MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2020,72: 5-12 https://doi.org/10.32394/mdm.72.01

Kolonizacja jamy ustnej chorych na cukrzycę ze współistniejącym zespołem stopy cukrzycowej szczepami *Staphylococcus aureus* opornymi na metycylinę

Oral carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among patients with diabetic foot ulcer

Marek Chmielewski[1], Agata Knura[1], Weronika Rybakowska[1], Mateusz Rybakowski[1], Natalia Młodzik[1], Klaudia Kołtuniak[1], Anna Korzon-Burakowska[2], Małgorzata Jarosiewicz[3], Alina Gębska[3], Katarzyna Garbacz[3,]*

[1]Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Mikrobiologii Jamy Ustnej, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny
[2]Katedra Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny
[3]Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

***Staphylococcus aureus* jest bakterią często kolonizującą jamę ustną chorych na cukrzycę i równocześnie jednym z najczęstszych patogenów wywołujących zespół stopy cukrzycowej. Niniejsza praca miała na celu porównanie bakterii występujących w owrzodzeniach stopy cukrzycowej oraz w jamie ustnej chorych na cukrzycę, a także określenie czy jama ustna stanowi potencjalny rezerwuar patogennych bakterii, w szczególności metycylinoopornych *S. aureus*.**

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus, MRSA, zespół stopy cukrzycowej, jama ustna*

ABSTRACT

Introduction: Diabetic foot ulcer (DFU) caused by *Staphylococcus aureus* is one of the most feared complications of diabetes mellitus. The studies reporting the oral cavity as a potential reservoir of *S. aureus* in diabetic patients are sparse. The aim of the study was to compare the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the oral and in the diabetic foot specimens from DFU patients.

Materials and Methods: A total 80 specimens (40 oral swabs and 40 DFU swabs) were collected from diabetic patients with foot ulcer. The specimens were subcultured and the susceptibility of isolated *S. aureus* strains to antimicrobial agents was determined. Suspected methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains were further examined for the presence of modified PBP2a protein.

* Autor korespondujący

Results: Less than one-fifth of patients with DFU had oral *S. aureus* carriage, however the colonization is significantly associated with *S. aureus* diabetic foot infection. *S. aureus* strains were isolated from 52.5% of DFU specimens, 17.5% were resistant to methicillin. *S. aureus* strains were isolated from 17.5% of oral specimens of diabetic patients; 2.5% were methicillin-resistant. The MRSA strains were isolated sevenfold more frequently from the diabetic foot than from the oral cavity.
Conclusions: Although diabetic foot infections caused by an endogenous *S. aureus* strains colonizing the oral cavity of diabetic patients seems unlikely, it is evidently important to monitor the oral S. aureus carriage in diabetic patients and their resistance to antibiotics.

Key words: *Staphylococcus aureus, MRSA, diabetic foot ulcer, oral cavity*

WSTĘP

Jama ustna człowieka charakteryzuje się bogatą mikroflorą bakteryjną. Zgodnie z ostatnimi danymi z bazy Human Oral Microbiome Database (eHOMD), w jamie ustnej bytuje ponad 770 różnych gatunków bakterii (21). Skład mikrobiomu jamy ustnej ma charakter indywidualny i zależy od wielu czynników, miedzy innymi od wieku, stanu zdrowia, diety, higieny jamy ustnej oraz warunków socjalnych (21). Obecność fizjologicznego mikrobiomu jest jedną z oznak zdrowia, a jego zmiany mogą wskazywać na toczący się proces chorobowy (5). Istniejąca homeostaza może zostać naruszona w wyniku działania różnych czynników, często jest nim antybiotykoterapia (5). Niekiedy zmiany we florze jamy ustnej są jednym z pierwszych sygnałów chorób ogólnoustrojowych, do których należy również cukrzyca. Hiperglikemia powodująca odwodnienie prowadzi do zmniejszenia ilości produkowanej śliny, co wpływa na słabszą regenerację i łatwiejsze uszkadzanie komórek nabłonka. W efekcie zwiększa się liczba bakterii w jamie ustnej chorych, skutkując stanami zapalnymi błony śluzowej jamy ustnej, a uszkodzony nabłonek stanowi potencjalne wrota przenikania bakterii do krwi (3).

Jedną z bakterii, której ilość wyraźnie wzrasta w jamie ustnej u chorych na cukrzycę, jest *Staphylococcus aureus* (19). Nie jest znana dokładna przyczyna tego zjawiska. Trudno jednoznacznie określić czy ma to związek jedynie z kserostomią, czy też wynika z innych uwarunkowań, m.in. wieku czy stosowanych uzupełnień protetycznych (19). Dotąd stosunkowo mało uwagi poświęcano jamie ustnej jako rezerwuarowi szczepów *S. aureus*. Ostatnie badania pokazują, że kolonizacja jamy ustnej przez gronkowca złocistego może być równie częsta jak nosogardzieli czy skóry, a jego obecność jest często pomijana (8, 18). Istnieje zatem ryzyko wysiewu potencjalnie patogennych *S. aureus* z jamy ustnej do innych miejsc w organizmie człowieka (14). Ma to szczególne znaczenie u chorych z wysokim ryzykiem infekcji, takich jak chorzy na cukrzycę. Drobnoustroje bytujące w jamie ustnej mogą być punktem wyjścia dla zakażeń rozwijających się w innych, często nawet odległych miejscach organizmu, w szczególności ran związanych ze stopą cukrzycową (20).

Celem naszej pracy było porównanie bakterii występujących w owrzodzeniach stopy cukrzycowej oraz w jamie ustnej chorych na cukrzycę oraz określenie czy jama ustna może stanowić potencjalny rezerwuar patogennych bakterii, w szczególności metycylinoopornych *S. aureus*.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badań stanowiły wymazy pobrane od chorych na cukrzycę typu 1 i 2 leczonych w Regionalnym Centrum Diabetologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku w latach 2018-2019. Łącznie pobrano 80 wymazów od 40 pacjentów, od każdego chorego pochodziły dwa wymazy, jeden z owrzodzenia stopy cukrzycowej (40 wymazów), drugi z błony śluzowej dna jamy ustnej w okolicy zębów trzonowych (40 wymazów). Wymazy pobrano pod kontrolą lekarza przy użyciu jałowych wymazówek z podłożem transportowym. Na wykonanie powyższych badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (numer NKBBN/511/2017). Wymazy posiano na standardowe podłoża wzrostowe (Columbia agar, Chapman agar, McConkey agar i Sabouraud). Posiewy inkubowano 24-48h w temperaturze 37ºC. Po wstępnej analizie wyrosłych kolonii, wykonano standardową diagnostykę mikrobiologiczną z użyciem testów Microgen STAPH-ID, Microgen STREP-ID oraz systemu API.

Do oceny antybiotykowrażliwości zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hinton agar. Interpretację prowadzono zgodnie z rekomendacjami EUCAST (4). Użyto następujących antybiotyków: cefoksytyna (30µg), erytromycyna (15µg), ciprofloksacyna (5µg), klindamycyna (2µg), chloramfenikol (30µg), tetracyklina (30µg), gentamycyna (10µg), kotrimoksazol (sulfametoksazol+trimetoprim 1.25/23,75µg) i wankomycyna (E-test) (Becton, Dickinson and Company). Szczepy oporne na cefoksytynę posiewano na podłoże chromogenne z oksacyliną (Oxacillin Resistance Screening Agar Base Oxoid™). Dodatkowo oporność na oksacylinę (MRSA) potwierdzono testem lateksowym, wykrywającym białko PBP2a.

WYNIKI

Zarówno z wymazów z owrzodzeń stopy cukrzycowej (52,5%) jak i z wymazów z jamy ustnej (17,5%) najczęściej izolowaną bakterią był *S. aureus.* W wymazach ze stopy kolejnymi co do częstości izolowanymi bakteriami były pałeczki Gram-ujemne z gatunków: *Pseudomonas aeruginosa* (20%), *Proteus vulgaris* (17,5%), *Escherichia* coli (12,5%) oraz *Enterobacter cloacae* (10%). Do gatunków rzadziej izolowanych należały: *Citrobacter koseri, Klebsiella oxytoca, Providencia rettgeri i Serratia odorifera* (Tab. 1).

W zdecydowanej większości wymazów z jamy ustnej stwierdzono obecność bakterii flory z grupy *Streptococcus viridans*, *Neisseria sp.* i *Corynebacterium sp.* Obok nich wyizolowano potencjalnie patogenne bakterie z gatunków: *S. aureus* (17,5%), *P. aeruginosa* (5%), *E. aerogenes* (5%), *P. putida* (2,5%), *E. cloace* (2,5%) i *E. coli* (2,5%) (Tab. 1). Jedynie z jamy ustnej poza bakteriamii wyizolowano drożdżaki z rodzaju *Candida*, *C. albicans* (22,5%), *C. glabrata* (7,5%), *C. tropicalis* (2,5%) i *C. lypolytica* (2,5%) (Tab. 1).

Najczęściej izolowaną potencjalnie patogenną bakterią był *S. aureus,* u 3 pacjentów spośród 40 (7,5%) wyizolowano go zarówno z rany jaki i z jamy ustnej. Lekooporność wyizolowanych *S. aureus* najczęściej dotyczyła: penicyliny (67,9%), klindamycyny (60,7%), erytromycyny (57,1%) i gentamycyny (46,4%). Rzadziej tetracykliny (28,6%), kotrimoksazolu (25%), ciprofloksacyny (17,9%) i chloramfenikolu (10,7%) (Tab. 2). Osiem z wyizolowanych szczepów było metycylinoopornych (MRSA) (10%), z czego zdecydowana

większość (17,5%) pochodziła ze stopy, a tylko jeden szczep z jamy ustnej (2,5%). Wśród *S. aureus* izolowanych z jamy ustnej najwięcej szczepów było opornych na penicylinę i klindamycynę, 42,9%. Oporność na pozostałe antybiotyki była wyraźnie niższa niż izolatów pochodzących ze stopy, jak przedstawiono w Tabeli 2. Szczepy MRSA wykazywały wyższe odsetki oporności na wszystkie badane antybiotyki niż szczepy MSSA (Tab. 3).

Tabela 1. Częstość izolacji potencjalnie patogennych drobnoustrojów z owrzodzenia stopy cukrzycowej oraz z jamy ustnej chorych na cukrzycę

Drobnoustrój	Stopa cukrzycowa (n=40)	Jama ustna (n=40)	Ogółem (n=80)
Staphylococcus aureus	21 (52,5%)	7 (17,5%)	28 (35%)
Paciorkowce β-hemolizujące: - grupy A	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
- grupy B	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
- grupy C	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Pseudomonas aeruginosa	8 (20%)	2 (5%)	10 (12,5%)
Pseudomonas putida	2 (5%)	1 (2,5%)	3 (3,75%)
Proteus vulgaris	7 (17,5%)	0	7 (8,75%)
Proteus mirabilis	4 (10%)	0	4 (5%)
Escherichia coli	5 (12,5%)	1 (2,5%)	6 (7,5%)
Enterobacter cloacae	4 (10%)	1 (2,5%)	5 (6,25%)
Enterobacter aerogenes	0	2 (5%)	2 (2,5%)
Acinetobacter baumanii	2 (5%)	0	2 (2,5%)
Morganella morganii	2 (5%)	0	2 (2,5%)
Aeromonas hydrophila	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Citrobacter koseri	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Citrobacter freundii	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Klebsiella oxytoca	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Providencia rettgeri	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Serratia odorifera	1 (2,5%)	0	1 (1,25%)
Candida albicans	0	9 (22,5%)	9 (11,25%)
Candida glabrata	0	3 (7,5%)	3 (3,75%)
Candida tropicalis	0	1 (2,5%)	1 (1,25%)
Candida lypolytica	0	1 (2,5%)	1 (1,25%)

Tabela 2. Lekooporność izolatów *S. aureus* pochodzących ze stopy cukrzycowej i z jamy ustnej chorych na cukrzycę

Antybiotyk	*S. aureus*		Ogółem *S. aureus* (%) (n=28)
	Stopa cukrzycowa (%) (n=21)	Jama ustna (%) (n=7)	
penicylina	16 (76,2)	3 (42,9)	19 (67,9)
klindamycyna	14 (66,6)	3 (42,9)	17 (60,7)
erytromycyna	14 (66,6)	2 (28,6)	16 (57,1)
gentamycyna	11 (52,4)	2 (28,6)	13 (46,4)
tetracyklina	7 (33,3)	1 (14,3)	8 (28,6)
kotrimoksazol	5 (23,8)	2 (28,6)	7 (25)
ciprofloksacyna	5 (23,8)	0	5 (17,9)
chloramfenikol	3 (14,3)	0	3 (10,7)
wankomycyna	0	0	0

Tabela 3. Lekooporność metycylinowrażliwych (MSSA) i metycylinoopornych (MRSA) izolatów *S. aureus* pochodzących ze stopy cukrzycowej i z jamy ustnej chorych na cukrzycę

Antybiotyk	MSSA (%) (n=20)	MRSA (%) (n=8)	Ogółem *S. aureus* (%) (n=28)
cefoksytyna	0	8 (100)	8 (28,6)
penicylina	11 (55)	8 (100)	19 (67,9)
klindamycyna	10 (50)	7 (87,5)	17 (60,7)
erytromycyna	10 (50)	6 (75)	16 (57,1)
gentamycyna	7 (35)	6 (75)	13 (46,4)
tetracyklina	2 (10)	6 (75)	8 (28,6)
kotrimoksazol	4 (20)	3 (37,5)	7 (25)
ciprofloksacyna	1 (5)	4 (50)	5 (17,9)
chloramfenikol	1 (5)	2 (25)	3 (10,7)
wankomycyna	0	0	0

DYSKUSJA

Ocenia się, że w Polsce na cukrzycę cierpi około 2,6 mln osób między 20 a 79 rokiem życia. Cukrzyca jest przewlekłą chorobą spowodowaną względnym lub bezwzględnym niedoborem insuliny (1). Źle wyrównana cukrzyca prowadzi do rozwoju powikłań będących następstwem uszkadzającego działania wysokiego stężenia cukru we krwi. Za jedno z najczęstszych i najpoważniejszych powikłań uważa się zespół stopy cukrzycowej (DFU – diabetic foot ulcer), występujący u około 15% chorych na cukrzycę (20). Jest on spowodowany występowaniem neuropatii, miażdżycy oraz zaburzeń immunologicznych, prowadzących do upośledzonej reakcji organizmu na czynniki zakaźne. Powolny prze-

pływ krwi w dystalnych częściach kończyn dolnych powoduje powstawanie mikrozatorów ograniczających ukrwienie (15). Ponadto dochodzi do polineuropatii spowodowanej hiperglikemią, która wywołuje przewlekły stan zapalny neuronów, zaburzając prawidłowe przewodzenie (10). Hiperglikemia przyczynia się do dysfunkcji neutrofili i makrofagów, zaburzając fagocytozę, upośledzając ich chemotaksję oraz immunoadherencję (16). Zwiększone stężenie glukozy w przestrzeni pozakomórkowej predysponuje do współistniejących zakażeń bakteryjnych. W rezultacie pojawiają się trudno gojące się owrzodzenia stóp. Powierzchowne zakażenie stopy może szybko rozprzestrzeniać się, obejmując tkankę podskórną, mięśnie, stawy, a nawet kości (6, 20).

Do najczęstszych patogenów wywołujących ostre infekcje stóp u chorych na cukrzycę należy *S. aureus* (17). Również w naszym badaniu był to najczęściej izolowany patogen zarówno z owrzodzeń stopy jaki i z jamy ustnej badanych chorych. Od ponad połowy z nich wyizolowano gronkowca z owrzodzeń stopy, a u mniej niż jednej piątej odnotowano kolonizację jamy ustnej przez *S. aureus*. Przy czym należy podkreślić, że jedynie u 3 spośród 40 pacjentów *S. aureus* występował równocześnie w obu miejscach. Wydaje się więc, że jama ustna nie stanowi istotnego rezerwuaru *S. aureus* w kolonizacji ran stopy cukrzycowej. Zgodnie z wiedzą autorów dotąd takich badań nie prowadzono, a prace dotyczące korelacji pomiędzy występowaniem *S. aureus* w stopie a kolonizacją przedsionka nosa, również nie wskazywały na endogenne pochodzenie szczepów gronkowców izolowanych z owrzodzeń stóp (2). W badaniach z Tajwanu stwierdzono, że kolonizacja przedsionka nosa była na podobnym poziomie zarówno u badanych ze zespołem stopy jaki i bez tego powikłania (13).

Leczenie infekcji gronkowcowej w DFU zazwyczaj obejmuje zarówno interwencje chirurgiczne jak również długotrwałą antybiotykoterapię. Nawet przy odpowiednim schemacie leczenia celowanego pacjenci cierpiący na gronkowcowe infekcje stopy cukrzycowej często doświadczają poważnych, zagrażających życiu powikłań, takich jak posocznica, zakrzepica żył głębokich czy patologiczne złamania (20). Z tego powodu często konieczne jest przedłużone leczenie przeciwbakteryjne. Długotrwałe i powtarzające się antybiotykoterapie wiążą się z wysokim ryzkiem selekcji szczepów opornych (17). Największe zagrożenie dotyczy szczepów gronkowców opornych na metycylinę, które obok oporności na antybiotyki β-laktamowe są niewrażliwe na szereg powszechnie stosowanych antybiotyków z innych grup, takich jak makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy czy fluorochinolony. Wśród wyizolowanych przez nas *S. aureus* odsetek izolatów MRSA był stosunkowo wysoki i wynosił 17,5%, przy czym 7/8 szczepów pochodziło z owrzodzenia stopy, a tylko jeden z jamy ustnej (2,5%). Określony w pracy odsetek MRSA był notowany również w innych krajach (2, 13). Występowanie MRSA w jamie ustnej było zdecydowanie rzadsze niż w ranie stopy i podobnie jak w innych publikacjach nie przekraczało kilku procent (9, 11, 12). Nie jest zaskakujące, że gronkowce MRSA wykazywały wielokrotnie wyższe odsetki oporności niż MSSA, co dotyczyło przede wszystkim ciprofloksacyny, chloramfenikolu i tetracykliny. Lekooporność wyizolowanych *S. aureus* zarówno z jamy ustnej jak i z owrzodzenia stopy obejmowała najczęściej penicyliny, linkozamidy, makrolidy, aminoglikozyd i była zbliżona do oporności notowanej obecnie wśród gronkowców izolowanych z innych zakażeń (7). Szczepy z jamy ustnej charakteryzowała mniejsza oporność na antybiotyki niż szczepy z owrzodzeń stopy, co najprawdopodobniej miało związek z ich mniejszą ekspozycją na antybiotyki.

WNIOSKI

Pomimo, że zakażenie stopy cukrzycowej endogennymi szczepami *S. aureus,* kolonizującymi jamę ustną chorych na cukrzycę wydaje się mało prawdopodobne, to z pewnością istotne jest monitorowanie nosicielstwa *S. aureus* w jamie ustnej chorych na cukrzycę oraz ich oporności na antybiotyki.

PIŚMIENNICTWO

1. *Blair M.* Diabetes Mellitus Review. Urol Nurs. 2016; 36: 27–36.
2. *Haleem A, Schultz JS, Heilmann KP, Dohrn CL* i inni. Concordance of nasal and diabetic foot ulcer staphylococcal colonization. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 79: 85-9.
3. *Hoseini A, Mirzapour A, Bijani A, Shirzad A*. Salivary flow rate and xerostomia in patients with type I and II diabetes mellitus. Electron Physician 2017; 9: 5244-9.
4. http://www.korld.edu.pl/pdf/EUCAST
5. *Jia G, Zhi A, Lai PFH, Wang G i inni.* The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. Br Dent J. 2018; 224: 447-55.
6. *Jneid J, Lavigne JP, La Scola B, Cassir N.* The diabetic foot microbiota: A review. Hum Microbiome J 2017; 5–6: 1–6.
7. *Katkowska M, Garbacz K, Kopala W, Schubert J* i inni. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from recurrent tonsillitis in children. APMIS. 2020; 128: 211-9.
8. *Kearney A, Kinnevey P, Shore A, Earls M* i inni. The oral cavity revealed as a significant reservoir of *Staphylococcus aureus* in an acute hospital by extensive patient, healthcare worker and environmental sampling. J Hosp Infect. 2020; 20: 30103-1.
9. *Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L* i inni. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. Arch Oral Biol 2015; 60: 1410–5.
10. *Kumar P, Raman T, Swain MM, Mishra R* i inni. Hyperglycemia-induced oxidative-nitrosative stress induces inflammation and neurodegeneration via augmented tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2) activation in neuronal Cells. Mol Neurobiol 2017; 54: 238-54.
11. *Kwapisz E, Garbacz K, Wierzbowska M, Krause M.* Występowanie metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* u dorosłych pacjentów z objawami infekcji jamy ustnej. Med Dośw Mikrobiol 2017; 69: 209-14.
12. *Lewis N, Parmar N, Hussain Z* i inni. Colonisation of dentures by *Staphylococcus aureus* and MRSA in out-patient and in-patient populations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 1823–6.
13. *Lin SY, Lin NY, Huang YY, Hsieh CC* i inni. Methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection among patients with diabetic foot ulcer. J Microbiol Immunol Infect. 2020; 53: 292-9.
14. *McCormack MG, Smith AJ, Akram AN* i inni. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? Am J Infect Control 2015; 43,1: 35-7.

15. *Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I.* Risk factors for venous and arterial thrombosis. Blood Transfus 2011; 9: 120-38.
16. *Robertson HD, Polk HCJ.* The mechanism of infection in patients with diabetes mellitus: a review of leukocyte malfunction. Surgery 1974; 75: 123-8.
17. *Shanmugam PMJ & Susan SL*. The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains. J Clin Diagn Res. 2013; 7: 441-5.
18. *Small H*, *Elliott TSJ*, *Casey AL* i inni. The oral cavity - An overlooked site for MRSA screening and subsequent decolonisation therapy? J Infect 2007; 55: 378-83.
19. *Smith AJ*, *Robertson D*, *Tang MK* i inni. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J 2003; 195: 701–3.
20. *Uçkay I, Gariani K, Pataky Z, Lipsky BA*. Diabetic foot infections: state-of-the-art. Diabetes Obes Metab. 2014; 16: 305-16.
21. *Verma, D, Garg PK, Dubey AK.* Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol 2018; 200: 525-40.

Otrzymano: 28 VIII 2020
Adres Autora: 80-204 Gdańsk, ul. Dębowa 25, Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny