

Zaangażowanie Autorów

A – Przygotowanie projektu badawczego
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Opracowanie piśmiennictwa
G – Pozyskanie funduszy

Author's Contribution

A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Grażyna Raczyńska-Witońska^{1(A,D,E,G)}, Dariusz Witoński^{2(B,E,F)}

¹ Zakład Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic, Katedra Biologii i Genetyki, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Oddział Kliniczny Chirurgii Rekonstrukcyjnej i Artroskopowej Stawu Kolanowego, II Katedra Ortopedii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Grzyby i bakterie jako czynniki patogenne w procesie gojenia się ran u chorych po zabiegach ortopedycznych

Fungi and bacteria as pathogenic factors in the healing of wounds in patients recovering from orthopedic surgery

Słowa kluczowe: *Candida, Candida albicans, Staphylococcus sp., chirurgia ortopedyczna*

Key words: *Candida, Candida albicans, Staphylococcus sp., orthopaedic surgery*

STRESZCZENIE

Wstęp. Zaburzenie prawidłowości gojenia rany operacyjnej opóźnia lub ogranicza wdrożenie leczenia usprawniającego. Próbuąc określić przyczynę utrudnionego gojenia poszukuje się zwykle bakterii, nie wykonując jednoczesnego badania mikologicznego. Obserwowane odczynowe miejscowe lub ogólne na stosowane zabiegi fizykoterapeutyczne mogą być wynikiem nie tylko zaburzeń takich jak obniżony poziom białek osocza, enzymów, niedobór witamin, odwodnienie, zmniejszenie przepływu i dyfuzji tlenu w ranie, dużych dawek steroidów, ale także wtórnego zakażenia bakteriami oraz grzybami i w następstwie pogorszenia warunków gojenia. Nie bez znaczenia wydaje się być obecność tych mikroorganizmów w otaczającej ranę skórze lub innych ontocenozach, co w sposób znaczący może upośledzać prawidłowy przebieg procesu usprawniania. Poszukiwanie bakterii i grzybów u pacjentów z trudno gojącymi się ranami, usprawnianych po zabiegach narządu ruchu jest przedmiotem badań w prezentowanej pracy.

Material i metody. Badaniami bakteriologicznymi i mikologicznymi objęto 24 osoby z trudno gojącymi się ranami po zabiegach ortopedycznych (alloplastyka stawu biodrowego i kolanowego, otwarte repozycje złamań, wydłużanie kończyn dolnych). Do oceny pobierano materiał z rany, otaczającej skóry oraz jamy ustnej. Do analizy bakteriologicznej wykorzystano wyniki uzyskane z rutynowo przeprowadzonych badań laboratoryjnych. Różnicowanie szczepów, grzybów wykonano w oparciu o cechy morfologiczne i biochemiczne. W analizowanej grupie pacjentów poszukiwano wieloogniskowych zarażeń grzybami.

Wyniki. Bakterie wykryto u 10 (41,6%) leczonych. U 7 (29,1%) osób występowały one w ontocenozie rany jednocześnie z grzybami. Grzyby wykryto u 19 (79,2%) pacjentów w co najmniej jednej ontocenozie. Wśród wszystkich zbadanych osób grzyby występowały: w ranie u 9 (37,5%) pacjentów, w otaczającej skórze u 10 (41,6%), w jamie ustnej u 17 (70,8%) osób. Zwraca uwagę, iż jednoczesne występowanie w dwu lub trzech ontocenozach (89,4%) było częstsze niż w jednej (10,6%); nie obserwowano wystąpienia grzybów tylko w samej ranie.

Wnioski. W przewlekającym się procesie gojenia rany operacyjnej, w ontocenozie ran należy uwzględnić współistniejące zarażenie bakteriami i grzybami. W ontocenozie rany spośród bakterii najczęściej stwierdzano *Staphylococcus aureus*, natomiast najczęstszym gatunkiem grzybów był *Candida albicans*. W 3 przypadkach grzyby występują w dwu lub trzech ogniskach, co może sprzyjać transmisji wewnątrzustrojowej, utrudniać leczenie i być przyczyną opóźnienia ćwiczeń usprawniających.

SUMMARY

Background. In searching for the cause of delayed surgical wound healing in orthopedic patients, we often overlook mycological tests. The goal of our study was to search for bacteria and fungi in patients with delayed wound healing following orthopedic surgery, especially targeting multifocal fungus infections.

Material and methods. Mycological investigations were carried out in 24 patients with delayed wound healing after hip and knee arthroplasty, open fracture repositioning, or lengthening of lower extremities. Material was collected from the wound, surrounding skin and oral cavity. The bacterial strains and fungi were differentiated morphologically and biochemically.

Results. Bacteria were detected in 10 of the 24 patients. In 7 patients, they occurred in the wound ontocenosis together with fungi. Fungi were found in 19 patients in at least one ontocenosis. In the entire sample studied, fungi were isolated from the wound in 9 patients, from the skin surrounding the wound in 10 patients, and from the oral cavity in 17 patients. It should be emphasized that the occurrence of fungi was observed simultaneously in two or three ontocenoses more frequently than in one (89.4% vs. 10.6%). Of all the bacteria found in the wound ontocenosis, the most frequent was *Staphylococcus aureus*, whereas in fungi the most common species was *Candida albicans*.

Conclusions. In the wound ontocenosis of orthopedic patients with delayed wound healing, fungal infection concomitant with bacterial should be taken under consideration. The presence of fungi simultaneously in two or three ontocenoses can influence endogenic expansion and thus impede progress in rehabilitation.

Liczba słów/Word count: 2317

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 0

Piśmiennictwo/References: 17

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr Grażyna Raczyńska-Witońska, Zakład Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic, Katedra Biologii i Genetyki, Uniwersytet Medyczny
90-647 Łódź, Pl. Hallera 1, tel./fax: (0-42) 63-93-370, e-mail: witond@go.com

Otrzymano / Received 13.02.2006 r.
Zaakceptowano / Accepted 21.11.2006 r.

WSTĘP

Usprawnianie chorych po operacjach narządu ruchu jest, poza techniką operacyjną, jednym z decydujących elementów wpływających bezpośrednio na wynik leczenia. Pojawiające się zmiany biochemiczne i enzymatyczne w operowanym stawie wpływają na jego czynność biomechaniczną, powodując zmiany w funkcji błony maziowej oraz chrząstki stawowej, nie pozostają bez wpływu na końcowy wynik leczenia. Wcześniej rozpoczęte ćwiczenia usprawniające oraz zabiegi fizykoterapeutyczne warunkują podjęcie czynności, a w efekcie wzmacnienie siły mięśniowej; stymulują przepływ w naczyniach żylnych i limfatycznych, prowadząc do zmniejszenia obrzęku oraz wpływają na zakres ruchu oraz poprawę „świadomości stawu („joint-position sense”) okolicy operowanej. Zaburzenie prawidłowości gojenia rany operacyjnej opóźnia lub ogranicza wdrożenie leczenia usprawniającego. Próbując określić źródło utrudnionego gojenia skupiamy się głównie na poszukiwaniu bakterii [1,2]. Obserwowane odczyny miejscowe lub ogólne na stosowane zabiegi fizykoterapeutyczne mogą być wynikiem nie tylko zaburzeń, takich jak obniżony poziom białek osocza, enzymów, niedobór witamin, odwodnienie, zmniejszenie prężności i dyfuzji tlenu w ranie, dużych dawek sterydów, ale także wtórnego zakażenia grzybami i w następstwie pogorszenia warunków gojenia [3,4]. Nie bez znaczenia wydaje się być obecność bakterii i grzybów w otaczającej ranę skórze lub innych ontocenozach, która w sposób znaczący może upośledzać prawidłowy przebieg procesu usprawniania. U pacjentów oddziałów zabiegowych czynnikiem potencjalnie patogennym mogą być drobnoustroje wchodzące w skład ontocenozy skóry i błon śluzowych [5,6]. U chorych obserwuje się najczęściej nie gojące się owrzodzenia o różnym stopniu rozległości, ropnie lub przetoki [7,8].

Celem pracy jest ocena prevalencji gatunków bakterii i szczepów grzybów u pacjentów z trudno gojącymi się ranami, usprawnianych po operacjach rekonstrukcyjnych narządu ruchu.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto grupę 24 chorych, w tym 17 mężczyzn i 7 kobiet w wieku 20-65 lat po różnych zabiegach ortopedycznych (alloplastyka stawu biodrowego i kolanowego, otwarte repozycje złamań, wydłużanie kończyn dolnych). Wszyscy chorzy zostali poinformowani o celu i metodyce badań oraz wyrazili zgodę na uczestniczenie w poszczególnych etapach cyklu badawczego.

W trakcie leczenia ortopedyczno-rehabilitacyjnego u pacjentów wystąpiły powikłania gojenia się ran. Podczas pobytu w oddziale pacjenci mieli rutynowo wykonane posiewy treści pochodzącej z ran w kierunku obecności bakterii z potwierdzonym antybiogramem; jednak mimo ukierunkowanego leczenia przeciwbakteryjnego miejscowego i ogólnego, rany bardzo powoli, bądź w ogóle nie ziarninowały.

Do badań bakteriologicznych i mikologicznych pobierano materiał w postaci wymazów z ran pooperacyjnych, powierzchni otaczającej skóry oraz błony śluzowej jamy ustnej (wymaz/popłuczyny).

Analizę bakteriologiczną przeprowadzono w oparciu o wyniki rutynowo wykonywanych badań laboratoryjnych. W celu wykrycia grzybów, pobrany materiał posiewano na agarze i bulionie Sabourauda. Jamę ustną polecano przepłukać jałowym bulionem Sabourauda. Posiewy inkubowano w temperaturze 27°C i 37°C przez 24 godziny, a następnie pozostawiano w temperaturze pokojowej. Po trzech dniach ze wszystkich wyrosłych kolonii sporządzano preparaty bezpośrednie w 0,9% roztworze NaCl i poszukiwano pod mikroskopem elementów grzyba, a w przypadku ich stwierdzenia zakładano hodowlę na agarze Sabourauda. Kolonie grzybów przesiewano na świeże podłoże celem uzyskania po kilku pasażach czystych bezbakteryjnych szczepów (hodowle akseniczne). Różnicując szczepy grzybów oceniano: 1. makroskopowo cechy morfologiczne wyrosłych kolonii, a mianowicie barwę, połysk, kształt, brzegi, strukturę, stosunek do powierzchni agaru – wrastanie kolonii lub jego brak, a także ewentualną zmianę barwy agaru pod wpływem wzrostu określonego szczepu grzyba. 2. preparaty mikroskopowe bezpośrednie ze zwróceniem uwagi na wielkość komórek wegetatywnych i zarodników, obecność strzępek i pseudostrzępek 3. mikrohodowle zakładane z każdego wyodrębnionego szczepu, które oceniano w preparatach mikroskopowych nie barwionych lub barwionych fuksyną kwaśną. Dla grzybów zakwalifikowanych wstępnie do rodziny Cryptococcaceae, wykonano zymogramy oraz auksanogramy cukrowe i azotowe za pomocą testów API 20C i API 20C AUX (bioMérieux) [9,10].

Wykorzystano podział zarażeń grzybami według klasyfikacji Kurnatowskiej, uwzględniającej: 1. zarażenia jednoogniskowe, obejmujące tylko jeden narząd np. jamę ustną, przewód pokarmowy, skórę, 2. wieloogniskowe – dotyczące dwu lub więcej narządów – przebiegające w dwóch postaciach, a mianowicie: bez fungemii, gdy grzyb zajmuje powierzchnię błon śluzowych różnych narządów lub skórę, lecz nie przekracza ich bariery i z fungemią, gdy zarodniki grzybów krążą we krwi lub chłonce, przemieszczając się do narządów wewnętrznych i ośrodkowego układu nerwowego [10].

WYNIKI

Spośród 24 zbadanych pacjentów bakterie wykryto u 10 (41,6%) w różnych pobranych materiałach. U 7 (29,1%) spośród 24 posiewów występowały one w ontocenoze rany jednocześnie z grzybami. Izolowano następujące gatunki bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Acineobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*. U 5 (20,8%) spośród 24 posiewów bakterie występowały jednocześnie w jamie ustnej i ranie, u 3 (12,5%) w jamie ustnej, ranie i otaczającej skórze, u 2 (8,3%) w samej ranie.

Spośród 24 zbadanych pacjentów u 19 (79,2%) grzyby wykryto w różnych pobranych materiałach. Ogółem wykonano 72 posiewy, z których wyizolowano 36 szczepów grzybów. Grzyby wykazano w 17 (70,8%) spośród 24 posiewów z treści jamy ustnej, w 10 (41,6%) spośród 24 posiewów z wymazów otaczającej skóry oraz w 9 (37,5%) spośród 24 posiewów materiału pochodzącego z rany. Zarażenia wielogniskowe stwierdzono u 89,4% chorych. U 7 pacjentów grzyby wykazano we wszystkich trzech ontocenozach, u 10 zaś w dwóch ogniskach. Spośród nich u 5 grzyby wykryto w ranie i w jamie ustnej, u 3 w ranie i otaczającej skórze. U pozostałych 2 osób zarażenia dwuogniskowe dotyczyły jamy ustnej i skóry. Zarażenia jednoogniskowe wykazano u 10,6% pacjentów; grzyby stwierdzono wyłącznie w jamie ustnej. Wyodrębnione szczepy grzybów zaliczono do 3 rodzajów: *Candida*, *Aspergillus* i *Saccharomyces*. Szczepy z rodzaju *Candida* zakwalifikowano do 6 gatunków, a mianowicie *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*. Spośród grzybów z rodzaju *Candida* najczęściej występowały szczepy z gatunku *C. albicans* (64%). Rodzaj *Aspergillus* był reprezentowany przez gatunek *A. niger* natomiast *Saccharomyces* przez *S. cerevisiae*.

DYSKUSJA

Środowisko naturalne, jak również ustrój człowieka jest siedliskiem wielu mikroorganizmów. Opisano wiele gatunków bakterii i grzybów ważnych w etiopatogenezie chorób narządowych. W dostępnym piśmiennictwie jako przyczynę utrudnionego gojenia się ran, większość autorów upatruje obecność bakterii w tej ontocenoze, nieliczni wskazują na obecność także grzybów, zwłaszcza z rodzaju *Candida* [11,12,13,14,15]. Najczęściej opisywanymi bakteriami wyizolowanymi z trudno gojących się ran były: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, *Clostridium* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus* sp, *Staphylococcus epidermidis*. W przeprowadzonych

badaniach własnych obecność grzybów w ranach stwierdzono u 37,5 % badanych. Wszystkie szczepy wyodrębnione z tego materiału należały do rodzaju *Candida*, najczęściej do gatunku *C. albicans*. U 29,1% jednocześnie z grzybami występowały bakterie; najczęściej izolowaną bakterią był *Staphylococcus aureus*.

Zaprezentowane dane sugerują, że w przypadku trudno gojących się ran należy brać pod uwagę – obok stwierdzanych bakterii – także występowanie grzybów jako jedną z przyczyn powikłania gojenia. Zwykle drobnoustroje te występują w dwu lub trzech ogniskach, co może sprzyjać transmisji wewnątrzustrojowej [6]. Współwystępowanie z bakteriami może utrudnić leczenie i opóźnić wdrożenie ćwiczeń usprawniających.

W dostępnym piśmiennictwie, poza doniesieniami własnymi, nie znaleźliśmy informacji o jednoczesnym występowaniu bakterii i grzybów w ranie, otaczającej skórze i jamie ustnej u pacjentów z trudno gojącymi się ranami [6]. Przeprowadzone przez nas badania wykazały występowanie bakterii i grzybów w materiale pochodzącym z rany, z jednoczesnym występowaniem w jamie ustnej bądź w okolicy otaczającej skóry. Poza najczęściej rozpoznawanym gatunkiem *C. albicans* stwierdzano także inne gatunki z rodzaju *Candida*, a mianowicie *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*. Jest to prawdopodobnie związane z selekcją szczepów *C. albicans*, bardziej wrażliwych na niektóre leki przeciwgrzybicze, jak również nie bez znaczenia wydaje się być przedłużony okres hospitalizacji [5]. Można przypuszczać jednak, że najważniejszym mechanizmem zarażenia jest transmisja endogenna bakterii i grzyba w obrębie organizmu pacjenta, a za najczęstsze siedlisko uważa się przewód pokarmowy [6,16,17].

WNIOSKI

1. U pacjentów po zabiegach ortopedycznych z przewlekającym się procesem gojenia rany operacyjnej, w ontocenoze ran należy uwzględnić współistniejące zarażenie bakteriami i grzybami.
2. W ontocenoze rany spośród bakterii najczęściej stwierdzano *Staphylococcus aureus*, natomiast najczęstszym gatunkiem grzybów był *Candida albicans*.
3. Czasami grzyby występują w dwu lub trzech ogniskach, co może sprzyjać transmisji wewnątrzustrojowej, utrudniać leczenie i być przyczyną opóźnienia ćwiczeń usprawniających.

PIŚMIENNICTWO

1. Moon MS, Moon JL. Management of osteomyelitis. *J Orthop Surg* 2000; 8 (2): VII-X

2. Bowler PG, Duerdan BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 (2): 244-69
3. Hennessy MJ. Infection of a total knee arthroplasty by *Candida parapsilosis*. A case report of successful treatment by joint reimplantation with a literature review. *Am J Knee Surg* 1996; 9 (3): 133-136
4. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control* 1999; 27 (2): 97-132
5. Giandoni MB, Grabski WJ. Cutaneous candidiasis as a cause of delayed surgical wound healing. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 881-4
6. Raczyńska-Witońska G, Witoński D, Kwaśniewska J. Występowanie zarażeń grzybiczych u pacjentów po zabiegach ortopedycznych, z przewlekłe gojącymi się ranami. *Kwart Ortop* 2004; 3: 187-90
7. Edlestein H, Cabe R. *Candida albicans* septic arthritis and osteomyelitis of the sternoclavicular joint in a patient with human immunodeficiency virus infection. *J Rheumatol* 1991; 18: 110-14
8. Meier JL. Mycobacterial and fungal infection of bone and joints. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 408-14
9. Kurnatowska A, Białasiewicz D, Głowacka A. Różnicowanie wewnątrzgatunkowe *Candida* jako ważny składnik analizy inwazji rodzinnych. Materiały naukowe I Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Olsztyn, 1987
10. Kurnatowska A. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Łódź: Promedi; 1995
11. Simpson MB Jr, Merz WG, Kurlinski JP, Salomon MH. Opportunistic mycotic osteomyelitis: bone infection due to *Aspergillus* and *Candida* species. *Medicine* 1977; 56: 475-82
12. Gaston G, Ogden J. *Candida glabrata* periprosthetic infection: a case report and literature review. *J Arthroplast* 2004; 19 (7): 927-30
13. Arnold HJ, Dini A. *Candida albicans* arthritis in health adult. *South Med J* 1981; 74: 84-5
14. Sorensen TS, Sorensen AI, Bremmelgaard A. Orthopedic wound infections. 182 cases after 8913 operations during an 8-year survey. *Acta Orthop Scand* 1997; 68: 466-69
15. Vindenes H, Bjerknes R. Microbial colonization of large wounds. *Burns* 1995; 21: 575-79
16. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 89-94
17. Stéphan F, Bah MS, Desterke C i wsp. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1477-83

Praca finansowana w ramach funduszu prac własnych nr 502-12-416 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi