zakażeń układu oddechowego w POCHP (187).

W pracy przeanalizowano, czy określone gatunki lub grupy drobnoustrojów częściej niż inne występują w różnych typach

owrządzenia. Dla dominujących gatunków oraz dla grup nie wykazano istotnej różnicy w częstości występowania, poza *A. baumannii*, który w badanej grupie pacjentów występował w zespole stopy cukrzycowej statystycznie istotnie częściej. Drobnoustrój ten jednakże znajdowano w 5 ranach, więc wynik ten nie przekłada się na wyniki populacyjne. *A. baumannii* jest drobnoustrojem powszechnie występującym w środowisku szpitalnym, zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii, które zasiedla endemicznie (22,189–191). Wykazuje też oporność na działanie antybiotyków oraz niektórych antyseptyków, co stwarza problem w jego eradykacji (191–193). Na powierzchni ran może tworzyć biofilm (194,195). Obecność *A. baumannii* w ranach jest pośrednim dowodem na to, że ranę kolonizują drobnoustroje z otoczenia pacjenta, gdyż drobnoustroje te znajduje się najczęściej w środowisku szpitalnym, a wcześniejsze hospitalizacje oraz szerokospektralna antybiotykoterapia są czynnikami predysponującymi do kolonizacji skóry i ran przez *A. baumannii* (189). Szczepy wielooporne w niniejszym opracowaniu wykryto w 11 ranach, co stanowi 23,9% ran. Wielu autorów zwraca uwagę na występowanie infekcji ran wywołanych przez wielooporne drobnoustroje, szczególnie na oddziałach szpitalnych. Coraz częściej opisuje się problem szczepów opornych na karbapenemy z rodziny *Enterobacterales* (196–200). Zastanawiające jest to, że w żadnej z badanych ran nie stwierdzono obecności MRSA, który w różnych krajach rozprzestrzenił się w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym (201–203). W literaturze anglojęzycznej podnosi się problem powszechnego występowania MRSA, który może stanowić znaczący odsetek szczepów opornych (204–206). Możliwe, że pacjenci ze względu na region, z którego pochodzą, mogą dysponować pewną unikalną pulą szczepów

lekoopornych, jednakże sprawdzenie tej hipotezy wiązałoby się z pogłębionymi analizami epidemiologicznymi, które nie wchodziły w zakres obecnego badania.

Przeanalizowano także występowanie grup drobnoustrojów w ranach różnej wielkości i okazało się, że w pierwszym tygodniu obserwacji częściej w ranach dużych występuje *S. aureus*. W szóstym tygodniu obserwacji w ranach większych częściej niż inne występowały pałeczki Gram-ujemne z grupy *Enterobacterales*. Gjødsebøl i wsp., analizująca rany przewlekłe na tle niewydolności żylnej w duńskiej populacji, otrzymała inny wynik analiz. *S. aureus* był znajdowany częściej w ranach małych (36). Niektórzy autorzy, jak na przykład Trengove i wsp. nie znajdują korelacji pomiędzy rodzajem drobnoustroju a rozmiarem rany (68).

W przypadku analizy wieku rany i występujących drobnoustrojów, wykazano statystycznie istotną różnicę w izolacji *S. aureus* – częściej znajdowano go w ranach o długim czasie trwania (powyżej 12 miesięcy). *S. epidermidis* występował statystycznie istotnie częściej w ranach o średnim czasie trwania. Halbert i wsp. zaobserwowała, że w ranach dłużej trwających występowały częściej bakterie beztlenowe, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* i *Streptococcus spp.* z β -hemolizą (174).

Po przeanalizowaniu drobnoustrojów w ranach gojących się i niegojących, okazało się, że nie występowały różnice w występowaniu gatunków i grup, co jest zgodnie z opublikowanymi obserwacjami przez innych badaczy. Wprawdzie Moffatt i wsp. zaobserwowali w owrzodzeniach gojących się częstsze niż innych występowanie *P. aeruginosa*, nie była to jednakże różnica statystycznie istotna. Również liczba współwystępujących gatunków nie była prognostykiem gojenia (151).

Aby opisać wpływ antybiotykoterapii na mikrobiotę rany przewlekłej, w pracy porównano częstość występowania drobnoustrojów w grupie pacjentów przyjmujących antybiotyki i nie otrzymujących leczenia ogólnego antybiotykiem. Nie zaobserwowano różnic w częstości występowania gatunków w obu tych grupach, z wyjątkiem częstszego występowania *P. mirabilis* w grupie pacjentów przyjmujących antybiotyki.

Analiza ilościowa drobnoustrojów przeprowadzona w niniejszej pracy miała na celu połączyć aspekt laboratoryjny i kliniczny. Kolonizacja krytyczna rany przewlekłej, gdzie liczebność drobnoustrojów wynosi według różnych autorów powyżej 10^5 CFU/g lub powyżej 10^6 CFU/g tkanki mogłaby stanowić podstawę do podejmowania decyzji leczenia przeciwbakteryjnego (91,207). Oceny liczebności drobnoustrojów w ranie dokonano na dwa sposoby: przy wykorzystaniu metody mikroskopii bezpośredniej materiału pobranego z rany (ocena półilościowa) oraz posiewu (ocena ilościowa). Metoda mikroskopii w ocenie infekcji ran była opisywana w literaturze ze względu na możliwość laboratoryjnej oceny kolonizacji krytycznej, ponieważ dla dodatnich wyników mikroskopii liczebność drobnoustrojów zawiera się w przedziale pomiędzy 10^5 a 10^6 komórek bakteryjnych w 1 ml treści z rany. Liczebność tą przyjęto również jako wskaźnik przemawiający za infekcją w ranie (34,61,176,208). Przeprowadzona w pracy analiza wykazała, że obecność bakterii w mikroskopii występowała przy średniej liczebności drobnoustrojów $5,4 \cdot 10^5$ CFU/ml, co może wskazywać na przydatność kliniczną tej metody. Metoda posiewu wykazała średnią globalną liczebność bakterii w ranie $6,5 \cdot 10^6$ CFU/ml, zaś większość ran spełniała laboratoryjne kryteria kolonizacji krytycznej (69,7%). Tak wysoki odsetek ran z dużą liczebnością drobnoustrojów może tłumaczyć niski odsetek ran wykazujących

tendencję do całkowitego wygojenia (ponad 90% pola powierzchni) – w badanej grupie takie rany stanowiły 10% ran kończących badanie w szóstym tygodniu. Zasadniczo nie zaobserwowano zależności pomiędzy globalną liczebnością drobnoustrojów w ranie, a różnymi typami owrzodzenia, czasem trwania rany i jej wielkością. Odnotowano jednakże w szóstym tygodniu obserwacji, że rany małe miały globalną liczebność statystycznie istotnie niższą niż średnie, zaś w tej grupie większość stanowiły rany gojące się. Podobne zależności przedstawiła Halbert i wsp., która opisała obserwację, że małe rany nie były skolonizowane przez drobnoustroje (174).

Obecnie badanie płynu tkankowego rany przewlekłej metodą mikroskopii bezpośredniej nie jest powszechnie stosowane, metoda ta znajduje uznanie jedynie w ocenie ran oparzeniowych oraz ranach przygotowywanych do przeszczepu, gdzie dodatni wynik mikroskopii może przesądzić o wdrożeniu odpowiedniego leczenia (41,209,210). Zaletą tej metody jest niski koszt badania. Zdaniem autora, przypomnienie użyteczności metody mikroskopii, może skłonić do wdrożenia jej w laboratoriach, które do tej pory nie wykorzystywały jej w praktyce. Wadą oraz zaletą jednocześnie oceny mikroskopowej jest fakt, że nie różnicuje ona żywych i martwych komórek bakteryjnych. Wadą, gdyż tylko żywe komórki bakteryjne mogą stanowić zagrożenie infekcją rany, zaletą, gdyż wykazuje obecność drobnoustrojów przyhamowanych czasowo przez stosowanie antybiotyków, antyseptyków i innych preparatów przeciwbakteryjnych. W metodzie posiewu występuje z kolei ograniczenie do odzysku drobnoustrojów zdolnych do życia w warunkach, które jesteśmy w stanie im zapewnić. Nie jest więc możliwe wyhodowanie pełnego profilu gatunkowego mikrobioty rany przewlekłej – ang. *viable*

but nonculturable (46,170,176,184,211–213). Warunki, które proponujemy drobnoustrojom, mogą nie być dla nich wystarczające. Skład podłoża, skład atmosfery i czas inkubacji ma wpływ na wynik badania. Komórki drobnoustrojów, które są uszkodzone przez antybiotyki, antyseptyki, promieniowanie UV, jak również drobnoustroje o zmienionym metabolizmie komórkowym (w biofilmie) mogą być niezdolne do wzrostu w sztucznych warunkach (89,142). W prowadzonym badaniu starano się uwzględnić potrzeby wzrostowe szerokiego spektrum gatunkowego drobnoustrojów, a wyhodowanie drobnoustrojów, takich jak: *Arthrobacter*, *Actinomyces* (nie-*israeli*), *Arthrocooccus*, *Actinobaculum*, *Aerococcus*, *Helcococcus*, *Mycobacterium*, *Vagococcus*, stanowiących co prawda marginalną część spośród całej puli wyhodowanych gatunków, ich obecność odzwierciedla złożoność mikrobioty badanych ran przewlekłych.

Obecnie przyjmuje się, że znaczna liczebność bakterii w ranie spowodowana jest występowaniem biofilmu na jej powierzchni i należy przede wszystkim podjąć działania zmierzające do jego eliminacji, zaś najlepszą metodą jest usuwanie mechaniczne (89,101). Uważa się, że jedynie rany, w których obserwuje się kliniczne objawy infekcji miejscowej (co odpowiada kolonizacji krytycznej) lub objawy infekcji inwazyjnej, powinny być leczone antybiotykiem lub innym preparatem przeciwbakteryjnym, z tym zastrzeżeniem, że infekcję miejscową zaleca się leczyć preparatami miejscowymi. W roku 2006 Sibbald i wsp. wprowadzili pojęcia NERDS© i STONEES© umożliwiające osobom prowadzącymi nadzór nad ranami przewlekłymi właściwy dobór terapii. NERDS© (ang. *Nonhealing wound*, *Exudative wound*, *Red and bleeding wound*, *Debris on the wound*, *Smell or unpleasant odor*) odpowiada infekcji

powierzchnowej (kolonizacji krytycznej) i jest wskazaniem do leczenia miejscowego, natomiast STONEES© (ang. *Size increasing, Temperature, Os exposed, New breakdown, Edema/erythema, Exudate, Smell*) odpowiada infekcji głębokiej i jest wskazaniem do leczenia antybiotykiem ogólnie (164,167,214,215). Miejscowo należy zastosować preparaty przeciwbakteryjne, których nie wykorzystuje się w leczeniu ogólnym, nie działające toksycznie na tkanki, nie indukujące alergii, nie indukujące oporności bakteryjnej. Miejscowe stosowanie antybiotyków nie jest zalecane, gdyż może sprzyjać nadkażeniu innymi gatunkami bakterii, selekcji szczepów opornych i następnie do kolonizacji przez wielooporne szczepy (27,167). Do wdrożenia leczenia ogólnego powinno się wykorzystać wynik badania mikrobiologicznego (164,216,217). Leczenie powinno być możliwie krótkie, zaś dawki odpowiednio wysokie, sprzyjające eradykacji drobnoustrojów. Wyjątkiem jest zapalenie kości towarzyszące owrzodzeniom, szczególnie w zespole stopy cukrzycowej. Szczegółowe w tym zakresie są rekomendacje IDSA (ang. *The Infectious Diseases Society of America*), EWMA (ang. *European Wound Management Association*) oraz innych towarzystw naukowych (33,216,218,219). Uçkay i wsp. oraz inni badacze udowodniają, że antybiotykoterapia stosowana ogólnie nie ma wpływu na gojenie. Korzystne działanie opisuje jedynie przy terapii miejscowej (216,220–222).

Wygojenie owrzodzenia jest najbardziej pożądanym klinicznym efektem leczenia ran przewlekłych. Proces gojenia jest powiązany z występowaniem wielu czynników, na niektóre tylko mamy wpływ podejmując terapię. Nie mamy wpływu na typ owrzodzenia oraz wielkość i czas trwania rany. Natomiast możemy wpłynąć na obecność drobnoustrojów. Nie ulega wątpliwości, że występowanie niektórych grup

bakteryjnych wpływa negatywnie na proces gojenia, dlatego istotne jest zapoznanie się ze składem flory rany przewlekłej przed podjęciem leczenia. Pomimo, że w trakcie niniejszego badania nie wykazano zależności pomiędzy mniejszą liczebnością drobnoustrojów w ranie a gojeniem, na parametr liczebności drobnoustrojów również należy zwrócić uwagę. Większość badanych ran w posiewie ilościowym spełniała kryteria rozpoznania kolonizacji krytycznej, która, według opinii towarzystw naukowych, jest odpowiednikiem klinicznym infekcji miejscowej. Prawidłowo pobrany wymaz treści z rany może być użyteczny zarówno w diagnostyce jakościowej, jak i ilościowej drobnoustrojów obecnych w ranach przewlekłych. Leczenie tlenem hiperbarycznym jest korzystnym działaniem wspomagającym terapię owrzodzeń, szczególnie u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej.

7. Wnioski

Analiza charakterystyki i dynamiki zmian flory bakteryjnej ran przewlekłych w badanej grupie pacjentów leczonych tlenem hiperbarycznym doprowadziła do następujących wniosków:

1. Częstość występowania gatunków lub grup drobnoustrojów nie zmieniała się istotnie w czasie 6 tygodni obserwacji.
2. Nie istniał związek pomiędzy gatunkami lub grupami drobnoustrojów a stosowaną antybiotykoterapią, z wyjątkiem rodzaju *Proteus*, który występował częściej u pacjentów leczonych antybiotykiem.
3. W badaniach mikroskopii bezpośredniej oraz posiewu ilościowego wykazano spójność diagnostyczną, dodatni wynik mikroskopii był w statystycznie istotnej zależności z dodatnim wynikiem posiewu, a wyższy poziom oceny w mikroskopii korelował z wartością logarytmu liczebności drobnoustrojów w posiewie.
4. Liczebność drobnoustrojów w ranach była wysoka, co przemawiało za laboratoryjnym rozpoznaniem kolonizacji krytycznej dla tych ran, a gatunek *A. baumannii* występował tylko w ranach, w których rozpoznawano laboratoryjnie kolonizację krytyczną.
5. Globalna liczebność drobnoustrojów nie różniła się zasadniczo w różnych typach owrzodzenia, w ranach o różnym czasie trwania i różnym polu powierzchni, jednakże rany małe, z których większość stanowiły gojące się, w szóstym tygodniu obserwacji miały globalną liczebność statystycznie istotnie niższą niż średnie .

Najważniejszym klinicznym aspektem prowadzonych obserwacji było ustalenie, jakie czynniki mają istotny związek z gojeniem się rany oraz określenie tzw. profilu gojenia się rany. Przeprowadzone analizy wykazały, że:

- Gojenie występowało częściej, gdy leczony był pacjent z rozpoznanym zespołem stopy cukrzycowej oraz nie występowało owrzodzenie typu tętniczego.
- Rany o większym polu powierzchni oraz o dłuższym czasie trwania (z kategorii „duże” i „stare”) goiły się trudniej, niż pozostałe.
- Gojenie występowało częściej przy nieobecności drobnoustrojów z grupy *Streptococcus anginosus*.
- Liczebność drobnoustrojów (globalna) nie miała wpływu na gojenie, ten nietypowy wynik wymagałby potwierdzenia większą liczbą badań.

Podsumowując, w badanej grupie tendencję gojenia miały rany u pacjentów z zespołem stopy cukrzycowej, o mniejszym polu powierzchni, o krótszym czasie trwania, pozbawione drobnoustrojów z grupy *Streptococcus anginosus*.

8. Streszczenie

Analiza zmienności ilościowej i jakościowej tlenowej flory bakteryjnej izolowanej z ran przewlekłych kończyn dolnych w trakcie leczenia tlenem hiperbarycznym i jej znaczenie w klinicznej ocenie infekcji

Celem pracy było zbadanie częstości występowania gatunków i grup drobnoustrojów oraz ich liczebności w kontekście głównych parametrów ran przewlekłych u pacjentów poddawanych terapii tlenem hiperbarycznym (HBOT). Badanie obejmowało chorych leczonych HBOT z powodu trudno gojącej się rany w trybie ambulatoryjnym w Klinice Medycyny Hiperbarycznej i Ratownictwa Morskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. W trakcie 6-tygodniowej terapii (T1-T6) raz w tygodniu dokonywano oceny stanu rany, przeprowadzano pomiar rany oraz pobierano wymaz z rany na badanie mikrobiologiczne ilościowe i jakościowe.

Badanie wykonano u 43 pacjentów w wieku 34 – 89 lat, u których stwierdzono obecność 46 ran. W grupie badanej przeważali mężczyźni (67,4%), zaś kobiety były statystycznie istotnie starsze (mediana wieku kobiet i mężczyzn: 75 vs. 66 lat, Test Wilcoxona, $p < 0,010$). Obserwację ukończyło 37 pacjentów (40 ran).

Wymaz z rany pobierano na podłoże transportowe Amies (Sigma Transwab®, MWE), który posiewano ilościowo na podłoża stałe. Dodatkowo wykonywano preparat mikroskopowy w celu przeprowadzenia oceny półilościowej drobnoustrojów. Wyhodowane mikroorganizmy identyfikowano za pomocą aparatu Microflex LT (Bruker Daltonik),

co pozwoliło uzyskać szerokie spektrum zidentyfikowanych drobnoustrojów (59 różnych gatunków bakterii tlenowych). Wyhodowane mikroorganizmy podzielono na grupy, uwzględniając budowę komórki bakteryjnej oraz ich potrzeby wzrostowe na podłożach sztucznych, a także niektóre cechy biochemiczne i serologiczne. Uwzględniano także potencjalną patogenność lub brak patogenności w ranie oraz częstość występowania w wymazach z ran.

Głównymi parametrami oceny rany w badaniu były: typ owrzodzenia (tętnicze, żyłne, inne oraz zespół stopy cukrzycowej obecny i nieobecny), czas trwania rany i pole powierzchni rany.

Czas trwania rany odnotowany w dniu przyjęcia na HBOT wynosił od 1 miesiąca do 42 lat. Pole powierzchni rany w pierwszym tygodniu obserwacji wynosiło od 1 cm² do 600 cm², w szóstym tygodniu od 0,2 cm² do 600 cm². Aby wykonać porównania i analizy, podzielono rany na trzy grupy ze względu na czas ich trwania według ustalonych kryteriów.

W 238 spośród pobranych 251 próbek (94,8%) wykonano ocenę mikroskopową treści z rany na obecność leukocytów oraz drobnoustrojów.

Do analizy statystycznej wykorzystano metody analizy opisowej i porównawczej. W ramach analizy opisowej użyto następujących parametrów: SD, min., Q 25, Q50, Q75 i maks. Wyniki analiz zmiennych jakościowych przedstawiono przy pomocy tablic kontyngencji z zaznaczeniem odpowiedniego udziału procentowego i ilościowego. Do analizy porównawczej wykorzystano testy statystyczne: do porównań zmiennych ilościowych - testy nieparametryczne (testy Wilcoxona), do porównań badanej wielkości w kilku grupach - testy Wilcoxona jako testy post-hoc, dla porównania rozkładów w podgrupach - test Kruskala-Wallisa. Zmienne jakościowe porównywane były na bazie dokładnego

testu Fishera. W przypadku większej liczby kategorii wykorzystywano również test Chi-kwadrat Pearsona. Hipotezy weryfikowano na poziomie istotności $p = 0,05$. Jeśli poziom istotności był poniżej 0,05, podejmowano decyzję o istotności różnicy lub częstości.

Analizowano podstawowe parametry rany oraz gatunki lub grupy drobnoustrojów, a także liczebność drobnoustrojów w badaniu mikroskopowym oraz posiewach ilościowych z rany.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że rany w niewydolności żyłnej były w pierwszym tygodniu obserwacji statystycznie istotnie większe niż pozostałe (Test Chi-kwadrat, $p < 0,035$), a w zespole stopy cukrzycowej (ZSC) statystycznie istotnie mniejsze niż pozostałe (Test Chi-kwadrat, $p < 0,006$). U pacjentów z ZSC zgłaszających się na leczenie HBOT rana trwała statystycznie istotnie krócej niż u pozostałych.

Wykazano także, że w analizowanych ranach pole powierzchni uległo zmniejszeniu po 6 tygodniach obserwacji o średnio 6 cm^2 (min. spadek o 56 cm^2 , maks. wzrost o $16,5 \text{ cm}^2$), a różnica wielkości ran pomiędzy T6 i T1 była statystycznie istotna (Test Chi-kwadrat, $p < 0,001$).

W badaniu mikroskopowym dodatni wynik był w statystycznie istotnej zależności z dodatnim wynikiem posiewu (dokładny test Fishera, $p < 0,023$), zaś dla wyższego poziomu oceny liczebności drobnoustrojów w mikroskopii, wartość logarytmu liczebności była statystycznie istotnie wyższa (Test Wilcoxon; $p < 0,05$).

Najczęściej hodowanymi drobnoustrojami były: *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *S. epidermidis*, przy czym wykazano, że występują one statystycznie istotnie częściej niż inne gatunki bakteryjne (dokładny test Fishera; $p < 0,05$). Występowanie gatunków i grup drobnoustrojów badano także

w okresach tygodniowych. Wprawdzie zaobserwowano znaczący spadek częstości występowania *S. epidermidis* i *E. faecalis*, jednakże nie były to statystycznie istotne zmiany. Analizowano również zależności pomiędzy występowaniem gatunków a czasem trwania rany i jej polem powierzchni oraz typem owrzodzenia. Stwierdzono jedynie statystycznie istotnie częstsze występowanie gatunku *A. baumannii* w ZSC (test Chi-kwadrat, $p < 0,001$). Zależność ta nie występowała, jeśli analizę przeprowadzano dla grup bakterii.

Przeprowadzano także analizę częstości występowania gatunków lub grup bakterii u pacjentów z antybiotykoterapią. Zaobserwowano statystycznie istotnie częstsze występowanie *Proteus spp.* w ranach leczonych antybiotykiem. Zależność ta nie występowała, jeśli analizę przeprowadzano dla grup bakterii. Analiza porównawcza częstości występowania szczepów wieloopornych wykazała, że występowały one statystycznie istotnie częściej w ranach starszych (Test Wilcoxon, $p \leq 0,048$).

W badanych ranach po określeniu liczebności drobnoustrojów wyniki poddano ocenie dla podstawowych parametrów ran i dominujących gatunków drobnoustrojów. Określono, że w 69,7% posiewów występowała duża liczebność bakterii (powyżej 10^6 CFU/ml). W tygodniowych rozkładach liczebności nie stwierdzono istotnych różnic. Wprowadzono też pojęcie liczebności globalnej, która została obliczona jako mediana liczebności tygodniowych dla każdej z ran. Nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie globalnej liczebności w różnych typach owrzodzeń. Analizę przeprowadzono również dla czasu trwania ran (nie stwierdzono istotnych różnic) oraz dla różnych wielkości ran. Zaobserwowano zależność pomiędzy liczebnością bakterii w ranie a wielkością ran w T6. Małe rany

miały globalną liczebność statystycznie istotnie niższą niż średnie (Test Wilcoxon, $p < 0.039$).

Kolejna analiza została wykonana według dwóch wariantów liczebności drobnoustrojów w ranie. Wariant I obejmował rany z liczebnością poniżej 10^5 CFU/ml, wariant II poniżej 10^6 CFU/ml. Wariant I przez 6 tygodni obserwowano tylko w 2 ranach (4,3%), a wariant II w 5 ranach (10,9%). Zwraca uwagę fakt, że u prawie połowy ran obserwowano dużą liczebność drobnoustrojów - co najmniej 10^6 CFU/ml (47,8%).

Badanie zależności pomiędzy liczebnością drobnoustrojów a występowaniem dominujących gatunków drobnoustrojów wykazało, że gatunek *A. baumannii* stwierdzano jedynie w ranach o wysokiej liczebności drobnoustrojów. Najdłużej w obu wariantach liczebności utrzymywał się *S. epidermidis* (średnio 1,42 tygodnia).

W celu ustalenia tendencji gojenia się rany, przebadano częstość występowania gatunków i grup drobnoustrojów w ranach gojących się i niegojących. Zaobserwowano jedynie zależność dla grupy *Streptococcus anginosus*, której występowanie można powiązać z ranami niegojącymi się (dokładny test Fishera, $p < 0,03$). Analiza globalnej liczebności drobnoustrojów dla ran gojących się i niegojących wykazała niższe wartości globalnej liczebności dla ran gojących się (mediana 6,54 vs. 7,0). Nie była to jednak różnica statystycznie istotna.

Oceniano również zależność pomiędzy gojeniem a podstawowymi parametrami ran. Gojenie najczęściej występowało u pacjentów z ZSC (62,5%), natomiast rzadko miało miejsce w owrzodzeniach typu tętniczego (26,7%). Nie były to jednak statystycznie istotne różnice. Taki wynik uzyskano w przypadku braku gojenia i ran „dużych” (Test Chi-kwadrat, $p < 0,019$) oraz „starszych” (Test Chi-kwadrat, $p < 0,015$). Nie stwierdzono

natomiast różnicy w częstościach kategorii pola powierzchni rany oraz czasu trwania rany w grupach gojenia.

Całkowite wygojenie owrzodzenia jest najkorzystniejszym klinicznym aspektem w czasie leczenia. Przeprowadzone analizy wykazały, że występowanie niektórych grup drobnoustrojów wpływa niekorzystnie na proces gojenia. Nieoczekiwany wynik negatywnego wpływu *Streptococcus anginosus* group na gojenie należałoby potwierdzić badaniami przeprowadzonymi na większą skalę. Pomimo, że nie wykazano zależności pomiędzy liczebnością drobnoustrojów a gojeniem, na parametr liczebności drobnoustrojów w ranie również należy zwrócić uwagę, gdyż wysoka liczebność może świadczyć o miejscowej infekcji rany. Prawidłowo pobrany wymaz treści z rany może być użyteczny zarówno w diagnostyce jakościowej, jak i ilościowej drobnoustrojów obecnych w ranach przewlekłych.

Słowa kluczowe: rana przewlekła, posiewy ilościowe, HBOT, stopa cukrzycowa

9. Summary

Analysis of differences in quality and quantity of aerobic microflora isolated from chronic leg wounds during a hyperbaric oxygen therapy and its clinical significance

The aim of the study was to investigate the frequency of bacterial species and bacterial groups and their quantity in chronic wounds in patients treated with Hiperbaric Oxygen Therapy (HBOT) for 6 weeks. Patients were recruited from outpatient setting of the Institute of Maritime and Tropical Medicine of the Medical University of Gdansk.

The status of wound was estimated every week, measurement of the wound area was recorded and the swab was collected for qualitative and quantitative culture. During the therapy special silver dressings or Manuka honey were applied after disinfection with octenidine/ fenoxyethanol (octenisept). Antibiotic therapy was started for 25 patients and lasted for at least one week.

The study included 43 patients (mostly men, 67.4%) aged 34-89 and their 46 chronic wounds. In women we saw significant differences in age (the mediana of the age in women and men was 75 vs. 66 years, Wilcoxon Test, $p < 0.010$). The study was completed by 37 patients (40 wounds). We examined shank- (47.8%) and foot-located (52.2%) non-healing ulcers.

During 6 weeks of therapy bacteriological swab was taken once a week from each wound using Sigma Transwab kit (MWE) with Amies medium. Next, during 1 hour, the quantitative culture was performed. Additionally,

in order to perform semi-quantitative examination of microorganisms the smear on microscopy slide for Gram-staining was carried out.

Cultured microorganisms were identified using mass spectrometry technology (Microflex LT, Bruker Daltonik). The identification gave us a broad spectrum of aerobic bacteria (59 of various species of aerobic microorganisms).

Main parameters in wounds estimation were: ulcer type (venous, arterial or others and diabetic foot ulcer (DFU) presence), wound duration and wound area.

The wounds duration on the first day of HBOT was 1 month to 42 years and wound area was 1 cm² to 600 cm². We grouped the wounds by duration (“short”, “medium” and “long”) and by area (“small”, “medium” and “large”) according to determined criteria.

238 samples (94,5%) were examined by light microscopy and the presence of microorganisms and leucocytes was estimated.

In order to perform comparative analysis of bacteria isolated from examined wounds 59 aerobic species were divided into 10 groups based on established criteria. The main was based on bacterial cell structure, others were defined as dependence of nutrients on agar plates or some biochemical and serological properties used in basal tests performed in every microbiological laboratory. In some cases the pathogenicity or lack of it in wounds as well as its frequency in wound cultures was taken into consideration.

The methods of descriptive and comparative statistical analysis were used. Qualitative and quantitative data were grouped into classes and were compared employing Chi-square test and its modification (*Fisher Exact Test* and the *Chi-square Pearson Test*). The non-parametric statistical

analysis was performed to verify the inter-group differences - *Wilcoxon Test* (also post-hoc test) and dispersion – *Kruskal-Wallis Test*. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

The statistical analysis was performed for main parameters of wounds (type of ulcer, ulcer duration and ulcer area), species or groups of microorganisms and quantity of microorganisms in light microscopy and quantitative cultures.

It was demonstrated that the wound area was significantly greater in the 1st week than in the others (*Chi-square Test*, $p < 0.035$) and in DFU significantly smaller than the others (*Chi-square Test*, $p < 0.006$). The wound duration in DFU patients treated with HBO was significantly shorter than the others.

The wound area in the observed wounds was smaller in the 6th week of HBOT on average of 6 cm² (minimum decline 56 cm², maximum increase 16,5 cm²) and the difference of wound area between 6th and 1st week was significant (*Chi-square Test*, $p < 0.001$).

In the light microscopy the positive result of Gram stain examination was correlated with positive result of the culture (*Fisher Exact Test*, $p < 0.023$) and for the higher level of bacteria in microscopy the quantity in culture was significantly higher (*Wilcoxon Test*, $p < 0.05$).

The most often cultured microorganisms were: *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. It was demonstrated that they are significantly more often than the others (*Fisher Exact Test*, $p < 0.05$). The occurrence of species and groups was examined every week. The considerable decrease of frequency of *S. epidermidis* and *E. faecalis* was observed but it was not significant. The dependence between frequency of the species or groups of microorganisms and wound duration or wound area or ulcer type was

examined. The only positive result we noted between *A. baumannii* and DFU (*Chi-square Test*, $p < 0.001$). The correlation between other parameters and species or groups was not significant.

The frequency of species or groups and antibiotic therapy was analyzed. The significantly higher incidence of *P. mirabilis* was observed in patients treated with antibiotics.

The comparative analysis of the frequency of a multidrug resistant (MDR) strains showed significantly greater occurrence of MDR in “long” duration wounds (*Wilcoxon Test*, $p \leq 0.048$).

The quantity of bacteria in wounds was estimated and all quantitative results were statistically analyzed in main parameters of wounds (ulcer type, ulcer area and ulcer duration) and also with regard to predominant species. A large quantity of bacteria was found in 69,7% cultures (more than 10^6 CFU/ml). The weekly quantity was recorded and no statistically significant differences has been found. The conception of global quantity was implemented to perform statistical analyses. The global quantity was calculated as a mediana of weekly measured quantity of each wound. Then, the ulcer type analysis was performed and no significant association was confirmed. However with regard to wound duration and wound area the association was significant. For this parameter, we observed the greatest mediana and global quantity at the 1st week in “large” wounds but not statistically significant. At the 6th week the statistically significant correlation between bacterial quantity and wound area was observed. “Small” wounds had the global quantity statistically significant lower than “medium” wounds (*Wilcoxon Test*, $p < 0.039$).

The analysis was performed in two variants of quantity. The 1st variant covered wounds with the quantity below 10^5 CFU/ml, the 2nd below 10^6

CFU/ml. The 1st variant was observed for 6 weeks in only 2 ulcers (4,3%), the 2nd in 5 ulcers (10,9%). It is interesting that in half of wounds the number of bacteria was at least 10⁶ CFU/ml (47,8%).

The coincidence between quantity of bacteria and species or groups was examined and gave a positive result only for *A. baumannii*. The species was not present in wounds with the 1st variant quantity and only in one week with the 2nd variant. The longest time of presence was noted in *S. epidermidis* (1,42 week).

In order to estimate the healing tendency the frequency of species or groups was examined in both healing and non-healing wounds. It was observed that significant correlation exists between *Streptococcus anginosus* group and non-healing wounds (*Fisher Exact Test*, $p < 0,03$).

The analysis of a global quantity for healing and non-healing wounds gave lower values for healing wounds (the mediana 6.54 vs. 7.0) but no significance.

The statistical analysis was also performed between healing and main parameters of wound. Healing was observed mostly in patients with DFU (62,5%) and less often in arterial ulcers (26,7%) but it was not significant. The non-healing wounds were observed mostly in wounds with “larger” area (significant correlation, *Chi-square Test*, $p < 0,019$) and with “longer” wound duration (significant correlation, *Chi-square Test*, $p < 0,015$). There was no significant correlation between wound area or wound duration and healing.

Fully healing wound is a most beneficial aspect of wound treatment. The analyzes showed that the presence of some groups of bacteria has a negative impact on healing. Unexpected correlation between *Streptococcus anginosus* group and non-healing wounds should be

confirmed by large-scale studies. In spite of lack of the correlation between quantity of microorganisms and healing in our work, the parameter should be observed, because the high load of bacteria in the wound might be connected with a local infection. Properly taken wound fluid swab might be useful for both qualitative and quantitative diagnostics of microorganisms in chronic wounds.

Key words: chronic wounds, quantitative culture, HBOT, DFU

10. Piśmiennictwo

1. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. A brief history of wound care. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 SUPPL.):S6-11.
2. Forrest RD. Early history of wound treatment. *J R Soc Med.* 1982;75(3):198–205.
3. Best M, Neuhauser D. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Heal Care.* 2004;13(3):233–4.
4. Fu Kuo-Tai L. Great names in the history of Orthopaedics XIV: Joseph Lister (1827-1912) Part 1. *J Orthop Trauma Rehabil.* 2010;14(2):30–8.
5. Kaufmann SHE. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of Tuberculosis. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society; 2005 Dec 8;353(23):2423–6.
6. Spichler A, Hurwitz BL, Armstrong DG, Lipsky BA. Microbiology of diabetic foot infections: from Louis Pasteur to 'crime scene investigation'. *BMC Med.* 2015;13(1):1–13.
7. Geison GR. The private science of Louis Pasteur. Geison GT, editor. Princeton: Princeton University Press; 1995.
8. Fleming A. Penicillin: The Robert Campbell oration. *Ulster Med J.* 1944;13(2):95–122.
9. Alharbi SA, Wainwright M, Alahmadi TA, Salleeh H Bin, Faden AA, Chinnathambi A. What if Fleming had not discovered penicillin? *Saudi J Biol Sci.* King Saud University; 2014;21(4):289–93.
10. Khanna AK, Tiwary SK. *Ulcers of the lower extremity.* Springer. 2016. 1-479 p.
11. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2010;163(2):257–68.
12. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016. p. 1–14.
13. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care.* 2015;4(9):560–82.
14. Krasowski G, Kruk M. *Leczenie odleżyn i ran przewlekłych.* 1st ed. Krasowski G, Kruk M, editors. Warszawa: PZWL; 2008. 7-96 p.
15. Mrozkiewicz-Rakowska B, Jawień A, Sopata M, Arkadiusz K. Organizacja opieki nad chorymi z zespołem stopy cukrzycowej. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Leczenia Ran. *Leczenie Ran.* 2015;12(3):83–112.
16. Piskorz A. Gojenie się ran. In: Śliwiński M, Rudowski W, editors. *Chirurgia kliniczna i operacyjna.* Warszawa: PZWL; 1981. p. 373–86.
17. Harries RL, Bosanquet DC, Harding KG. Wound bed preparation: TIME for an

- update. *Int Wound J.* 2016;13:S:8-14.
18. Mekkes JR, Loots MAM, Van Der Wal AC, Bos JD. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. *Br J Dermatol.* 2003;148(3):388–401.
 19. Krasowski G. Leczenie ran przewlekłych – cz. I: Definicja, etiologia, epidemiologia, fizjologia i patofizjologia gojenia się ran. *Med Prakt.* 2013;1–15.
 20. Agale SV. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis, and management. *Ulcers.* 2013;2013:1–9.
 21. Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol Ther.* 2013;25(1):1–13.
 22. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clin Dermatol.* Elsevier B.V.; 2010;28(5):519–26.
 23. Kirketerp-Møller K, Zulkowski K, James G. Chronic wound colonization, infection, and biofilm. *Biofilm Infection.* 2011. p. 10–24.
 24. WHO. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en>.
 25. Caggiati A, Rosi C, Franceschini M, Innocenzi D. The nature of skin pigmentations in chronic venous insufficiency: a preliminary report. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;35(1):111–8.
 26. Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res.* Elsevier Ltd; 2009;123(SUPPL. 4):S66–71.
 27. Szewczyk MT, Jawień A. Leczenie ran przewlekłych. 1st ed. Szewczyk MT, Jawień A, editors. Warszawa: PZWL; 2012. 1-178 p.
 28. Skórkowska-Telichowska K, Bugajska-Prusak A, Pluciński P, Rybak Z, Szopa J. Fizjologia i patologia przewlekle niegojących się owrzodzeń oraz sposoby ich miejscowego leczenia w świetle współczesnej wiedzy medycznej. 2009;5:15–29.
 29. Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: What is new and what works. *Clin Diabetes.* 2003;21(4):186–7.
 30. Jawień A, Szewczyk MT, Ciecierski M, Grzela T, Szotkiewicz A, Migdalski A, et al. Owrzodzenia żyłne goleni. 1st ed. Jawień A, Szewczyk MT, editors. Warszawa: Twoje zdrowie; 2005. 9-200 p.
 31. Richard J-L, Sotto A, Lavigne J-P. New insights in diabetic foot infection. *World J Diabetes.* 2011;2(2):24–32.
 32. Kallstrom G. Are quantitative bacterial wound cultures useful? *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2753–6.
 33. Gottrup F, Apelqvist J, Bjansholt T, Cooper R, Moore Z, Peters E, et al. EWMA Document : Evidence , controversies and suggestions. *J Wound Care.* 2013;22(5):S1-89.
 34. Robson MC. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance

- of bacteria. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):637–50.
35. Lindsay S, Oates A, Bourdillon K. The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing. *Int Wound J.* 2017;14(6):1237–47.
 36. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: A longitudinal study. *Int Wound J.* 2006;3(3):225–31.
 37. Polk HC, Altemeier WA, Brown GL, Busuttill RW, Cerra FB. *Zakażenia w chirurgii.* 1st ed. Polk Hiram C., Jr. M (ed), editor. Warszawa: PZWL; 1987. 11-229 p.
 38. Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surg.* 2003;29(6):631–5.
 39. Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J.* 2012;9(1):14–32.
 40. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns.* 2004;30(4):357–61.
 41. Pruitt B a, McManus a T, Kim SH, Goodwin CW. Burn wound infections: current status. *World J Surg.* 1998;22(2):135–45.
 42. Naqvi SZ, Naqvi SMA, Usman M, Naqvi SBS. Burn wound infection; significance of rule of nine in microbial surveillance. *Prof Med J. Professional Medical Journal;* 2014 Dec;21(5):869–73.
 43. Pruitt BA, McManus AT. The changing epidemiology of infection in burn patients. *World J Surg.* 1992;16(1):57–67.
 44. Drzewiecki A, Heczko PB, Jagusztyn-Krynicka E, Łaniewski P, Rożalska B, Sadowska B. Bakteriologia ogólna z patogenezą zakażeń bakteryjnych. In: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A, editors. *Mikrobiologia lekarska.* 1st ed. Warszawa: PZWL; 2015. p. 62–99.
 45. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suarez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol.* 2013;65(3):763–72.
 46. 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.
 47. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(4):244–53.
 48. Tay WH, Chong KKL, Kline KA. Polymicrobial–host interactions during infection. *J Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2016;428(17):3355–71.
 49. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1150–8.
 50. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across

- multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(26):11971–5.
51. Regev-Yochay G, Rubinstein E, Barzilai A, Carmeli Y, Kuint J, Etienne J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(3):453–6.
 52. Andersen BM, Lindemann R, Bergh K, Nesheim B-I, Syversen G, Solheim N, et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive unit associated with understaffing, overcrowding and mixing of patients. *J Hosp Infect. Elsevier;* 2018 Mar 31;50(1):18–24.
 53. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med. Elsevier Ltd;* 2015;21(2):109–17.
 54. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 2009;324(5931):1190–2.
 55. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Mikrobiologia.* 1st ed. Wyd.pol., Przondo-Mordarska A, Martirisian G, Szkaradkiewicz A, editors. Wrocław: Urban&Partner; 2011.
 56. Miller CN, Carville K, Newall N, Kapp S, Karimi L, Santamaria N. Assessing bacterial burden in wounds : comparing clinical observation and wound swabs. *International Wound J.* 2011;8(1):45–55.
 57. Bill TJ, Ratliff CR, Donovan AM, Knox LK, Morgan RF, Rodeheaver GT. Quantitative swab culture versus tissue biopsy: a comparison in chronic wounds. *Ostomy Wound Manage.* 2001;47(1):34–37.
 58. Basak S, Dutta SK, Gupta S, Ganguly AC, De R. Bacteriology of wound infection: evaluation by surface swab and quantitative full thickness wound biopsy culture. *J Indian Med Assoc.* 1992;90(2):33–34.
 59. Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Hillis SL, Park H, Scherubel M. Diagnostic validity of three swab techniques for identifying chronic wound infection. *Wound Repair Regen.* 2006;14(5):548–57.
 60. Gardner SE, Frantz R, Hillis SL, Park H, Scherubel M. Diagnostic validity of semiquantitative swab cultures. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2007;19(2):31–38.
 61. Levine NS, Lindberg RB, Mason AD, Pruitt BA. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *Professional nurse.* 1976;16(2):89–94.
 62. Pellizzer G, Strazzabosco M, Presi S, Furlan F, Lora L, Benedetti P, et al. Deep tissue biopsy vs. superficial swab culture monitoring in the microbiological assessment of limb-threatening diabetic foot infection. *Diabet Med.* 2001;18(10):822–7.
 63. Rondas AALM, Schols JMGA, Halfens RJG, Stobberingh EE. Swab versus biopsy for

- the diagnosis of chronic infected wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2013;26(5):211–9.
64. Leber AL. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th Edition. In: Leber AL, editor. 4th ed. Washington: ASM Press; 2016.
 65. Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, Stephens P, Wilson MJ, Harding KG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. *Wound Repair Regen*. 2007;15(1):17–22.
 66. Donovan S. Wound infection and wound swabbing. *Prof Nurse*. 1998;13(11):757–759.
 67. Danilla S, Andrades P, Gómez ME, Chamorro M, Leniz P, Piñeros JL, et al. Concordance between qualitative and quantitative cultures in burned patients: Analysis of 2886 cultures. *Burns*. 2005;31(8):967–71.
 68. Trengove NJ, Stacey MC, McGeachie DF, Mata S. Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *J Wound Care*. 1996;5(6):277–80.
 69. The Wound Healing Society. Chronic wound care guidelines: abridged version. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):645–711.
 70. Sue E. Gardner, Stephen L. Hillis RAF. Clinical signs of infection in diabetic foot ulcers with high microbial load. *Biol Res Nurs*. 2009;11(2):119–28.
 71. Hryniewicz W, Kulig J, Ozorowski T, Mól A. Stosowanie antybiotyków w wybranych zakażeniach skóry i tkanek miękkich. 2012.
 72. Catherine R. Ratliff GTR. Correlation of Semi-Quantitative Swab Cultures to Quantitative Swab Cultures from Chronic Wounds. *Wounds*. 2002;14(9):329–33.
 73. Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). *Angew Chemie Int Ed*. 2003;42(33):3860–70.
 74. Stoobant V, Charette J, Hoffmann E. Spektrometria mas. Wikipedia. 1998;
 75. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1169–75.
 76. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):900–7.
 77. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244–69.
 78. Gardner SE, Haleem A, Jao YL, Hillis SL, Femino JE, Phisitkul P, et al. Cultures of diabetic foot ulcers without clinical signs of infection do not predict outcomes. *Diabetes Care*. 2014;37(10):2693–701.
 79. Cooper R, Lawrence JC. Micro-organisms and wounds. *J Wound Care*. Mark Allen

- Group; 1996 May 2;5(5):233–6.
80. Cooper R, Lawrence JC. The prevalence of bacteria and implications for infection control. *J Wound Care*. Mark Allen Group; 1996 Jun 2;5(6):291–5.
 81. Jawień A, Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A, Szewczyk MT, Kaszuba A, Urbanek T, et al. Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji. *Leczenie Ran*. 2012;9(3):59–75.
 82. Huiming T, Guanggui D, Mingjing H, Fengguo T, Guanyi S, Yingiu L. Quantitative bacteriological study of the wound track. *J Trauma*. 1988;28(1):S215-216.
 83. Angel DE, Lloyd P, Carville K, Santamaria N, De A, Lloyd P, et al. The clinical efficacy of two wound-swabbing techniques in identifying the causative organism (s) in infected cutaneous wounds. *Int Wound J*. 2011;8(2):176–85.
 84. Meaume S, Vallet D, Nguyen Morere M, Téot L. Evaluation of a silver-releasing hydroalginate dressing in chronic wounds with signs of local infection. *J Wound Care*. 2005;14(9):411–9.
 85. White RJ, Cutting KF. Critical colonization--the concept under scrutiny. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52(11):50–6.
 86. Gardner SE, Frantz RA. Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. *Biol Res Nurs*. 2009;49(18):1841–50.
 87. Bonham PA. Swab cultures for diagnosing wound infections: A literature review and clinical guideline. *J Wound, Ostomy Cont Nurs*. 2009;36(4):389–95.
 88. Cornell RS, Meyr AJ, Steinberg JS, Attinger CE. Débridement of the noninfected wound. *J Vasc Surg*. Elsevier Inc.; 2010;52(3 SUPPL.):31S–36S.
 89. Phillips P, Sampson E, Yang Q, Antonelli P, Progulske-fox A, Schultz G. Chronic Wounds: bacterial biofilms in wounds effect of planktonic bacteria on wound healing. *Wound Heal South Africa*. 2008;1(2):10–2.
 90. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J*. 2013 Dec;10(s1):9–14.
 91. Szewczyk MT, Gospodarek E, Mościcka P, Jawień A. Zakażenia ran przewlekłych - poważny problem medyczny. *Pielęgniarstwo Chir i Angiol*. 2015;1:1–6.
 92. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*. Springer Berlin Heidelberg; 2016;198(1):1–15.
 93. Wolska KI, Grudniak AM, Markowska K. Związki interferujące z bakteryjnymi systemami i ich potencjalna funkcja terapeutyczna. *Postępy Mikrobiol*. 2016;55(3):300–8.
 94. Chabowski K, Junka AF, Szymczyk P, Piasecki T, Sierakowski A, Mączyńska B, et al. The application of impedance microsensors for real-time analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Polish J Microbiol*. 2015;64(2):115–20.
 95. Singh RP. Attenuation of quorum sensing-mediated virulence in Gram-negative

- pathogenic bacteria: implications for the post-antibiotic era. *Medchemcomm. The Royal Society of Chemistry*; 2015;6(2):259–72.
96. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):23–9.
 97. Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(3):163–9.
 98. Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, Watters C, Griswold JA, et al. An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One.* 2011;6(11).
 99. Panuncialman J, Falanga V. The science of wound bed preparation. *Clin Plast Surg.* Elsevier; 2007 Dec 29;34(4):621–32.
 100. Arkadiusz Jawień, Szewczyk MT, Kaszuba A, Gaciong Z, Krasiński Z. Wytyczne Grupy Ekspertów w sprawie gojenia owrzodzeń żylnych goleni. *Leczenie Ran.* 2011;8(3):59–80.
 101. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: A systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen.* 2003;11(SUPPL. 1):1–28.
 102. Dowsett C, Newton H. Wound bed preparation : TIME in practice. *Wounds UK.* 2005;1(3):58–70.
 103. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T, Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years? *Int Wound J.* 2014;9:S1-19.
 104. Cazander G, Pritchard DI, Nigam Y, Jung W, Nibbering PH. Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds: Larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. *BioEssays.* 2013;35(12):1083–92.
 105. Bertesteanu S, Triaridis S, Stankovic M, Lazar V, Chifiriuc MC, Vlad M, et al. Polymicrobial wound infections: Pathophysiology and current therapeutic approaches. *Int J Pharm.* Elsevier B.V.; 2014;463(2):119–26.
 106. Gebala-Prajsnar K, Stanek A, Pasek J, Prajsnar G, Berszakiewicz A, Sieron A, et al. Selected physical medicine interventions in the treatment of diabetic foot syndrome. *Acta Angiol.* 2015;21(4):140–5.
 107. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Miód manuka w leczeniu owrzodzeń żyłakowych podudzi. *Postępy Fitoter.* 2016;17(3):227–31.
 108. Dhivya S, Vijaya V, Santhini E. Wound dressings – a review. *BioMedicine.* 2015;5(4):24–8.
 109. Wolvos T, Livingston M. Wound Fluid Management in Wound Care: The Role of a

- Hydroconductive Dressing. *Wounds*. 2013;25(1):7–14.
110. Żmudzińska M, Czarnecka-Operacz M. Leczenie żylnych owrzodzeń podudzi – nowoczesne opatrunki. *Adv Dermatology Allergol*. 2006;23(3):143–8.
 111. Seth AK, Geringer MR, Nguyen KT, Agnew SP, Dumanian Z, Galiano RD, et al. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* biofilm-infected wounds: A new approach to chronic wound care. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(2):225–34.
 112. Bianchi T, Wolcott RD, Peghetti A, Leaper D, Cutting K, Polignano R, et al. Recommendations for the management of biofilm: a consensus document. *J Wound Care*. 2016;25(6):305–17.
 113. Flanagan M. Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care*. 2003;12(5):189–94.
 114. Sheehan P, Jones P, Caselli A, Giurini JM, Veves A. Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1879–82.
 115. Jain KK. *Textbook of Hyperbaric Medicine*. American College of Hyperbaric. 2017. 1-30 p.
 116. Kranke P, MH B, M M-SJ, Schnabel A, SE D. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(6):N.PAG-N.PAG.
 117. Thackham JA, McElwain DLS, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: a review. *Wound Repair Regen*. 2008;16(3):321–30.
 118. Brimson CH, Nigam Y. The role of oxygen-associated therapies for the healing of chronic wounds, particularly in patients with diabetes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2013. p. 411–8.
 119. Gottrup F, Dissemond J, Baines C, Frykberg R, Jensen PO, Kot J, et al. Use of oxygen therapies in wound healing. *J Wound Care*. 2017;26(5):1–42.
 120. Dissemond J, Kröger K, Storck M, Risse A, Engels P. Topical oxygen wound therapies for chronic wounds: A review. *J Wound Care*. 2015;24(2):53–63.
 121. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(2):185–206.
 122. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther. Springer Healthcare*; 2017;34(3):599–610.
 123. Pikuła M, Langa P, Kosikowska P, Trzonkowski P. Stem cells and growth factors in wound healing. *Postepy Hig i Med doświadczalnej*. 2015;69:874–85.
 124. Levi B, Rees R. Diagnosis and management of pressure ulcers. *Clin Plast Surg*. Elsevier; 2007 Dec 29;34(4):735–48.
 125. Mathieu D. Role of hyperbaric oxygen therapy in the management of lower extremity wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2006;5(4):233–5.
 126. Jain KK. Physical, physiological, and biochemical aspects of hyperbaric

- oxygenation. *Textbook of Hyperbaric Medicine*. Springer International Publishing; 2017. p. 1–30.
127. Mathieu D. *A handbook on hyperbaric medicine*. 2006. 1-812 p.
 128. Federman DG, Ladiiznski B, Dardik A, Kelly M, Shapshak D, Ueno CM, et al. Wound Healing Society 2014 update on guidelines for arterial ulcers. *Wound Repair Regen*. 2016;24(1):127–35.
 129. Abidia A, Laden G, Kuhan G, Johnson BF, Wilkinson AR, Renwick PM, et al. The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomised-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25:513–8.
 130. Gill AL, Bell CNA. *Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes*. Qjm. Oxford University Press; 2004;97(7):385–95.
 131. Schulke and Mayr GmbH. octenisept. 2017. Report No.: 910026-PL-pl-02-10 6/2017.
 132. MWE. The new generation of preanalytics The transport system for microbiology.
 133. Stuczen M. *Conventional and molecular approaches for bacterial identification and quantification in chronic wounds*. 2013.
 134. Bruker Daltonik. *Clinical Microbiology: The MALDI Biotyper System*. 2011.
 135. Pincus DH. *Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system*. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. 2010.
 136. EUCAST. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. 2015.
 137. CLSI. *M100S Performance Standards for Antimicrobial*. 2016. 1-282 p.
 138. Chang F, Yang CW, Lu W. Chronic wound: Pathogenesis and current treatments. *Acad J Second Mil Med Univ*. 2007;28(11):1259–61.
 139. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012. 229-317 p.
 140. Mustoe TA. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*. 2004;187(5 SUPPL. 1):65–70.
 141. Margolis DJ, Bilker W, Santanna J, Baumgarten M. Venous leg ulcer: incidence and prevalence in the elderly. *J Am Acad Dermatology*. 2002;46:381–6.
 142. Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner-Kerr T, Davidson J, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *Wound Repair Regen*. 2015;23(1):1–13.
 143. O'Brien JF, Grace PA, Perry IJ, Burke PE. Prevalence and aetiology of leg ulcers in Ireland. *Ir J Med Sci*. 2000;169(2):110–2.

144. Heyer K, Herberger K, Protz K, Glaeske G, Augustin M. Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data. *Wound Repair Regen.* 2016;24(2):434–42.
145. Guest JF, Ayoub N, McIlwraith T, Uchegbu I, Gerrish A, Weidlich D, et al. Health economic burden that different wound types impose on the UK's National Health Service. *Int Wound J.* 2017;14(2):322–30.
146. Jawien A, Grzela T, Ochwat A. Prevalence of chronic venous insufficiency in men and women in Poland: multicenter cross-sectional study in 40095 patients. *Phlebology.* 2003;18(3):110–21.
147. Moffatt CJ, Franks PJ, Doherty DC, Martin R, Blewett R, Ross F. Prevalence of leg ulceration in a London population. *QJM - Mon J Assoc Physicians.* 2004;97(7):431–7.
148. Milic DJ, Zivic SS, Bogdanovic DC, Karanovic ND, Golubovic Z V. Risk factors related to the failure of venous leg ulcers to heal with compression treatment. *J Vasc Surg. The Society for Vascular Surgery;* 2009;49(5):1242–7.
149. Apollonio A, Antignani PL, Di Salvo M, Failla G, Guarnera G, Mosti G, et al. A large Italian observational multicentre study on vascular ulcers of the lower limbs (Studio Ulcere Vascolari). *Int Wound J.* 2016;13(1):27–34.
150. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, Berlin JA. Diabetic Neuropathic Foot Ulcers. *Diabetes Care.* 2002 Oct 1;25(10):1835 LP-1839.
151. Moffatt CJ, Doherty DC, Smithdale R, Franks PJ. Clinical predictors of leg ulcer healing. *Br J Dermatol.* 2010;162(1):51–8.
152. Baker SR, Stacey MC. Epidemiology of chronic leg ulcers in Australia. *Aust N Z J Surg.* 1994;64(4):258–61.
153. Lim TS, Mwipatayi BP, Murray R, Sieunarine K, Abbas M, Angel D. Microbiological profile of chronic ulcers of the lower limb: a prospective observational cohort study. *ANZ J Surg.* 2006;76(8):688–92.
154. Rosiński G. Leczenie zespołu stopy cukrzycowej (ZSC). *Przew Lek.* 2005;8(3):58–64.
155. Ducka B, Strojek K. Rola diabetologa w zapobieganiu rozwojowi stopy cukrzycowej. *Przew Lek.* 2007;4:43–51.
156. Järbrink K, Ni G, Sönnnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev. Systematic Reviews;* 2016;5(1):152.
157. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986;204(3):322–30.
158. Bosanquet DC, Harding KG. Wound duration and healing rates: Cause or effect? *Wound Repair Regen.* 2014 Mar;22(2):143–50.
159. Rippon M, Davies P, White R, Bosanquet N. The economic impact of hard-to-heal

- leg ulcers. *Wounds UK*. 2007;3(2):58–69.
160. Marston W. Evaluation and treatment of leg ulcers associated with chronic venous insufficiency. *Clin Plast Surg*. Elsevier; 2007 Dec 29;34(4):717–30.
 161. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, Berlin JA. The accuracy of venous leg ulcer prognostic models in a wound care system. *Wound Repair Regen*. 2004;12(2):163–8.
 162. Margolis DJ, Berlin JA, Strom BL. Which venous leg ulcers will heal with limb compression bandages? *Am J Med*. 2000;109(1):15–9.
 163. Bjellerup M. Determining venous incompetence: a report from a specialised leg ulcer clinic. *J Wound Care*. 2006;15(10):429–36.
 164. Naude L. The practice and science of wound healing: wound bed preparation utilising the guidelines. *Wound Heal South Africa*. 2011;4(1):4–10.
 165. Uppal SK, Ram S, Kwatra B, Garg S, Gupta R. Comparative evaluation of surface swab and quantitative full thickness wound biopsy culture in burn patients. *Burns*. 2007;33(4):460–3.
 166. Taneja N, Chari PS, Singh M, Singh G, Biswal M, Sharma M. Evolution of bacterial flora in burn wounds: key role of environmental disinfection in control of infection. *Int J Burns Trauma*. 2013;3(2):102–7.
 167. Sibbald RG, Woo K. Increased bacterial burden and infection : the story of NERDS and STONES. *Adv Skin Wound Care*. 2006;19(October):447–61; quiz 462–3.
 168. Xu L, McLennan S V., Lo L, Natfaji A, Bolton T, Liu Y, et al. Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2007;30(2):378–80.
 169. Steer JA, Papini RPG, Wilson APR, McGrouther DA, Parkhouse N. Quantitative microbiology in the management of burn patients. I. Correlation between quantitative and qualitative burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture. *Burns*. 1996;22(3):173–6.
 170. Rhoads DD, Wolcott RD, Sun Y, Dowd SE. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):2535–50.
 171. Gilchrist B, Reed C. The bacteriology of chronic venous ulcers treated with occlusive hydrocolloid dressings. *Br J Dermatol*. Wiley Online Library; 1989;121(3):337–44.
 172. Basavaraju M, Sisnity VS, Palaparthy R, Addanki PK. Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms. *J Dent Sci*. Elsevier Taiwan LLC; 2016;11(4):349–52.
 173. Pereira SG, Moura J, Carvalho E, Empadinhas N. Microbiota of chronic diabetic wounds: Ecology, impact, and potential for innovative treatment strategies. *Front Microbiol*. 2017;8(SEP):1–12.
 174. Halbert AR, Stacey MC, Rohr JB, Jopp-Mckay A. The effect of bacterial colonization on venous ulcer healing. *Australas J Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd;

- 1992;33(2):75–80.
175. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues*. 2002;13(3):382–97.
 176. Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS. Molecular microbiology: New dimensions for cutaneous biology and wound healing. *J Invest Dermatol*. Elsevier Masson SAS; 2010;130(1):38–48.
 177. Awrotek P, Grygorcewicz B, Augustyniak A. Zmiany w taksonomii gamma-Proteobacteria, modyfikacja nazwy rzędu Enterobacteriales i nowe rodziny w obrębie Enterobacterales ord.nov. *Postępy Mikrobiol*. 2017;56(4):465–9.
 178. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. 2008;8:1–15.
 179. Misic AM, Gardner SE, Grice EA. The wound microbiome: Modern approaches to examining the role of microorganisms in impaired chronic wound healing. *Adv Wound Care*. 2014;3(7):502–10.
 180. Junckerstorff RK, Robinson JO, Murray RJ. Invasive *Streptococcus anginosus* group infection-does the species predict the outcome? *Int J Infect Dis*. International Society for Infectious Diseases; 2014;18(1):38–40.
 181. Siegman-Igra Y, Azmon Y, Schwartz D, Siegman-Igra Y. *Milleri* group streptococcus-a stepchild in the viridans family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(9):2453–9.
 182. Vergne A, Guérin F, Lienhard R, Le Coustumier A, Daurel C, Isnard C, et al. Identification and clinical significance of *Helcococcus kunzii* in human samples. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2703–5.
 183. Sunwoo BY, Miller WT. *Streptococcus anginosus* infections: Crossing tissue planes. *Chest*. The American College of Chest Physicians; 2014;146(4):e121–5.
 184. Smith K, Collier A, Townsend EM, O'Donnell LE, Bal AM, Butcher J, et al. One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: Characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiol*. BMC Microbiology; 2016;16(1):1–12.
 185. Li S. A case report of diabetic foot infection caused by *Helcococcus kunzii*. *Adv Microbiol*. 2017;6(2):52–5.
 186. Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*. 2003;50(5):1477–91.
 187. Shinzato T, Saito A. A mechanism of pathogenicity of “*Streptococcus milleri* group” in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *J Med Microbiol*. 2018;40(1994):118–23.
 188. Ganin H, Tang X, Meijler MM. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs. *Bioorganic Med Chem Lett*. Elsevier Ltd;

- 2009;19(14):3941–4.
189. Deborah HL, Marimuthu K, Lee JJ, Khong WX, Oon T, Zhang W, et al. Environmental colonization and onward clonal transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in a medical intensive care unit: the case for environmental hygiene. *Antimicrob Resist Infect Control*. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*; 2018;7(1):1–8.
 190. Agodi A, Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Aldisio E, Marchese AE, et al. Antibiotic trends of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* resistance indicators in an intensive care unit of Southern Italy, 2008–2013. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015;4(1):43.
 191. Cheon S, Kim M-J, Yun S-J, Moon JY, Kim Y-S. Controlling endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Units using antimicrobial stewardship and infection control. *Korean J Intern Med*. 2016;31(2):367–74.
 192. Chen Q, Zhou J, Fan J, Wu S, Xu L, Jiang Y, et al. Simultaneous emergence and rapid spread of three OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* ST208 strains in intensive care units confirmed by whole genome sequencing. *Infect Genet Evol*. Elsevier; 2018 Mar 1;58:243–50.
 193. Blanco N, Harris AD, Rock C, Johnson JK, Pineles L, Bonomo RA, et al. Risk Factors and Outcomes Associated with Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* upon Intensive Care Unit Admission. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology; 2018 Jan 1;62(1):e01631-17.
 194. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*. 2014;37(2):119–27.
 195. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*. 2016. p. 483.
 196. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(6):1119–25.
 197. Rathod VS, Kasturi I, Raut SS. Emergence of multi-drug resistant strains among bacterial isolates in a burn care facility. *Int J Res Med Sci*. 2014;3(1):149–52.
 198. Chowdhury AH, Saiful K, Husain MA, Akter N, Alam KM, Dewanjee AK, et al. Prevalence of Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL) producers among Gram-negative bacilli in wound infection. *Chattagram Maa-O-Shishu Hosp Med Coll J*. 2016;15(1):26–30.
 199. Vorhölter F-J, Arnold M, Wibberg D, Blom J, Winkler A, Viehoveer P, et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strain WS394, a multidrug-resistant and highly cytotoxic wound isolate from chronic ulcer cruris. *Genome Announc*. American Society for Microbiology; 2014 Dec 18;2(6):e01325-14.

200. Daeschlein G, Napp M, Lutze S, Arnold A, Von Podewils S, Guembel D, et al. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2015;13(2):143–9.
201. Lee RLP, Leung PHM, Wong TKS. A randomized controlled trial of topical tea tree preparation for MRSA colonized wounds. *Int J Nurs Sci*. Elsevier Ltd; 2014;1(1):7–14.
202. Schwendler M, Hübner C, Fleßa S. Costs and revenues of MRSA eradication in outpatients with chronic wounds – reimbursement of MRSA eradication. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2015;13(1):58–61.
203. Shaikh AR, Ali SA, Tahir SM, Memon R, Memon AS. Role of honey in wounds infected by MRSA in a teaching hospital. *Ann Pakistan Inst Med Sci*. 2016;12(4):267–70.
204. Demling RH, Waterhouse B. The increasing problem of wound bacterial burden and infection in acute and chronic soft-tissue wounds caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Burns Wounds*. 2007;7(1554–0766 (Electronic)):e8.
205. Yates C, May K, Hale T, Allard B, Rowlings N, Freeman A, et al. Wound Chronicity, Inpatient Care, and Chronic Kidney Disease Predispose to MRSA Infection in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*. 2009 Oct 1;32(10):1907 LP-1909.
206. Blaser G, Santos K, Bode U, Vetter H, Simon A. Effect of medical honey on wounds colonised or infected with MRSA. *J Wound Care*. Mark Allen Group; 2007 Aug 1;16(8):325–8.
207. O'Donnell TF, Passman MA, Marston WA, Ennis WJ, Dalsing M, Kistner RL, et al. Management of venous leg ulcers: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery® and the American Venous Forum. *J Vasc Surg*. 2014;60(2):3S–59S.
208. Heggors JP, Robson MC, Doran ET. Quantitative assessment of bacterial contamination of open wounds by a slide technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63(4):532–4.
209. Radosław Kraowski. Zmienność flory mikrobiologicznej ran oparzeniowych u dzieci. 2007.
210. Taddonio TE, Thomson PD, Tait MJ, Prasad JK, Feller I. Rapid quantification of bacterial and fungal growth in burn wounds: biopsy homogenate Gram stain versus microbial culture results. *Burns*. 1988;14(3):180–4.
211. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(4):415–25.
212. Redel H, Gao Z, Li H, Alekseyenko A V., Zhou Y, Perez-Perez GI, et al. Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. *J Infect Dis*. 2013;207(7):1105–14.

213. Rowan NJ. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends Food Sci Technol.* 2004;15(9):462–7.
214. Landis SJ. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv Skin Wound Care.* 2008;21(11):531–40.
215. Woo K, Sibbald R. A cross-sectional validation study of using NERDS and STONEES to assess bacterial burden. *Ostomy Wound Manag.* 2009;(August):40–8.
216. Uçkay I, Aragón-Sánchez J, Lew D, Lipsky BA. Diabetic foot infections: What have we learned in the last 30 years? *Int J Infect Dis.* 2015;40:81–91.
217. Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, et al. Special considerations in wound bed preparation 2011: an update. *Wound Heal South Africa.* 2011;4(2):55–72.
218. Steven, D.L., Bisno, A.L., Chambers, H.F., Everett, E.D., Dellinger, P., Goldstein, E.J.C., Gorbach, S.L., Hirschmann, J.V., Kaplan, E.L., Montoya, J.G., Wade JC. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41(March):1373–406.
219. Lipsky BA, Dryden M, Gottrup F, Nathwani D, Seaton RA, Stryja J. Antimicrobial stewardship in wound care: A position paper from the british society for antimicrobial chemotherapy and European wound management association. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(11):3026–35.
220. Chantelau E, Tanudjaja T, Altenhöfer F, Ersanli Z, Lacigova S, Metzger C. Antibiotic treatment for uncomplicated neuropathic forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabet Med.* Wiley-Blackwell; 2004 Jul 19;13(2):156–9.
221. Leese G, Nathwani D, Young M, Seaton A, Kennon B, Hopkinson H, et al. Use of antibiotics in people with diabetic foot disease: a consensus statement. *Diabet Foot.* 2009;12:62–78.
222. Huovinen S, Kotilainen P, Jarvinen H, Et.al. Comparison of ciprofloxacin or trimethoprim therapy for venous leg ulcers: results of a pilot study. *J Acad Dermatology.* 1994;31:279–82.

11. Załączniki

11.1. Ankieta jednorazowa

Ankieta wypełniana po zakwalifikowaniu pacjenta do badania klinicznego.

Data wypełnienia ankiety (DD/MM/RRRR)

Pieczętka i podpis wypełniającego ankietę

Pacjent nr	Nazwisko	Imię
Pesel	Data urodzenia DD/MM/RRRR	Wiek (liczba)
Lekarz kierujący na HBOT	Przychodnia	Miasto
Rozpoznanie podstawowe	Rozpoznanie uzupełniające	Inne schorzenia
Rodzaj rany* Owrzodzenie żyłne Owrzodzenie tętnicze Owrzodzenie mieszane Owrzodzenie na tle cukrzycy	Czas trwania Tygodnie (liczba)..... Miesiące (liczba)..... Lata (liczba).....	Data wystąpienia pierwszej zmiany DD/MM/RRRR
Lokalizacja rany kończyny dolnej* Strona przednia/tylna Strona przyśrodkowa/zewnętrzna	Powierzchnia rany*: zwiększyła się/zmniejszyła się w ciągu ostatniego 1 miesiąca	Wielkość rany w dniu badania Wysokość (cm) X Szerokość (cm)
Rana wystąpiła w tym regionie po raz* pierwszy/kolejny	Hospitalizacje w okresie trwania rany* tak/nie	Hospitalizacje c.d. kiedy (miesiąc-rok) szpital oddział
Przyjmowane antybiotyki * doustnie/dożylnie w ciągu ostatniego 1 miesiąca przed HBOT tak/nie	Rodzaj, dawka	Okres przyjmowania
Stosowane antyseptyki miejscowo w ciągu ostatniego 1 miesiąca przed HBOT* tak/nie	Rodzaj, częstość stosowania	Okres stosowania
Sterydoterapia/immunosupresja w ciągu ostatnich 3 miesięcy tak/nie	Interwencja chirurgiczna związana z owrzodzeniem w ciągu ostatniego 1 miesiąca tak/nie	Inne
Inne stosowane preparaty	Fizykoterapia* W domu/w przychodni	Inne
Stosowane opatrunki	Częstość zmiany opatrunku	Kto zmienia opatrunki* Pacjent samodzielnie Osoba z rodziny zawód medyczny/zawód niemedyczny Pielęgniarka w domu/przychodni Kto przeszkolił pacjenta/członka rodziny* Brak szkolenia/pielęgniarka/lekarz

*zakreślić odpowiednie

11.2. Formularz obserwacji rany

Pacjent

Tydzień badania	Tydzień 1	Tydzień 2	Tydzień 3	Tydzień 4	Tydzień 5	Tydzień 6
Data (DD/MM/RRRR)						
Długość rany (pionowo) - cm						
Szerokość rany (poziomo) - cm						
Podstawa rany po oczyszczeniu z wysięku: wygląd - kolor - <i>Podać w %</i>						
Różowy						
Czerwony						
Żółty						
Czarny						
Zielony						
Brzegi owrzodzenia <i>Podać % każdego rodzaju</i> Równe Postrzępione Wyniesione nad pow. rany W poziomie rany Widoczne naskórkowanie Inne						
Wysięk Surowiczny Surowiczo-krwisty Krwisty Krwisto-ropny Ropny Sucha rana						
Zapach Tak Nie						
Ból przy zmianie opatrunku Tak Nie						
Skóra otaczająca <i>Margines zmian w cm</i> Niezmieniona (B/Z) Zmacerowana (MAC) Sucha (SU) Wyprysk (EGZ) Zaczerwieniona (CZ) Naciek zapalny (cellulitis) (ZAP) Obrzęknięta (OBRZ)						

Tydzień badania	Tydzień 1	Tydzień 2	Tydzień 3	Tydzień 4	Tydzień 5	Tydzień 6
Przeczulica (PRZ) Inne						
Inne zmiany zlokalizowane (martwica, przetoka, przestrzenie płynowe) Podać „godzinę” - lokalizacja						
Przyjmowane antybiotyki						
Stosowane antyseptyki						
Inne środki						
Interwencja chirurgiczna						
Rodzaj opatrunku Gaza Inny.....						

11.3. Instrukcja pobierania wymazów

Instrukcja pobierania wymazów z owrzodzeń kończyn dolnych u pacjentów poddawanych terapii hiperbarycznej.

Do pobrania wymazu należy przygotować:

1. Jednorazowe rękawiczki – 2 pary
2. Roztwór 0,9% NaCl do przepłukania rany
3. Zestaw Sigma Transwab® MW176S (MWE) – wymazówka z bulionem transportowym Amies
4. Torebki do transportu

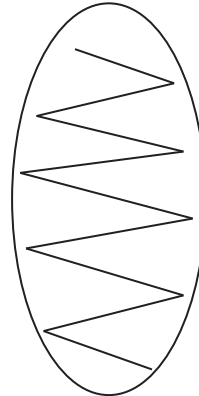
Oczyszczenie rany

1. Należy założyć rękawiczki jednorazowe
2. Przepłukać pod zwiększonym ciśnieniem powierzchnię rany solą fizjologiczną usuwając nadmiar wydzieliny (oczyszczanie mechaniczne)
3. Delikatnie należy osuszyć ranę jałowym gazikiem z nadmiaru soli fizjologicznej, odczekać 1-2 minuty (w tym czasie zmienić rękawiczki)
4. Należy zdjąć rękawiczki jednorazowe i zdezynfekować ręce
5. Należy założyć drugą parę jednorazowych rękawiczek

Pobieranie wymazu

1. Należy otworzyć próbkę i delikatnie wyjąć wymazówkę

2. Należy pobrać wymaz metodą Donovaną (duża rana) lub Levine'a (mała rana)
3. Należy umieścić wymazówkę w jałowej probówce, szczelnie zamknąć oraz podpisać danymi pacjenta (imię, nazwisko, data urodzenia, rodzaj materiału, data i godzina pobrania), nakleić kod paskowy.



Technika pobierania wymazu z rany metodą Donovaną na zestaw transportowy Sigma Transwab® MW176S (MWE)

1. Należy wymazówkę umieścić w lewym górnym rogu rany, około 5 mm od jej brzegu. Następnie ruchem typu „zig-zag” przemieszczać wymazówkę po powierzchni rany, obracając ją w tym czasie. Linia wymazu powinna objąć 10 punktów brzegowych umieszczonych w pewnej odległości od marginesu rany.
2. Ważne: cała powierzchnia rany powinna być objęta badaniem.
3. Nie wolno dotykać wymazówką brzegów rany.
4. Najlepiej, gdy punkt zwrotny wymazu znajduje się w odległości 5 mm od brzegu rany.
5. Umieścić wymazówkę w podłożu transportowym.

Technika pobierania wymazu z rany metodą Levine'a na zestaw transportowy Sigma Transwab® MW176S (MWE)

1. Należy wymazówkę przyłożyć do rany i ucisnąć nią powierzchnię około 1 cm² do czasu pojawienia się płynu tkankowego.
2. Nie wolno dotykać brzegów rany.
3. Kilkakrotnie obrócić wymazówkę w miejscu ucisku przez okres 5 sekund
4. Umieścić wymazówkę w podłożu transportowym.

11.4. Diagnostyka laboratoryjna

Diagnostyka laboratoryjna.

Należy przygotować materiał pobrany na zestaw transportowy Sigma Transwab® MW176S (MWE), szkiełko mikroskopowe, 3 x zestaw podłoży stałych do posiewu ilościowego metodą seryjnych rozcieńczeń (COS, CNA, MCK oraz w T1 i T6 przygotować dodatkowo podłoże COS do posiewu w kierunku drobnoustrojów beztlenowych z zestawem Genbag anaer). Dwie probówki z 1 ml bulionu BHI będą służyły do wykonania seryjnych rozcieńczeń.

Przed wykonaniem badania należy pobrany materiał worteksować przez 30 sekund w celu homogenizacji próbki.

Wymazówka z zestawu posiada objętość 100µl (chłonność), podłoże Amies 1000 µl (1 ml).

I. Technika wykonania preparatu mikroskopowego

Po otwarciu zestawu z pobranym materiałem należy wymazówką z zestawu nanieść 1 kroplę płynu i delikatnie rozprowadzić ją na szkiełku na obszarze o średnicy 1 cm². Pozostawić do wyschnięcia. Po utrwaleniu nad płomieniem palnika zabarwić metodą Grama według procedury obowiązującej w laboratorium.

II. Technika posiewu wymazu na podłoża stałe i płynne

1. Posiew bezpośredni z podłoża transportowego Amies.

Pobrać 10µl (oczkiem dużej ezy) homogenizat z podłoża Amies i nanieść próbkę ezą 10 µl na ½ płytki dwukrotnie na zestaw

podłóż: COS, CNA, MCK.

2. Przygotowanie serii rozcieńczeń.

Przenieść eżą 10 µl materiał do 1 ml bulionu BHI1. Po zworteksowaniu należy przenieść eżą 10 µl z BHI1 do BHI2.

3. Posiew seryjny na podłoża COS, CNA, MCK.

Posiać odpowiednio BHI1 i BHI2 dwukrotnie na ½ podłoża COS 1 i 2, CNA 1 i 2 oraz MCK 1 i 2 eżą 10 µl.

4. Podłoża: BHI1, MCK1,2 inkubować w warunkach tlenowych

w cieplarni dedykowanej dla wymazów z ran według procedury obowiązującej w laboratorium. Podłoża COS1,2 oraz CNA1,2 inkubować w cieplarni w atmosferze tlenowej wzbogaconej CO₂ w temperaturze 35-37°C.

5. W T1 i T6 wykonać dodatkowo posiew z podłoża transportowego

Amies w kierunku drobnoustrojów beztlenowych na podłoże COS metodą półilościową. Na posiew położyć krążek z aminoglikozydem. Po posianiu zamknąć w worku z saszetką Genbag anaer (bióMerieux) i włożyć do cieplarki dedykowanej dla wymazów z ran. Inkubować w temperaturze 35-37°C.

Posiewy inkubować 48 godzin. Po tym czasie odczytać liczbę drobnoustrojów na podłożu COS z rozcieńczenia, w którym obserwuje się wzrost pomiędzy 1 a 300 CFU. Przy braku wzrostu lub słabym wzroście drobnoustrojów ponowny odczyt należy wykonać po 5 dniach inkubacji.

Przyjmuje się, że na podłożu COS-1 (posiew bezpośredni z podłoża Amies) rozcieńczenie próbki wynosi 10³. Kolejne rozcieńczenia wynoszą: COS-2=10⁵, COS-4=10⁷.

Liczbę CFU oblicza się według wzoru:

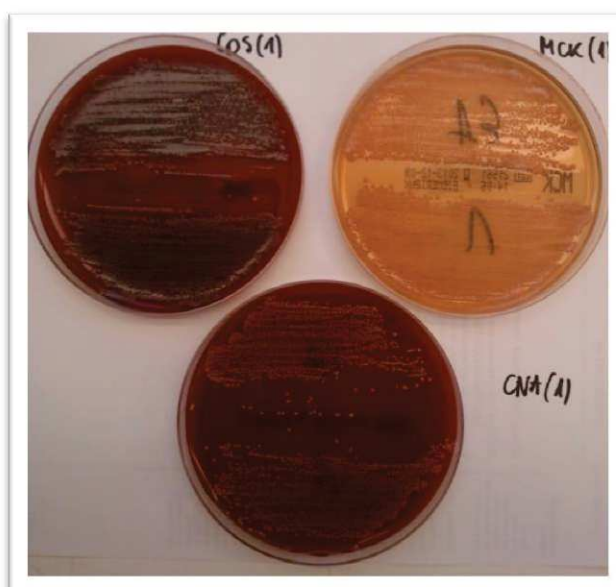
$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{CFU góra} + \text{CFU dół}}{2} \times \text{rozcieńczenie}$$

Przygotowane 3 zestawy do wykonania posiewu (fotografie Autora) (Fot. 7).



Fotografia 7. Zestaw do posiewu ilościowego wymazów treści z ran.

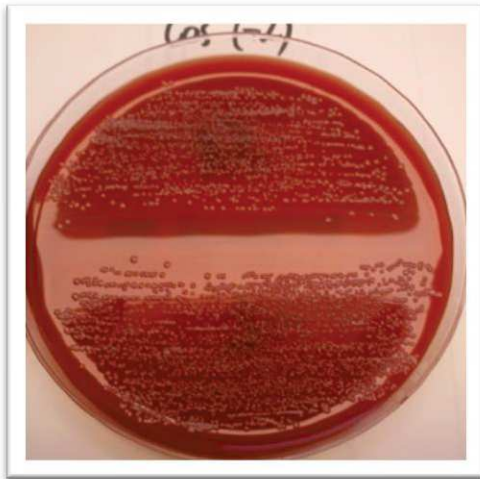
Przykładowy posiew na podłoża przedstawiono na Fotografii 8 oraz następnych.



Fotografia 8. Posiew bezpośredni tlenowy z podłoża Amies; komplet podłoży.



Fotografia 9. Posiew COS-1.



Fotografia 10. Posiew COS-2.



Fotografia 11. Posiew COS-4.

11.5. Formularz informacji dla pacjenta

Informacja dla pacjenta

Owrzodzenie goleni, które wystąpiło u Pana/Pani jest złożonym zjawiskiem chorobowym. Najczęściej występuje z powodu zaburzeń krążenia krwi żyłnej lub tętniczej w małych naczyniach krwionośnych (tzw. mikrokrążenie). Poprawa natlenienia tkanek, co ma miejsce w przebiegu terapii hiperbarycznej, usprawnia proces gojenia. Niestety, prawidłowy przebieg gojenia może być utrudniony z powodu obecności drobnoustrojów na powierzchni rany i w okolicznych tkankach. Aby ocenić obecność drobnoustrojów, zostaną pobrane wymazy z owrzodzenia (po oczyszczeniu rany gazikiem) podczas rutynowej kontroli stanu owrzodzenia i zmiany opatrunku w trakcie terapii hiperbarycznej. Badania będą wykonywane w ramach pracy klinicznej, co oznacza, że nie są rutynowym postępowaniem z pacjentem w trakcie trwania terapii hiperbarycznej.

Wyniki będą udostępniane lekarzowi prowadzącemu terapię hiperbaryczną.

11.6. Formularz zgody na udział w badaniu

Imię i Nazwisko Pacjenta

Gdynia, data (DD/MM/RRRR)

.....

.....

Zgoda Pacjenta na udział w badaniu

Wyrażam zgodę na mój udział w badaniach mikrobiologicznych treści z owrzodzenia, polegających na pobieraniu próbek z owrzodzenia metodą nieinwazyjną (metodą wymazu) podczas rutynowej kontroli stanu owrzodzenia i zmiany opatrunku w trakcie terapii hiperbarycznej.

Wyrażam również zgodę na przetwarzanie danych uzyskanych w badaniu do celów naukowych.

Jednocześnie zobowiązuję się do regularnego uczestniczenia w 30 seansach terapii hiperbarycznej w okresie 6 tygodni, zgodnie ze skierowaniem lekarskim (w załączeniu).

Podpis Lekarza przyjmującego zgodę

Podpis Pacjenta

.....

.....

11.7. Ocena liczby drobnoustrojów

Ocena liczby drobnoustrojów i leukocytów w preparacie mikroskopowym.

Liczba elementów morfotycznych – ocena (numeracja)	Liczba leukocytów Powiększenie 100×	Liczba bakterii Powiększenie 1000×
0	Nie stwierdzono	Nie stwierdzono
1	Maks. 1 leukocyt wpw przypadający średnio na pole widzenia	Maks. 1 komórka bakteryjna wpw przypadająca średnio na pole widzenia
2	2-10 leukocytów średnio wpw	2-10 komórek bakteryjnych średnio wpw
3	11-20 leukocytów średnio wpw	11-20 komórek bakteryjnych średnio wpw
4	21-50 leukocytów średnio wpw	21-50 komórek bakteryjnych średnio wpw
5	>50 leukocytów średnio wpw lub niepoliczalne	>50 komórek bakteryjnych średnio wpw lub niepoliczalne

11.8. Struktura klasyfikacyjna bakterii

Struktura klasyfikacyjna bakterii – podział na grupy 59 gatunków.

	Nazwa w bazie	Nazwa długa	Nazwa grupy	Barwienie Gram
1	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
2	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
3	<i>A. cummingsii</i>	<i>Arthrobacter cummingsii</i>	Inne	Gram-dodatni
4	<i>A. faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
5	<i>A. funkei</i>	<i>Actinomyces funkei</i>	Inne	Gram-dodatni
6	<i>A. genomospecies</i>	<i>Acinetobacter genomospecies</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
7	<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
8	<i>A. insolitus</i>	<i>Achromobacter insolitus</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
9	<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Inne	Gram-dodatni
10	<i>A. piechaudii</i>	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
11	<i>A. radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
12	<i>A. schlaalii</i>	<i>Actinobaculum schlaalii</i>	Inne	Gram-dodatni
13	<i>A. turicensis</i>	<i>Actinomyces turicensis</i>	Inne	Gram-dodatni
14	<i>A. viridans</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	Inne	Gram-dodatni
15	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
16	<i>C. braakii</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
17	<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
18	<i>C. murlinae</i>	<i>Citrobacter murlinae</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
19	<i>C. striatum</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>	Inne	Gram-dodatni
20	<i>D. acidovorans</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	Inne	Gram-ujemny
21	<i>D. hominis</i>	<i>Dermabacter hominis</i>	Inne	Gram-dodatni
22	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus</i>	Gram-dodatni
23	<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i>	Gram-dodatni
24	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
25	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
26	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	Gram-dodatni
27	<i>E. kobei</i>	<i>Enterobacter kobei</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
28	<i>H. kunzii</i>	<i>Helcococcus kunzii</i>	<i>Helcococcus</i>	Gram-dodatni
29	<i>H. sueciensis</i>	<i>Helcococcus sueciensis</i>	<i>Helcococcus</i>	Gram-dodatni
30	<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
31	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
32	<i>M. morgani</i>	<i>Morganella morgani</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
33	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Inne	Gram-dodatni
34	<i>N. flavescens</i>	<i>Neisseria flavescens</i>	Inne	Gram-ujemny
35	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Gram-ujemny
36	<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
37	<i>P. oleovorans</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
38	<i>P. rettgerii</i>	<i>Providencia rettgerii</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny

	Nazwa w bazie	Nazwa długa	Nazwa grupy	Barwienie Gram
39	<i>P.stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
40	<i>P.vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
41	<i>Ps.mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
42	<i>R.dentocariosa</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>	Inne	Gram-dodatni
43	<i>S.agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus z β-hem.</i>	Gram-dodatni
44	<i>S.anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus group</i>	Gram-dodatni
45	<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	S.aureus	Gram-dodatni
46	<i>S.capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	CNS	Gram-dodatni
47	<i>S.constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus anginosus group</i>	Gram-dodatni
48	<i>S.dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus z β-hem.</i>	Gram-dodatni
49	<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CNS	Gram-dodatni
50	<i>S.haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CNS	Gram-dodatni
51	<i>S.intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus group</i>	Gram-dodatni
52	<i>S.lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	CNS	Gram-dodatni
53	<i>S.maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PG(-) niefermentujące	Gram-ujemny
54	<i>S.marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacterales</i>	Gram-ujemny
55	<i>S.oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Inne	Gram-dodatni
56	<i>S.simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	CNS	Gram-dodatni
57	<i>S.viridans</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	Inne	Gram-dodatni
58	<i>S.warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	CNS	Gram-dodatni
59	<i>V.fluvialis</i>	<i>Vagococcus fluvialis</i>	Inne	Gram-dodatni

11.9. Dynamika tygodniowa

Liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem - dla 59 gatunków bakterii tlenowych

Gatunek	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Średnia liczba ran w tygodniu	Liczba ran co najmniej raz w czasie 6 tygodni obserwacji	% z 46
<i>P. aeruginosa</i>	17	16	14	12	12	15	14,33	21	45,7
<i>S. aureus</i>	15	10	11	11	10	12	11,5	19	41,3
<i>S. epidermidis</i>	12	6	5	5	3	6	6,17	19	41,3
<i>E. cloacae</i>	8	7	7	7	5	6	6,67	12	26,1
<i>E. faecalis</i>	9	5	6	6	4	3	5,5	11	23,9
<i>E. coli</i>	6	5	8	5	4	4	5,33	9	19,6
<i>H. kunzii</i>	6	7	5	3	4	5	5	7	15,2
<i>P. mirabilis</i>	6	3	4	6	5	5	4,83	7	15,2
<i>A. baumannii</i>	4	4	4	2	2	2	3	5	10,9
<i>S. agalactiae</i>	5	3	3	4	4	4	3,83	5	10,9
<i>D.hominis</i>	1	2	3	2	1	2	1,83	4	8,7
<i>S.marcescens</i>	3	3	2	2	1	1	2	4	8,7
<i>S.simulans</i>	2	1	3	1	1	1	1,5	4	8,7
<i>C.freundii</i>	3	2	0	0	0	1	1	3	6,5
<i>C.striatum</i>	2	2	1	0	0	1	1	3	6,5
<i>K. pneumoniae</i>	2	2	3	2	2	2	2,17	3	6,5
<i>P.rettgerii</i>	1	2	2	0	0	0	0,83	3	6,5
<i>S.anginosus</i>	1	2	2	3	1	2	1,83	3	6,5
<i>S.constellatus</i>	2	3	2	1	3	3	2,33	3	6,5
<i>S.haemolyticus</i>	0	1	2	0	1	2	1	3	6,5
<i>S.lugdunensis</i>	0	0	2	2	0	1	0,83	3	6,5
<i>S.maltophilia</i>	2	2	1	1	1	1	1,33	3	6,5
<i>S.viridans</i>	1	1	0	1	0	0	0,5	3	6,5
<i>A.faecalis</i>	1	2	1	1	1	1	1,17	2	4,3
<i>A.xylosoxidans</i>	0	0	0	2	1	0	0,5	2	4,3
<i>E.avium</i>	1	2	2	2	1	1	1,5	2	4,3
<i>E.casseliflavus</i>	1	0	1	0	0	0	0,33	2	4,3
<i>K.oxytoca</i>	2	2	2	1	1	1	1,5	2	4,3
<i>M.morganii</i>	1	1	2	1	1	1	1,17	2	4,3
<i>N.flavescens</i>	1	1	0	0	0	0	0,33	2	4,3
<i>S.dysgalactiae</i>	1	1	1	1	1	2	1,17	2	4,3
<i>S.oralis</i>	1	1	1	2	1	1	1,17	2	4,3
<i>A.calcoaceticus</i>	0	1	1	1	0	0	0,5	1	2,2

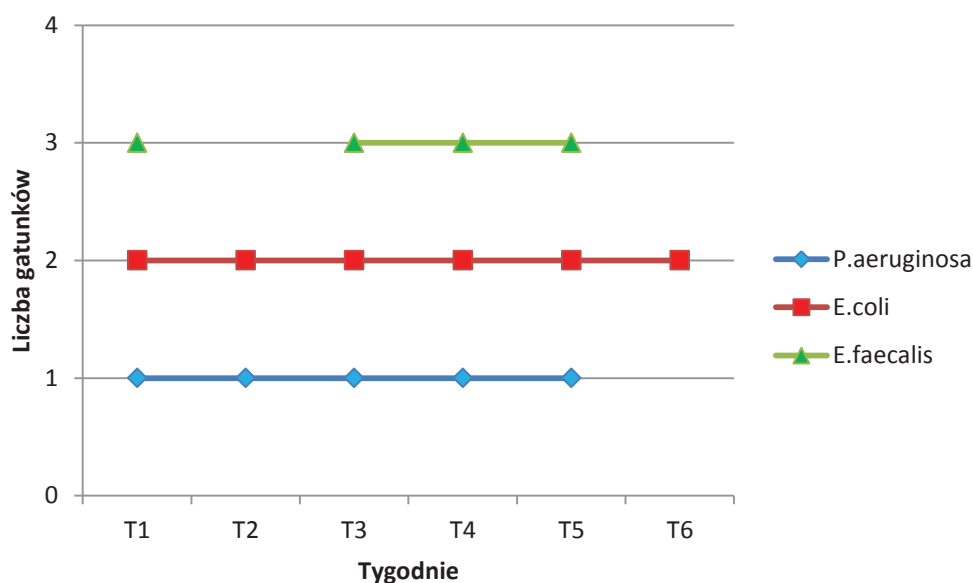
Gatunek	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Średnia liczba ran w tygodniu	Liczba ran co najmniej raz w czasie 6 tygodni obserwacji	% z 46
<i>A.cumminsii</i>	1	0	0	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>A.funkei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2
<i>A.genomospecies</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>A.hydrophila</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>A.insolitus</i>	0	0	0	0	1	0	0,17	1	2,2
<i>A.odontolyticus</i>	1	1	0	0	0	0	0,33	1	2,2
<i>A.piechaudii</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>A.radioresistens</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>A.schlaalii</i>	1	1	1	1	1	0	0,83	1	2,2
<i>A.turicensis</i>	1	0	0	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>A.viridans</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>C.braakii</i>	0	0	1	0	0	1	0,33	1	2,2
<i>C.murlinae</i>	0	1	0	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>D.acidovorans</i>	1	0	0	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>E.kobei</i>	0	0	1	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>H.sueciensis</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2
<i>P.oleovorans</i>	1	0	0	1	1	1	0,67	1	2,2
<i>P.stuartii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2
<i>P.vulgaris</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2
<i>Ps.mosselii</i>	1	1	1	0	0	0	0,5	1	2,2
<i>R.dentocariosa</i>	0	1	0	0	0	0	0,17	1	2,2
<i>S.capitis</i>	0	0	0	0	0	1	0,17	1	2,2
<i>S.intermedius</i>	1	1	0	0	1	1	0,67	1	2,2
<i>S.warneri</i>	0	0	1	1	1	1	0,67	1	2,2
<i>V.fluvialis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2

11.10. Przypadki kliniczne

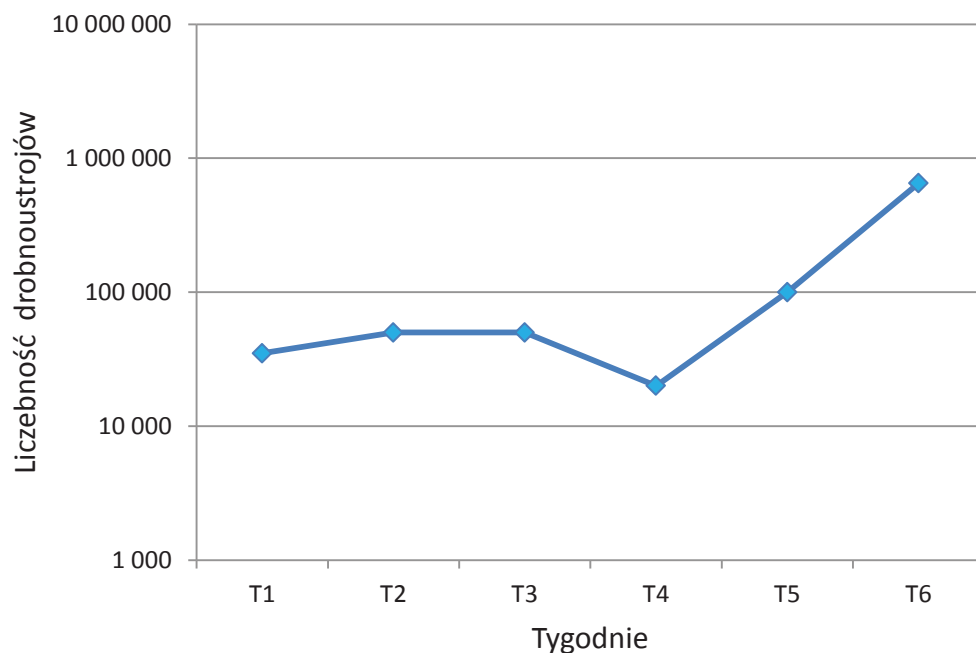
Poniżej zaprezentowano dwie sytuacje kliniczne oraz wyniki obserwacji tygodniowych rany (skład gatunkowy rany i liczebność drobnoustrojów).

11.10.1. Przypadek 1.

Rana o numerze 12261 u kobiety lat 78 po amputacji palucha z powodu zespołu stopy cukrzycowej. Wyhodowano 3 gatunki drobnoustrojów tlenowych. Bakterii beztlenowych nie stwierdzano. Wielkość rany w T1=8,75cm², w T6=10,5cm². W szóstym tygodniu obserwacji pacjentka otrzymywała Biseptol. Nie zaobserwowano gojenia rany. Na wykresach przedstawiono zmiany gatunkowe drobnoustrojów w ranie (Wykres 1) oraz zmiany liczebności drobnoustrojów w ranie wykres (Wykres 2).



Wykres 1. Drobnoustroje obecne w ranie 12261 (T1-T6).

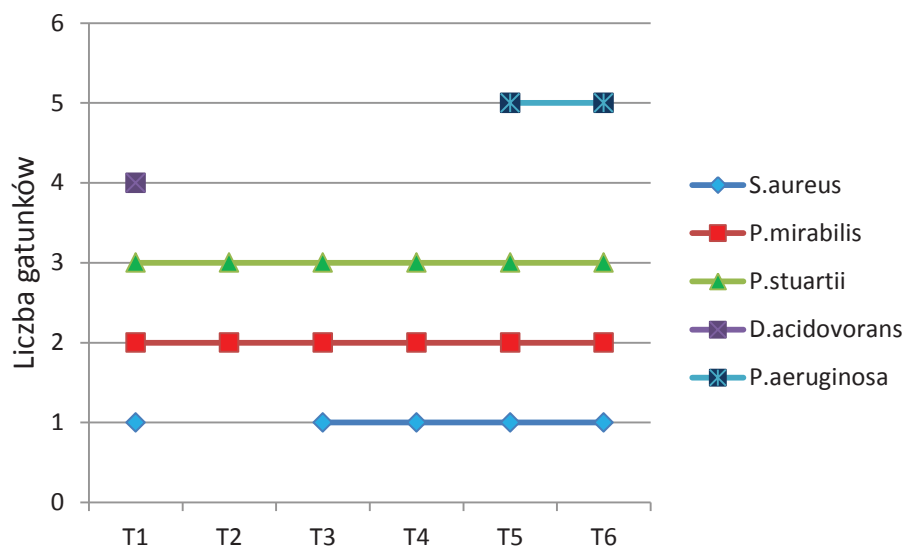


Wykres 2. Liczebność drobnoustrojów łącznie w ranie 12261 (T1-T6).

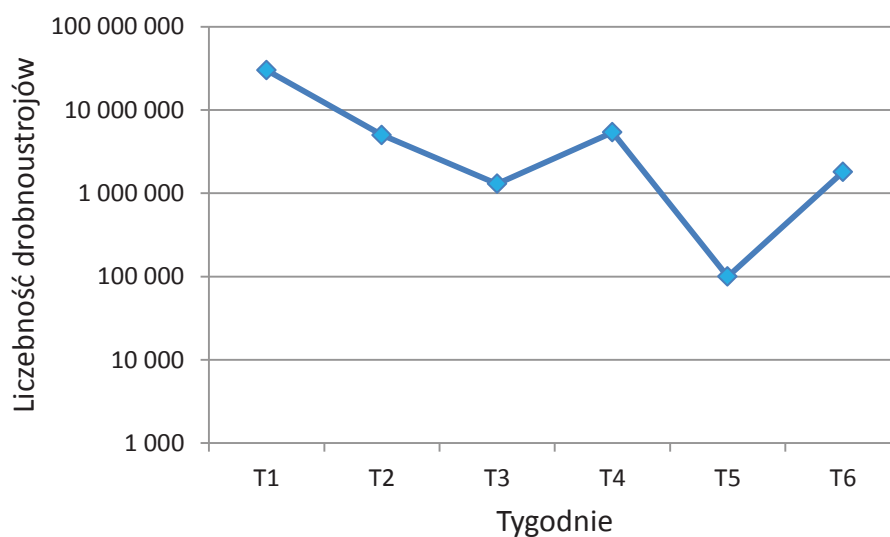
11.10.2. Przypadek 2

Rana z powodu przewlekłej niewydolności żylniej, numer 15485 u kobiety lat 75. Lokalizacja: podudzie. Nie choruje na cukrzycę. W ranie występowało łącznie 5 różnych gatunków bakterii. Bakterii beztlenowych nie stwierdzano. Wielkość rany w T1=224 cm², w T6=168 cm². W drugim i trzecim tygodniu obserwacji pacjentka otrzymywała Ciprinol. W szóstym tygodniu obserwacji odnotowano gojenie rany.

Na wykresach przedstawiono zmiany gatunkowe drobnoustrojów w ranie (Wykres 3) oraz zmiany liczebności drobnoustrojów w ranie (Wykres 4).



Wykres 3. Drobnoustroje obecne w ranie 15485 (T1-T6).



Wykres 4. Liczebność drobnoustrojów łącznie w ranie 12261 (T1-T6).

11.11. Spis rysunków, fotografii i tabel

11.11.1. Rysunki

Rysunek 1. Ocena póżnościowa drobnoustrojów w preparatach mikroskopowych w kolejnych tygodniach obserwacji.	49
Rysunek 2. Liczba oraz częstość wyników dodatnich i ujemnych w metodzie mikroskopii i posiewu.	61
Rysunek 3. Zmiany częstości występowania dominujących gatunków drobnoustrojów.	65
Rysunek 4. Zmiany częstości występowania 10 grup drobnoustrojów.	66
Rysunek 5. Czas pobytu 10 najczęstszych gatunków drobnoustrojów w tygodniach.	69
Rysunek 6. Czas pobytu w ranie 10 grup drobnoustrojów w tygodniach.	71
Rysunek 7. Liczebność drobnoustrojów w posiewie [log ₁₀] a mikroskopia (póżnościowo) tygodniami.	79
Rysunek 8. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T6 [log ₁₀].	85
Rysunek 9. Gojenie vs. Czas trwania rany.	89
Rysunek 10. Gojenie rany. Obserwacje w T1, T3, T5, T6.	90
Wykres 1. Drobnoustroje obecne w ranie 12261 (T1-T6).	158
Wykres 2. Liczebność drobnoustrojów łącznie w ranie 12261 (T1-T6).	159
Wykres 3. Drobnoustroje obecne w ranie 15485 (T1-T6).	160
Wykres 4. Liczebność drobnoustrojów łącznie w ranie 12261 (T1-T6).	160

11.11.2. Fotografie

Fotografia 1. Rana „młoda”, trwająca 4 tygodnie, pacjent 12420.	45
Fotografia 2. Rana „średnia”, trwająca 8 miesięcy, pacjent 13243.	45
Fotografia 3. Rana „stara”, trwająca 12 lat, pacjent 15485.	46
Fotografia 4. Rana „mała” palucha (1 cm ²), pacjent 12486.	47
Fotografia 5. Rana „średnia” podudzia (6 cm ²), pacjent 13468.	47
Fotografia 6. Rana „duża” podudzia (250 cm ²), pacjent 15044.	48
Fotografia 7. Zestaw do posiewu ilościowego wymazów treści z ran.	149
Fotografia 8. Posiew bezpośredni tlenowy z podłoża Amies; komplet podłoży.	149
Fotografia 9. Posiew COS-1.	150
Fotografia 10. Posiew COS-2.	150
Fotografia 11. Posiew COS-4.	150

11.11.3. Tabele

Tabela 1. Wiek pacjentów z uwzględnieniem płci. Wyjaśnienie nagłówek kolumn znajduje się na stronie 53.	38
Tabela 2. Statystyki opisowe czasu trwania rany.	39
Tabela 3. Pole powierzchni ran w pierwszym tygodniu obserwacji (T1).	39
Tabela 4. Zależność występowania zespołu stopy cukrzycowej i cukrzycy.	39
Tabela 5. Liczba i częstość występowania analizowanych typów owrzodzenia.	39
Tabela 6. Zależność występowania zespołu stopy cukrzycowej i typu owrzodzenia.	40
Tabela 7. Wiek pacjentów z uwzględnieniem typu owrzodzenia.	40
Tabela 8. Wiek pacjentów ze stopą cukrzycową.	40
Tabela 9. Liczba ran i częstość stosowania antybiotyków w tygodniach T1-T6.	41
Tabela 10. Stosowanie antybiotyków.	42
Tabela 11. Liczba i częstość klasyfikacji czasu trwania rany.	44
Tabela 12. Liczba i częstość gatunków drobnoustrojów w analizowanych grupach.	52
Tabela 13. Liczba i częstość klasyfikacji pola powierzchni rany.	55
Tabela 14. Pola powierzchni ran w T1 i T6.	56
Tabela 15. Różnica pola powierzchni ran pomiędzy T6 i T1 [w cm ²].	56
Tabela 16. Migracja pola powierzchni rany w grupach według kryterium wielkości.	56
Tabela 17. Liczba ran i częstość w przypadku gojenia rany i bez gojenia.	57
Tabela 18. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a czas trwania rany.	57
Tabela 19. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a czas trwania rany.	58
Tabela 20. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a pole powierzchni rany w T1.	58
Tabela 21. Liczba i częstość występowania 3 typów owrzodzeń a pole powierzchni rany w T6.	59
Tabela 22. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a pole powierzchni rany w T1.	59
Tabela 23. Liczba i częstość zespołu stopy cukrzycowej a pole powierzchni rany w T6.	59
Tabela 24. Liczba oraz częstość wyników dodatnich i ujemnych w metodzie mikroskopii i posiewu, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba dodatnich wyników, y - liczba wykonanych badań, % - odsetek dodatnich wyników dla rodzaju badania.	60
Tabela 25. Wykaz wyhodowanych gatunków bakterii beztlenowych.	63
Tabela 26. Dynamika częstości [w %] występowania dominujących gatunków drobnoustrojów tlenowych w sześciu tygodniach obserwacji w ranach, w których pobierano posiew.	65

Tabela 27. Dynamika częstości [w %] występowania grup drobnoustrojów w sześciu tygodniach obserwacji w ranach, w których pobierano posiew.....	66
Tabela 28. Porównanie częstości występowania najczęściej występującego gatunku (<i>P. aeruginosa</i>) z innymi dominującymi gatunkami występującymi w ranach z częstością powyżej 10%.....	67
Tabela 29. Czas pobytu w ranie [w tyg.] 10 dominujących gatunków.....	68
Tabela 30. Zależności międzygatunkowe średniego czasu pobytu drobnoustrojów w ranach na przykładzie <i>P. aeruginosa</i>	69
Tabela 31. Czas pobytu w ranie grup drobnoustrojów w tygodniach.....	70
Tabela 32. Zależności międzygatunkowe średniego czasu pobytu drobnoustrojów w ranach na przykładzie grupy <i>Streptococcus β-hem.</i>	71
Tabela 33. Występowanie grup drobnoustrojów w kategoriach owrzodzenia, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran danego typu, % - odsetek ran danego typu z wyhodowanym drobnoustrojem.	73
Tabela 34. Występowanie dominujących gatunków drobnoustrojów w kategoriach owrzodzenia z zespołem stopy cukrzycowej i bez, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran danego typu, % - odsetek ran danego typu z wyhodowanym drobnoustrojem.	74
Tabela 35. Występowanie grup drobnoustrojów w T1 w trzech kategoriach wielkości ran, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.	75
Tabela 36. Występowanie gatunków drobnoustrojów w T6 w trzech kategoriach wielkości ran przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.	76
Tabela 37. Liczba i częstość występowania dominujących gatunków drobnoustrojów w zależności od wieku rany, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.	77
Tabela 38. Liczba i częstość występowania grup drobnoustrojów w zależności od wieku rany, przedstawione jako x/y (%), gdzie x - liczba ran z wyhodowanym drobnoustrojem, y - liczba ran w danej kategorii, % - odsetek ran danej kategorii z wyhodowanym drobnoustrojem.	77
Tabela 39. Ocena półilościowa drobnoustrojów metodą mikroskopii bezpośredniej a liczebność w posiewie ilościowym [\log_{10}]. N – liczba ocenianych ran w mikroskopii.....	78

Tabela 40. Liczebność drobnoustrojów w posiewach ilościowych z ran.	80
Tabela 41. Statystyki opisowe liczebności drobnoustrojów w ranie tygodniami [log ₁₀]. N – liczba ran z wykonanym posiewem.	80
Tabela 42. Statystyki opisowe globalnej liczebności tygodniowo [log ₁₀].	81
Tabela 43. Liczba tygodni (nT) dla łącznej liczby ran dla liczebności < 10 ⁵ i <10 ⁶	82
Tabela 44. Statystyki opisowe czasu trwania w ranach 10 dominujących drobnoustrojów w liczebności <10 ⁵ (w tygodniach).	82
Tabela 45. Statystyki opisowe czasu trwania w ranach 10 dominujących drobnoustrojów w liczebności <10 ⁶ (w tygodniach).	82
Tabela 46. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla 3 różnych okresów trwania rany [log ₁₀].	84
Tabela 47. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T1 [log ₁₀].	84
Tabela 48. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla trzech przedziałów wielkości ran w T6 [log ₁₀].	84
Tabela 49. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla różnych typów owrzodzenia (tętnicze, żyłne, inne) [log ₁₀].	86
Tabela 50. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla obecnego zespołu stopy cukrzycowej i braku tego rozpoznania [log ₁₀].	86
Tabela 51. Typ owrzodzenia a gojenie rany.	87
Tabela 52. Typ owrzodzenia: w kategorii: stopa cukrzycowa a gojenie rany.	87
Tabela 53. Gojenie vs. Pole powierzchni rany w T1.	87
Tabela 54. Gojenie vs. Pole powierzchni rany w T6.	88
Tabela 55. Gojenie vs. Czas trwania rany.	88
Tabela 56. Liczba i częstość grup drobnoustrojów dla ran bez gojenia i z cechami gojenia.	89
Tabela 57. Statystyki opisowe globalnej liczebności dla ran z gojeniem i bez.	90