

## تأثير عوامل فوعة المكورات العنقوديات الذهبية في الجروح المزمنة المعقدة وتقراحت القدم السكرية، وتطوير تدابير العلاج

د. فهميم عبد العزيز\*

(تاريخ الإيداع 2023 /4/4 - تاريخ النشر 2023 /6 /12)

### □ ملخص □

تعد الجروح المزمنة والإصابة بتقراحت القدم من المضاعفات الشائعة، والتي تكون غالباً شديدة ومكلفة عندما ترتبط بمرض السكري. وتكون أخماج القدم السكرية (DFI) Diabetic foot infections متعددة الإصابة بالجراثيم، والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* هي الأكثر شيوعاً لارتباطها بعزل العامل الممرض .

تمتلك العنقودية الذهبية *S. aureus* العديد من عوامل الفوعة، وتنتج أيضاً العديد من الذيفانات خلال الخمج، حيث تم تحديد قدرة المكورات العنقودية الذهبية على إحداث DFI من خلال العديد من عوامل الفوعة، ومن بينها الذيفانات المفرزة التي تلعب دوراً مهماً من خلال (المشاركة في الاستعمار، الثبات، التهرب من الجهاز المناعي والغزو والانتشار)، ويمكن لهذه الذيفانات الحالة للخلايا أن تتلف أغشية الخلايا المضيفة مما يؤدي إلى تحللها.

يرتبط وجود بعض ذراري *S. aureus* ذات القدرة الممرضة العالية في الجروح مع تقراحت القدم السكرية (DFU) diabetic foot ulcer وبترا الأطراف، لذلك فإن فهم دور الذيفانات وتأثيرها الحقيقي في مضاعفات (DFU) من الدراسات الواعدة للتنبؤ بسلوك المكورات العنقودية الذهبية في الجروح المزمنة.

يعد تحديد العامل المسبب المسؤول عن خمج القدم السكرية والبدء المبكر في العلاج المناسب بالصادات الحيوية أمراً حيوياً للسيطرة والوقاية من مضاعفات قرح القدم السكرية، وبناءً على الدراسات الجرثومية لقرحة القدم السكرية تكون العنقودية الذهبية *S. aureus* بين العزلات المرضية السائدة. وبالتالي يمكن بدء العلاج أو مواصلته أو تغييره، لتقليل معدل المراضة لدى المرضى الذين يعانون من قرح القدم السكرية. تظهر الببتيدات المضادة للميكروبات (AMPs) Antimicrobial peptides، التي تعرف بـ nisin، كعلاجات جديدة محتملة لتدبير DFIs.

**كلمات مفتاحية:** المكورات العنقودية الذهبية، الفوعة، الجروح المزمنة، القدم السكرية

## Effect of *Staphylococcus aureus* virulence factors on chronic wound complications and diabetic foot ulcers, development of treatment measures

Dr. Faheem Abdel Aziz\*

(Received 4/4/2023. Accepted 12/6/2023)

### □ ABSTRACT □

Chronic wounds and foot ulcers are a common complication, which is often severe and costly when associated with diabetes. Diabetic foot infections (DFI) are multi-bacterial and *Staphylococcus aureus* is the most common one due to its association with the isolation of the pathogen.

*S. aureus* possesses many virulence factors and also produces several toxins during infection. The ability of *S. aureus* to induce DFI is determined by several virulence factors, among which secreted toxins play an important role (co-colonization, persistence, evasion of the immune system, invasion and proliferation). These cytolytic toxins can damage cell membranes. host cells, which leads to their lysis.

The presence of some strains of *S. aureus* with high pathogenicity in wounds is associated with diabetic foot ulcers (DFU) and amputations. Therefore, understanding the role of toxins and their real effect in complications of (DFU) is one of the promising studies to predict the behavior of *Staphylococcus aureus* in chronic wounds.

Identification of the causative agent responsible for diabetic foot infection and early initiation of appropriate antibiotic treatment is vital to control and prevent complications of diabetic foot ulcers. Based on bacteriological studies of diabetic foot ulcers, *S. aureus* is among the predominant disease isolates. Thus, treatment can be started, continued, or changed, to reduce morbidity in patients with diabetic foot ulcers. Antimicrobial peptides (AMPs), known as nisin, are emerging as potential new therapies for the management of DFIs.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, virulence, chronic wounds, diabetic foot ulcers

---

\*Professor: Laboratory Medicine Department - Faculty of Medicine - Tartous University

## أهمية وأهداف الدراسة

يتزايد معدل انتشار مرض السكري، ويمثل بذلك مشكلة صحية عامة رئيسية وعبء اجتماعي واقتصادي على الخدمات الصحية الوطنية في مختلف دول العالم، والمضاعفات المرتبطة به آخذة في الازدياد، ومضاعفات أمراض الأوعية الدموية الطرفية، وقرحة القدم السكرية هي الأكثر شيوعاً. وتتعد عدوى القدم السكرية بالمكورات العنقودية الذهبية، أحد أهم الأمراض الرئيسية المرتبطة بالمستشفيات والتي تساهم بشكل كبير في التهابات الجروح، والعظم والنقي في القدم السكري، ويمكن أن تسبب التهابات العظام المزمنة والمتكررة، وهذا ما يتطلب دراسة العوامل المرتبطة بالفوعة والقدرة على الأمراض، وتعقيدات بنية العنقوديات الذهبية ذات السمات المميزة في عدوى القدم السكرية. والبحث عن مستجدات الأساليب والتدابير العلاجية الفعالة والأمنة المطبقة في سريبات القدم السكرية.

### مقدمة

تعد الالتهابات البكتيرية الحادة للجلد والتراكيب الجلدية Acute bacterial skin and skin structures infections (ABSSSIs) من الأسباب الرئيسية للمراضة والوفيات في المرضى الذين يعانون من داء السكري [1]. وتشمل التهابات الجلد لدى مرضى السكري مجموعة واسعة غير متجانسة من الحالات التي تتراوح من التهاب النسيج الخلوي إلى التهابات أكثر تعقيداً، مثل التهاب النسيج الخلوي العميق، التهابات الأنسجة والتهابات القدم السكرية (DFIs) diabetic foot infections [2].

حدثت خلال العقود الماضية، حدثت زيادة كبيرة في انتشار المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA)، وتم اكتشافها بين مرضى السكري في المستشفيات مع التهابات الجلد [3]. تقرحات القدم شائعة في مرضى السكري، ويتراوح انتشارها بين 15-20% [4]، وتعد الإصابة بهذه القرحة من المضاعفات المتكررة بنسبة 40-80%، وتمثل سبباً رئيسياً للمراضة والوفاة [5]. ومن الحالات الأكثر شيوعاً لبتن الطرفين السفليين [6]. خمج القدم السكرية معقدة للغاية، ويرتبط انتشارها وشدتها بالفيزيولوجيا المرضية وبالمضاعفات المتعلقة بالمصاب (اعتلال المناعة، اعتلال الأعصاب، اعتلال الشرايين)، والعوامل المتعلقة بمسببات الأمراض (الجراثيم والفوعة ومقاومة الصادات الحيوية) [7].

تم تحديد قدرة المكورات العنقودية الذهبية على إحداث DFI من خلال العديد من عوامل الفوعة، من بينها السموم المفرزة التي تلعب دوراً مهماً في المشاركة في الاستعمار، والثبات والمثابرة، والتهرب من الجهاز المناعي والانتشار [8]. تشمل هذه السموم الذيفان المقشر Exfoliative Toxins والذيفان المثبط لتمايز خلايا البشرة Leukotoxins، وذيفان متلازمة الصدمة السمية -1 Toxic Shock-Syndrome Toxin-1 (TSST-1)، إذ يمكن لهذه الذيفانات الحالة للخلايا أن تدمر أغشية الخلايا المضيفة مما يؤدي إلى تحللها [9]. والذري غير المفرزة للذيفانات، وغالباً ما توجد الذري المفرزة للذيفانات في حالات العدوى ذات الدرجة الشديدة والتأثير الجهازي، في حين يبدو أن الذري غير المفرزة للذيفان تظل موضعية في الهياكل العميقة والعظام التي تتطوي على التهاب العظم والنقي في القدم السكري.

لا تزال المكورات العنقودية الذهبية Staphylococcus aureus هي الأكثر شيوعاً بنسبة 79.0%. وتشكل المكورات المقاومة للمتسلين MRSA حوالي 30,2% من مرضى قرحة القدم السكرية [10].

### خصائص المكورات العنقودية الذهبية

جراثيم موجبة الجرام، بشكل مكور، وتميل إلى أن تكون مرتبة في مجموعات تشبه عنقود العنب. يمكن أن تنمو في ظروف هوائية أو لا هوائية اختيارية، وبدرجات حرارة تتراوح بين 18-40 درجة مئوية، وفي بيئات تحوي 10% من الملح، وغالبًا ما تكون المستعمرات ذهبية أو صفراء.

في اختبارات التتميط البيوكيميائية النموذجية، تكون جميع أنواع المكورات العنقودية المسببة للأمراض إيجابية الكاتالاز، وفي اختبار المخترز الموجب يتم تمييز المكورات العنقودية الذهبية عن أنواع المكورات العنقودية الأخرى. في اختبار تخمير المانتول الإيجابي يميز بين الذهبية والبشرية S. epidermidis، وفي الحساسية للنوفوبوسين تميز العنقودية الذهبية عن العنقودية الرمامة S. saprophyticus [11].

تحمل ذراري العنقودية الذهبية المقاومة للمتسلين MRSA جين *mec gene* على الصبغي (الكروموسوم) الجرثومي، وهو أحد مكونات المنطقة الأكبر حجماً من الصبغي (الكروموسوم) SCCmec عند العنقودية الذهبية، مما يمنحها مقاومة للعديد من الصادات الحيوية اعتماداً على SCCmec [12]. يقوم الجين *mec gene* بترميز البروتين PBP-2a (البروتين الرابط البنسلين 2 أ) penicillin-binding protein 2a، وهو عبارة عن بروتين مرتبط بالبنسلين PBP، أو إنزيم أساسي لجدار الخلية الجرثومية يحفز إنتاج الببتيدوغليكان في جدار الخلية الجرثومية، ولديه تقارب أقل للارتباط بالبيبتا لاكتام (والصادات الحيوية الأخرى المشتقة من البنسلين) عند مقارنته بـ PBPs الأخرى، لذلك يستمر PBP-2A في تحفيز تخليق جدار الخلية الجرثومية في وجود العديد من الصادات الحيوية. نتيجة لذلك، يمكن أن تنمو ذراري المكورات العنقودية الذهبية التي تصنع PBP-2A بوجود العديد من الصادات الحيوية، وهذه الذراري أيضاً مقاومة للعديد منها، وتميل الذراري MRSA إلى أن تكون مقاومة للميثيسيلين والنافسيلين والأوكساسيلين والسيفالوسبورين [11,12].

### وبائيات العنقودية الذهبية Epidemiology

تم العثور على المكورات العنقودية الذهبية، بما في ذلك الذراري المقاومة للأدوية مثل (MRSA) على الجلد والأغشية المخاطية، وبشكل البشر المستودع الرئيسي لهذه الأحياء الدقيقة، إذ يستمر تواتر أخماج المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) في الانتشار في الأماكن المرتبطة بالمشافي، وتعزي الزيادة في حدوث الخمج بالمكورة العنقودية الذهبية نتيجة لجزئية التقدم في رعاية المرضى، وكذلك لقدرة العامل الممرض على التكيف مع البيئة المتغيرة، وتفرض العدوى الناجمة عن المكورات العنقودية الذهبية عبئاً كبيراً ومتزايداً على موارد الرعاية الصحية. ويتزايد القلق من ظهور خمج العنقودية MRSA في المرضى الذين ليس لديهم عوامل خطورة واضحة. تتضمن عدوى العنقودية MRSA في المجتمع معدلات مراضة ووفيات كبيرة كما هو الحال بالنسبة لأخماج MRSA في المستشفيات. تم الإبلاغ عن انتقال العنقودية MRSA المرتبطة بالمجتمع من شخص لآخر، وقد ثبت أن العديد من العوامل تنتبأ بالمرض [13].

تشير التقديرات إلى أن S. aureus تستعمر ما يصل إلى نصف البالغين، وحوالي 15% من السكان يحملونها في الفتحات التنفسية، وتميل بعض المجموعات السكانية إلى أعلى معدلات استعمار بالعنقودية الذهبية لتصل حتى 80%، مثل العاملين في مجال الرعاية الصحية، والأشخاص الذين يستخدمون الإبر بشكل منتظم (مثل مرضى السكري ومتعاطي المخدرات في الوريد (IV)، ومرضى المستشفيات، والأفراد

الذين يعانون من نقص المناعة. يمكن أن تنتقل المكورات العنقودية الذهبية من شخص لآخر عن طريق الاتصال المباشر أو عن طريق الأدوات الملوثة [14].

### الفيزيولوجيا المرضية Pathophysiology

المكورات العنقودية الذهبية هي واحدة من أكثر أسباب الأخماج الجرثومية شيوعاً في البشر، وهي من العوامل المسببة للأخماج البشرية المتعددة (تجرثم الدم، التهاب الشغاف، التهابات الجلد والأنسجة الرخوة مثل القوباء والتهاب الجريبات والدمامل والتهاب النسيج الخلوي ومتلازمة الجلد السمطي، التهاب العظم والنقي، التهاب المفاصل الإلتاني، التهابات الرئة، التهاب المعدة والأمعاء، التهاب السحايا، متلازمة الصدمة السامة، والتهابات المسالك البولية). وتبعاً للدراري المعنية وموقع الإصابة، يمكن أن تسبب هذه الجراثيم أخماجاً غازية أو أمراضاً تسمى [15].

تتضمن آليات تجنب الاستجابة المناعية للثوي، إنتاج المحفظة المضادة للبلعمة، وتعطيل أضداد الثوي، أو منع تفعيل المتممة عن طريق البروتين A، وتكوين الأغشية الحيوية، والبقاء داخل الخلايا، ومنع الانجذاب الكيميائي للخلايا البيضاء [15]. يتم ارتباط الجراثيم ببروتينات المصفوفة خارج الخلية والفيبرونيكتين في التهاب الشغاف المعدي عن طريق البروتينات المرتبطة بجدار الخلية الجرثومية مثل بروتينات ربط الفيبرينوجين وعوامل التكتل وأحماض التيكويك [16].

تعد مستضدات المكورات العنقودية الفائقة مثل ذيفان متلازمة الصدمة السمية ١ (TSST-1)، عوامل فوعة هامة في التهاب الشغاف، وتعفن الدم، متلازمة الصدمة السمية toxic shock syndrome [17].

تكشف معرفة إمرضية جراثيم الـ *S. aureus* بأنها تتكيف مع التهابات الأنسجة الرخوة والعظام، وتظل غالبية الالتهابات موضعية في القدمين، وبشكل عام تكون الأخماج الجهازية الثانوية للقدم السكرية أقل انتشاراً (حوالي 10%). وتصبح ملحوظة عند تحليل حالة الخمج، ويتعرض مرضى السكري بشكل متزايد لخطر الإصابة بالجلد وبنية الجلد المعقدة والتهابات العظام بما في ذلك التهابات تقرحات القدم السكرية (DFU) [18]. في بداية DFI يحدث الالتصاق بالمكونات السطحية (الفيبرينوجين، الفيبرونيكتين والخلايا الكيراتينية للبشرة). ويعتمد ارتباط المكورة العنقودية الذهبية بسطح القرحة على التعبير الجرثومي للعديد من البروتينات السطحية التي تتوسط التقيد بمكونات مصفوفة العظام والكولاجين [19]. وهذه العوامل السطحية التي قد تكون مهمة في التسبب في المرض تشمل، جدار الخلية الذي ينشط المتممة ويحفز إطلاق السيتوكين، والسكريد المحفظي الذي يعزز الالتصاق بأسطح الخلايا المضيفة، ومستقبلات الكولاجين والبروتين المرتبط بالفيبرونيكتين، وذيفان متلازمة الصدمة السمية العنقودية (TSST-1) والذيفانات المعوية التي لديها القدرة على قمع تمايز الخلايا البلازمية والاستجابة الضدية [19].

### المكورات العنقودية الذهبية وخرم القدم السكرية

العديد من حالات خرم القدم السكرية DFI سطحية، ومع ذلك يمكن أن تنتشر الجراثيم إلى الأنسجة تحت الجلد، بما في ذلك الأوتار والمفاصل واللفافة والعضلات والعظام. وتم تصنيف DFI حسب شدتها السريرية، إلى خفيفة وبنسبة تصل حتى 35% من الحالات، ومعتدلة تتراوح بين 30-60%، وشديدة تتراوح بين 5-25% [20].

تم اقتراح عوامل متعددة عندما لا تكون العلامات الكلاسيكية لـ DFI واضحة، وتشمل هذه تحديد الهشاشة أو تغير اللون، نسيج حبيبي، نخر، رائحة كريهة، إفرازات غير قيحية، تأخير في الشفاء. اكتشاف ارتفاع السكر غير مبرر في سكر الدم [20,21]. ومن المثير للاهتمام، لا يمكن تشخيص متلازمة الصدمة السامة ولا المظاهر السامة بوضوح في DFI. تعد المكورات العنقودية الذهبية مستعمر متكرر للإنسان وممرض متعدد الإصابات وقادر على إحداث

أحماج غازية. والانتقال من الاستعمار إلى الغزو له أهمية خاصة في قرحة القدم السكرية (DFU) diabetic foot ulcer، التي تكون من المضاعفات المتكررة والمزمنة لمرض السكري، وغالباً ما تستعمر المكورات العنقودية الذهبية جروح DFU دون التسبب في العدوى، ولكن يمكنها أيضاً غزو الأنسجة الكامنة، مما يتسبب في كثير من الأحيان في التهاب العظم والنقي في القدم السكري.

#### ذيفانات المكورات العنقودية الذهبية وخمج القدم السكرية

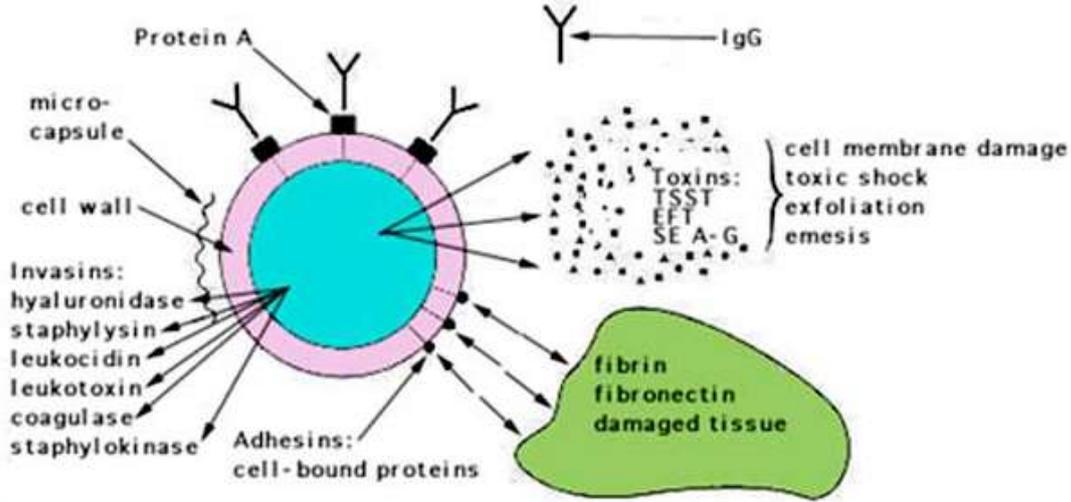
يتم تحديد قدرة المكورات العنقودية الذهبية على إحداث DFI من خلال العديد من عوامل الفوعة، من بينها الذيفانات المفزة التي تلعب دوراً مهماً في الانتشار والاستعمار، والثبات، والتهرب من جهاز المناعة. [22]. وتشمل هذه الذيفانات: الذيفانات المكونة للمسام Pore-Forming Toxins، والذيفان المقشر exfoliatin، والذيفانات الخارجية للمستضد الفائق (SAg) superantigen exotoxins والذيفانات المثبطة لتمايز خلايا البشرة (EDIN) Epidermal cell differentiation inhibitors، يمكن لهذه الذيفانات الحالة للخلايا أن تخرب أغشية الخلايا المضيفة مما يؤدي إلى تحلل الخلايا [23]. يحلل الهيموليسين Hemolysins خلايا الدم الحمراء، بينما يستهدف الـ leukotoxins خلايا الدم البيضاء، الصورة (1)

تكن أحد الجوانب الرئيسية لفوعة المكورات العنقودية الذهبية في قدرتها على استهداف غشاء الخلية المضيفة بعدد كبير من السموم والبيبتيدات المتلفة للغشاء وبذلك تلعب أدواراً محددة في مراحل وأمراض معينة عند الخمج بـ S. aureus، أو تستهدف أنواعاً معينة من الخلايا.

فالسموم المكونة للمسام (Pore-forming toxins (PFT) ومن خلال أنشطة تشكيل المسام والحيوية، لديها القدرة على تحليل الخلايا المضيفة. وهي تشمل الذيفان ألفا (α-hemolysin)، والمودولين القابل للذوبان في الفينول phenol-soluble modulins (PSMs)، والليوكوتوكسينات ثنائية المكونات bi-component leukotoxins، بما في ذلك Pantone-Valentineleukocidin (PVL)، و γ- hemolysin و leukocidin D / E [24]، وهذه الذيفانات يتم إطلاقها من قبل المكورات العنقودية الذهبية، وهي قابلة للذوبان في الماء، أهدافها خلايا الدم الحمراء والكريات البيض باستثناء العدلات. على الرغم من أن ذيفان ألفا هو الأكثر إفرازاً بشكل متكرر [25]، والذيفان المقشر هو سيرين بروتياز، له أربعة أنماط (ETA, ETB and ETD ترتبط بالعدوى البشرية، وتعمل السموم المقشرة كما "المقص الجزئي" فتسهل الغزو الجرثومي للجلد [26]، وتعد ذيفانات مودولين الفينول القابلة للذوبان من السموم الضارة بالأنسجة [27]. وتحفز السموم المعوية إنتاج السيتوكين من كل من الخلايا للمفاوية التائية والضامة، والآليات التي تعمل من خلالها السموم المعوية للمكورات العنقودية غير معروفة جيداً، ولكنها قد تشمل، تنشيط إطلاق السيتوكين، مما يؤدي في النهاية إلى موت الخلايا عن طريق موت الخلايا المبرمج وبذلك تساهم بشكل كبير بحدوث أمراض خطيرة [28].

يُعدّ ذيفان متلازمة الصدمة السامة Toxic Shock-Syndrome Toxin 1 من أشهر مستضدات العنقودية الذهبية، وقد ثبت أن له دوراً مهماً في الإصابة بالتهاب الرئوي الناخر بالمكورات العنقودية الذهبية، فقد وجد [29] أن ٨٨٪ من عزلات DFU تحمل جين SEI-X، واحتوى الباقي على جين TSST-1، وكان لدى عزلة واحدة جينات لكل من SEI-X و TSST-1، عادةً ما تحتوي سلالات المكورات العنقودية الذهبية على جين إما SEI-X أو TSST-1.

الذيفانات المثبطة لتمايز خلايا البشرة (EDINs) Epidermal Cell Differentiation Inhibitors، من عوامل الفوعة الرئيسية التي تستهدف مضيف Rho GTPases، وتشير النتائج الحديثة إلى أن هذه الذيفانات EDIN تفضل انتشار الجراثيم في الأنسجة عن طريق طريق الدم، بتحريض النفوذ عبر الخلايا الكبيرة في البطانية التي تعرف بـ microapertures [30].



الصورة (1) عوامل فوعة المكورات العنقودية الذهبية

### القرحة السكرية ومعادلة الذيفانات

تمثل قرحة القدم السكرية (DFU) Diabetic foot ulcers أحد المضاعفات الرئيسية لمرض السكري وترتبط بنوعية الحياة السيئة وزيادة المراضة والوفيات على الرغم من معايير الرعاية المتخذة. تعد ذات أمراضية معقدة تبدأ بأفات جلدية سطحية، وتتطور غالباً إلى تراكيب أنسجة أعمق حتى العظام، وتتطلب في النهاية بتر الأطراف، وبرز الميكروبيوم الجلدي لمرضى السكري على أنه يؤثر على حدوث DFU والإزمان، وقرح القدم السكرية DFU هي في الغالب متعددة الميكروبات، وقد تم اكتشاف وعزل العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* في أكثر من 95% من الحالات غير القابلة للشفاء والمصابة، وبافتراض أن عوامل فوعة العنقودية الذهبية تضر بالأنسجة وتعزز التهرب المناعي وتغير الميكروبيوم، مما يؤدي إلى استمرار الاستعمار وتأخير التئام الجروح.

في نموذج جرح متعدد الميكروبات لفأر مصاب بداء السكري مع *S. aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus pyogenes*، نتج عن استخدام AZD6389، وهو مزيج من ثلاثة أضداد أحادية النسيلة تستهدف الذيفان alpha، والذيفان leukotoxins، وعامل تراص سطح الخلية A المرتبط بالفيبرينوجين، إعادة تكوين النسيج الظهاري الكامل للجلد بعد 21 يوماً من التلقيح، وتحييد عوامل الفوعة المتعددة، ومنع AZD6389 التراص البكتيري بشكل فعال، وقتل خلايا العنقودية الذهبية، وأبطال التهرب المناعي، وساهم في إزالة العنقودية الذهبية في الآفات، وقلل أيضاً من أعداد العقديّة المقيحة والزائفة الزنجارية، مما أدى إلى إتلاف الوسطاء والعلامات الالتهابية لتشكيل المصيدة خارج الخلية بعد 14 يوماً من البدء بشكل جماعي، وبذلك تشير هذه البيانات إلى أن AZD6389 يبشر بنهج علاج مناعي ضد مضاعفات DFU [31].

في دراسة [32] تم عزل المكورات العنقودية الذهبية من 101 عينة جرح، منها 43 عينة عدوى متعددة الميكروبات، تم فقط تضمين 58 حالة أحادية العدوى الميكروبية من المكورات العنقودية الذهبية، كانت الإصابة في الأنسجة الرخوة حصرياً عند 17 مريضاً (29,3%) ولدى 41 (70,7%) إصابة بالعظام (التهاب العظم والنقي). تم الكشف عن الجين *mecA* في 35 حالة (60,3%)، والجين *pvl* في 4 حالات (6,9%)، والجين *tsst* في 3 حالات (5,2%). ولم تكتشف الجينات *etA* و *etB* في أي من الحالات. لم تكن هناك اختلافات في ملف تعريف جينات العنقودية الذهبية لعوامل الفوعة في DFIs بين أولئك الذين لديهم نسيج رخو فقط مقارنة مع أولئك المصابين بالتهاب العظم والنقي، ولكن وجد ارتفاعاً ملحوظاً في انتشار الذراري التي تحمل الجين *Pvl* المرتبطة بالأنسجة الرخوة مقارنة بالتهابات العظام، وعلاوة على ذلك، تم ملاحظة تطلب وقت أطول بكثير للشفاء بين المرضى المصابين بسلالة *MecA* للعنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA).

المكورات العنقودية الذهبية هي واحدة من الجراثيم السائدة المعزولة في أخماج الجلد والأنسجة الرخوة وهي سبب شائع لتلوث الدم، هدفت دراسة [33] إلى مقارنة معدل مقاومة العوامل المختلفة المضادة للميكروبات وأنماط الفوعة في إجمالي 200 ذرية من *S. aureus* معزولة من مرضى جرح الدم والجروح المزمنة، وتم إجراء مقايمة انتشار القرص لتخفيفات الفانكوميسين والتيكوبلانين- لدراسة قابلية العزلات للصادات تم تحديد انتشار الجينات المشفرة لستة ذيفانات معوية واثنين من الذيفانات المقشرة والذيفان Panton-Valentine leukocidin وذيفان متلازمة الصدمة السامة بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR). من بين 100 ذرية من عينات الدم التي تم اختبارها، كانت أعلى نسبة (85%، 31%، 29%) مقاومة للبنزيل بنسلين والإريثروميسين والكلينداميسين على التوالي. ومن بين 100 ذرية من عينات الجروح المزمنة، تم تأكيد أعلى نسبة (86%، 32%، 31%، 31%، 30%، و 29%) على أنها مقاومة للبنزيل بنسلين، توبراميسين، أميكاسين، نورفلوكساسين، إريثروميسين، وكلينداميسين، على التوالي، ولوحظ انتشار أعلى بكثير لمقاومة الأميكاسين والجنتاميسين والتوبراميسين في الذراري التي تم الحصول عليها من الجروح المزمنة، وتم العثور على اختلاف كبير في توزيع جينات *sea* و *sei*، إذ تم الكشف عن هذه الجينات في 6% و 46% من ذراري عينات الدم و 19% و 16% من ذراري عينات الجروح على التوالي. وبذلك تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن ذراري المكورات العنقودية الذهبية التي تم الحصول عليها من الجروح المزمنة تبدو أكثر مقاومة للصادات الحيوية وتأوي المزيد من جينات الفوعة مقارنة بالذراري المعزولة من الدم.

هدفت دراسة [34] إلى تقييم سلوك العنقودية الذهبية في نموذج مختبري *in vitro* يحاكي الظروف التي سادت عند الإصابة بـ DFI. تمت زراعة أربع ذراري من المكورات العنقودية الذهبية السريرية لمدة 16 أسبوعاً في بيئة محددة بناءً على نموذج الأغشية الحيوية المتوسطة الشبيهة بالجرح، وقيم تكيف العزلات على النحو التالي:

- نموذج *Caenorhabditis elegans* (لتقييم الفوعة)؛ عن طريق النسخ العكسي الكمي -
- تفاعل البوليميراز المتسلسل (qRT-PCR) (لتقييم التعبير عن جينات الفوعة الرئيسية)
- وباستخدام @Biofilm Ring test (لتقييم تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة) بعد 16 أسبوعاً

تكيفت المكورات العنقودية الذهبية الأربعة مع التمثيل الغذائي الخاص بها، مع تطور متغيرات لمستعمرات صغيرة وفقدان تعبير بيتا-هيموليزين  $\beta$ -hemolysin expression، اقترح نموذج النيما تودا في الجسم الحي *in vivo* انخفاضاً في الفوعة، تم تأكيده في تفاعلات qRT-PCRs، مما يُظهر انخفاضاً كبيراً في التعبير عن جينات الفوعة الرئيسية للمكورات العنقودية التي تم اختبارها، ولا سيما جينات تشفير الذايفانات، ولوحظ زيادة التعبير عن الجينات المشاركة في الالتصاق والغشاء الحيوي. وبذلك تؤكد هذه البيانات المستندة إلى نموذج المختبر *in vitro* تأثير البيئة على مفتاح تكيف العنقودية الذهبية *S. aureus* للظروف البيئية ذات الإجهاد الطويل، وبذلك تساهم هذه النتائج في استكشاف وتوصيف فوعة المكورة العنقودية الذهبية *S. aureus* في الجروح المزمنة.

### تطوير التدابير والتطبيقات العلاجية

يعد تحديد العامل المسبب المسؤول عن عدوى القدم السكرية والبدء المبكر في العلاج المناسب بالصادات الحيوية أمراً حيوياً للسيطرة والوقاية من مضاعفات قرح القدم السكرية، وبناءً على الدراسات الجرثومية لقرحة القدم السكرية تكون العنقودية الذهبية *S. aureus* بين العزلات المرضية السائدة. وبالتالي يمكن بدء العلاج أو مواصلته أو تغييره، لتقليل معدل المراضة لدى المرضى الذين يعانون من قرح القدم السكرية.

اقترحت دراسة [35] قائمة من الإجراءات التي يجب تجنبها من أجل التدبير الأمثل للمرضى المصابين بأخماج الجروح المزمنة، بحيث يجب الجمع بين إعداد سرير الجرح المناسب ومطهرات الجروح، إذ يؤدي عدم وجود أحدهما إلى تأخر التئام الجروح وزيادة مخاطر حدوث مضاعفات الجروح، إضافة إلى تجنب الاستخدام غير الملائم للصادات الحيوية الجهازية بسبب مخاطر اختيار الكائنات المقاومة للأدوية المتعددة وكذلك الأحداث الضارة المرتبطة بالصادات الحيوية، وضرورة وجود فريق متعدد التخصصات من الخبراء في مجالات مختلفة (جراح، خبير أمراض معدية، عالم ميكروبيولوجي، صيدلي، طبيب شيخوخة) للإدارة المثلى لأخماج الجروح المزمنة، فقد يكون تنفيذ هذا النهج مفيداً لتحسين تدبير المرضى الذين يعانون من التهابات الجروح المزمنة.

يعد خمج الجرح من الأمراض المعقدة التي قد تظهر، إما كحالة حادة سريعة الظهور، أو كحالة مزمنة طويلة الأمد. على الرغم من أن العلاج بالصادات الحيوية الجهازية غالباً ما يكون مناسباً وضرورياً لعدوى الجروح الحادة، إلا أنه قد يستخدم بشكل غير ناجح ومفرط في التهابات الجروح المزمنة. يساهم الإفراط في استخدام الصادات الحيوية في تدبير الجروح المزمنة (التي يصعب التئامها) في ظهور المقاومة للصادات الحيوية. لذلك فإن التعرف على نوع خمج الجرح متبوعاً بالعلاج المناسب وفي الوقت المناسب مطلوب لتحسين نتائج التئام الجروح مع تشجيع الاستخدام الحكيم والمسؤول للصادات الحيوية [36].

علاجات العناية بالجروح القياسية لها فعالية محدودة في التئام هذه الأنواع من الجروح المزمنة، لذلك تم تطوير المواد الهلامية الحيوية الموضعية لتنفيذ أساليب علاجية جديدة لتحسين التأثيرات العلاجية وهي مفيدة نظراً لسهولة تطبيقها وقابليتها للتكيف والقدرة على تحسين خصائص الإطلاق العلاجي. استعرضت دراسة [37] المواد الهلامية الموضعية الجديدة المطورة لعلاج DFUS المزمنة، وتخصصت البيانات قبل السريرية للعلاجات الهلامية الموضعية في النماذج الحيوانية المصابة بداء السكري والتطبيقات السريرية، مع التركيز على المواد الهلامية بالبروتين/الببتيدات، العقاقير، الخلوية، العشبية/مضادات الأكسدة، ونهج النانو/الجسيمات الدقيقة.

تعتبر العلاجات الموضعية مفيدة نظراً لسهولة تطبيقها عند مقارنتها بطرق العلاج الحالية الأخرى، وتوفر المواد الهلامية أيضاً احتباساً للرطوبة في منطقة الجرح، وهو عنصر حاسم في تعزيز هجرة الخلايا الكيراتينية، وتكوين

الكولاجين، وتكوين الأوعية، وتقليل تكوين الندبات لكل من الجروح الحادة والمزمنة [37]، وتُعرف المواد الهلامية الموضعية على أنها أي مادة هلامية لزجة قابلة للحقن يمكن وضعها باستخدام المحاقن، والمصاصات، والأنابيب وما إلى ذلك، ويمكن وضعها بسهولة على الجرح.

وبالرغم من زيادة الانتشار والمرض المرتبطة بحالات ال DFU، تظل خيارات العلاج الفعالة محدودة، ويعتبر التنضير الجراحي معياراً تقليدياً لعلاج DFU، إذ تزيل هذه العملية الأنسجة الميتة والالتهابية من الجرح وتعزيز عملية التئام الجروح الحادة [38]. تشمل أشكال التنضير الميكانيكية، والتي يمكن أن تتراوح من تغييرات ضمام الشاش الرطب إلى الجاف، والغسل، والمعالجة المائية، والموجات فوق الصوتية منخفضة التردد، ومن التقنيات الشائعة الأخرى هي التفريغ لتخفيف الضغط على الجروح الموجودة على قاعدة القدم، وتقليل الوزمة لتحسين التروية، والأكسجين عالي الضغط لزيادة ضغط الأكسجين الشرياني [38,39]

يعد ترقيع الجلد خياراً فعالاً للجروح الأكبر حجماً لتوفير علاجات كاملة للبشرة أو الجلد، ولكن لها قيود، بما في ذلك توفر موقع متبرع محدود للتطعيم الذاتي والرفض المناعي للطعوم [40]. تم تطوير بدائل الجلد المهندسة حيويًا باستخدام المصفوفة الخارجية الخلوية (ECM) / أو الاستراتيجيات القائمة على الخلايا لتوفير الحماية ومنع المزيد من الإجهاد الميكانيكي لموقع الجرح، بالإضافة إلى الاحتفاظ بالرطوبة والإشارات ودعامات النمو الخلوي. [41,42]

للجروح المزمنة آثار ضارة على كل من المرضى وأنظمة الرعاية الصحية، وتُعزى الجروح المزمنة إلى ضعف عملية الالتئام بسبب العديد من العوامل المضيفة والمحلية التي تؤثر على مسارات الشفاء. تحتوي القرحة الناتجة على مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تكون في الغالب مقاومة للصادات الحيوية، ولديها القدرة على تكوين أغشية حيوية أحادية / متعددة الميكروبات mono/poly-microbial biofilms. شملت العديد من الدراسات والتجارب على العلاجات التقليدية، وتركز العلاجات على محاربة الاستعمار الميكروبي الذي يتطور في الجرح بواسطة مسببات الأمراض المقاومة للأدوية المتعددة. يحتاج تطوير الطب الجزيئي، خاصة في العوامل المضادة للبكتيريا، إلى نموذج في المختبر مشابه لبيئة الجرح المزمن في الجسم الحي لتقييم فعالية العوامل المضادة للميكروبات. نموذج الجرح المزمن (LCWB) Lubbock chronic wound biofilm هو نموذج في المختبر تم تطويره لتقليد استعمار العوامل الممرضة وتكوين الأغشية الحيوية لجرح مزمن حقيقي، وهو مناسب لفحص النشاط المضاد للبكتيريا للمركبات المبتكرة. يتم التركيز من خلاله على خصائص الأغشية الحيوية للجروح المزمنة ومساهمة نموذج LCWB في دراسة الأغشية الحيوية للجروح المتعددة الميكروبات كنموذج لاستراتيجيات العلاج الجديدة. [43]

هدفت دراسة [44] إلى تقييم العوامل المؤثرة على الإصابة بقرح القدم السكرية بالمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين، وتقييم تأثير مقاومة الميثيسيلين على تواتر التهاب العظام (بناءً على صور الأشعة السينية الكلاسيكية). تم تحليل ما مجموعه 863 مريضاً يعانون من DFU خلال الدراسة، من بين 201 حالة عزلت فيها المكورة العنقودية الذهبية كانت 31 عينة (15.4%) مقاومة للميثيسيلين (MRSA). وارتبط خمج العنقودية MRSA بارتفاع معدل الإصابة بالتهاب العظم، وكانت الإصابة بـ MRSA ملحوظة في الرجال أكثر من النساء ( $p < 0.01$ )، وفي كثير من الأحيان بين مرضى السكري من النوع-2 مقارنة بمرضى السكري من النوع-1 ( $p < 0.05$ ). وتم عزل MRSA إحصائياً بشكل أقل من المرضى الذين يعانون من زيادة الوزن

مقارنة بالمرضى الذين يعانون من مؤشر كتلة الجسم الطبيعي ( $P < 0.05$ )، وارتبطت حالات DFU المصابة بجرثومة MRSA بشكل ملحوظ في كثير من الأحيان بوجود الزائفة *Pseudomonas sp*. وغيرها من العصيات غير المخمرة عن تلك المصابة بـ MSSA ( $p < 0.05$ ). وبذلك يرتبط حدوث التهاب العظم بخمج الـ MRSA في المرضى الذين يعانون من قرح القدم السكرية. وبالتالي يجب مراقبة المرضى المصابين بالعنقودية الذهبية عن كثب أثناء استخدام الصادات الحيوية ومعالجتهم بصادات حيوية ضيقة الطيف. وفي دراسة [45] كانت جميع الجراثيم المعزولة موجبة الجرام والسائدة من المكورات العنقودية الذهبية حساسة للفانكومايسين.

على الرغم من أن الصادات الحيوية قد ساهمت بشكل كبير في التخفيف من الحالات الإنتانية التي تسببها الجراثيم، تبقى مخاوف كبيرة بشأن زيادة حدوث مقاومة لها، وبالتالي هناك حاجة ماسة إلى إيجاد بدائل مناسبة آمنة وفعالة. تمت دراسة العديد من المركبات الطبيعية، ومنها ببتيدي النيسين، وعدد من الزيوت العطرية النباتية على نطاق واسع وتم الإبلاغ عن فعاليتها كعوامل مضادة للميكروبات المسببة للأمراض [46].

تظهر الببتيدات المضادة للميكروبات (AMPs) Antimicrobial peptides، والتي تعرف باسم الببتيدات الدفاعية للمضيف، وهي ببتيديات قصيرة ذات شحنة موجبة بشكل عام، وتوجد في مجموعة متنوعة من أشكال الحياة، من الكائنات الحية الدقيقة حتى البشر، وتمتلك معظم مركبات AMP القدرة على قتل مسببات الأمراض الميكروبية بشكل مباشر، ويعمل البعض الآخر بشكل غير مباشر عن طريق تعديل أنظمة الدفاع المضيفة. وعلى خلفية التطور السريع للمقاومة للصادات الحيوية التقليدية في جميع أنحاء العالم، تتسارع الجهود المبذولة لإدخال AMPs في الاستخدام السريري، ويتم حالياً تقييم العديد من AMPs في التجارب السريرية كمضادات إنتاج جديدة، وكعوامل دوائية حديثة لتعديل الاستجابة المناعية، وتعزيز التئام الجروح، ومنع الالتصاقات بعد الجراحة [47].

أصبحت المكورات العنقودية الذهبية مقاومة بشكل متزايد لمعظم الصادات الحيوية المستخدمة في الممارسة السريرية، لذلك هناك حاجة ماسة للبحث عن استراتيجيات العلاج البديل لـ DFI. تظهر الببتيدات المضادة للميكروبات (AMPs) Antimicrobial peptides، التي تعرف بـ nisin، كعلاجات جديدة محتملة لتدبير DFIs. وقد طور فريق البحث [48] بيوجيل صمغ نيسين - غوار nisin-guar gum biogel ليتم تطبيقه على DFIs. وتم تقييم تأثير أربع درجات حرارة للتخزين (-20 درجة مئوية، 4 درجات مئوية، 22 درجة مئوية، و 37 درجة مئوية) خلال فترة تخزين 24 شهراً على نشاطها المضاد للمكورات العنقودية الذهبية والسموم الخلوية عند المرضى DFIs تجاه خط الخلايا الكيراتينية البشرية. عند تخزينها في درجات حرارة أقل من 22 درجة مئوية، لم يتأثر نشاط الـ biogel المضاد للميكروبات بشكل كبير بمدة التخزين أو درجة الحرارة، ولم يُظهر nisin المدمج في biogel الحيوي لصمغ الغوار أي مستويات كبيرة من السمية الخلوية على الخلايا الكيراتينية البشرية، مما يؤكد إمكاناته في علاجات DFIs. وبذلك تؤكد نتائج البحث أن nisin-biogel مرشح محتمل لاستخدامه كمركب بديل أو مكمل لعلاجات DFI التقليدية.

هدفت دراسة [49] إلى تقييم إمكانات Nisin Z، الببتيد المضاد للميكروبات AMP، كعلاج بديل لمرض DFI الشديد. وأظهر Nisin Z نشاطاً مضاداً للجراثيم موجبة وسالبة الجرام، مع زيادة تأثيره المضاد للجراثيم سلبية الجرام عند إضافته إلى EDTA. وتم تحديد الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC)، والحد الأدنى من التركيز مبيد الجراثيم (MBC)، وكذلك الحد الأدنى لتركيز المثبط للغلاف الحيوي (MBIC)، والحد الأدنى لتركيز إزالة (كبح) الغلاف الحيوي (MBEC) لكل من Nisin Z و Nisin Z + EDTA 0.4٪، و Nisin Z + EDTA في صمغ الغوار لاختبار فعاليته ضد الـ *S. aureus* والـ *P. aeruginosa* المعزولة من نفس حالة DFU.

أظهرت النتائج أن Nisin Z المضاف إلى عامل الاستخلاص ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) له فاعلية أعلى مضادة للجراثيم، وتأثير مضاد لإعادة الزرع الأحادي أو الثنائي لـ S. aureus و P. aeruginosa، وتأثير كابح للغلاف الحيوي الأحادي، وكان Nisin Z ساماً للخلايا بشكل معتدل عند 200 ميكروغرام/مل، وبذلك لم يكن القضاء على الغلاف الحيوي للجراثيم المدروسة المستعمرة للقدم السكرية، ممكناً في أي محلول Nisin Z بمستويات معتدلة من السمية الخلوية.

## المراجع

- 1- M.J. DiNubile and B.A. Lipsky. *Complicated infections of skin and skin structures: when the infection is more than skin deep.* J Antimicrob Chemother, 53 (Suppl 2) (2004), pp. ii37-ii50.
- 2- Alcone, M., Concia, E., Giusti, M. et al. *Acute bacterial skin and skin structure infections in internal medicine wards: old and new drugs.* Intern Emerg Med 11, 637–648 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11739-016-1450-6>.
- 3- lipsky, B.A., Tabak, Y.P., Johannes, R.S. et al. *Skin and soft tissue infections in hospitalised patients with diabetes: culture isolates and risk factors associated with mortality, length of stay and cost.* Diabetologia 53, 914–923 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1672-5>.
- 4- Singh, N.; Armstrong, D.G.; Lipsky, B.A. *Preventing foot ulcers in patients with diabetes.* JAMA 2005, 293, 217–228.
- 5- Prompers, L.; Huijberts, M.; Schaper, N.; Apelqvist, J.; Bakker, K.; Edmonds, M.; Holstein, P.; Jude, E.; irkovska, A.; Mauricio, D.; et al. *Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers.* Prospective data from the Eurodiale Study. Diabetologia 2008, 51, 1826–1834.
- 6- Jeffcoate, W.J.; Lipsky, B.A.; Berendt, A.R.; Cavanagh, P.R.; Bus, S.A.; Peters, E.J.; van Houtum, W.H.; Valk, G.; Bakker, K. *Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes.* Diabet. Med. 2008, 25, 1380–1389.
- 7- Spichler, A.; Hurwitz, B.L.; Armstrong, D.G.; Lipsky, B.A. *Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to “crime scene investigation”.* BMC Med. 2015, 13, 2.
- 8- Vandenesch, F.; Lina, G.; Henry, T. *Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?* Front. Cell. Infect. Microbiol. 2012, 2, 12.
- 9- Grumann, D.; Nubel, U.; Broker, B.M. *Staphylococcus aureus toxins—Their functions and genetics.* Infect. Genet. Evol. 2014, 21, 583–592.
- 10- C. N. Dang, Y. D. M. Prasad, A. J. M. Boulton, E. B. Jude. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the diabetic foot clinic: a worsening problem.* Diabetic Medicine. Volume 20, Issue 2. February 2003. Pages 159-161. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.00860.x>
- 11- Rasigade JP, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus: a pathogen with still unresolved issues.* Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:510-4
- 12- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Outbreaks of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections--Los Angeles County, California, 2002-2003.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003 Feb 07;52(5):88.



- 29-** Vu, B.G.; Stach, C.S.; Salgado-Pabon, W.; Diekema, D.J.; Gardner, S.E.; Schlievert, P.M. *Superantigens of Staphylococcus aureus from patients with diabetic foot ulcers*. J. Infect. Dis. 2014, 210, 1920–1927.
- 30-** Rolando, M.; Munro, P.; Stefani, C.; Auberger, P.; Flatau, G.; Lemichez, E. *Injection of Staphylococcus aureus EDIN by the Bacillus anthracis protective antigen machinery induces vascular permeability*. Infect. Immun. 2009, 77, 3596–3601.
- 31-** Christine Tkaczyk, Omari Jones-Nelson, Yue Yue Shi, David E. Tabor, Lily Cheng, Tianhui Zhang, Bret R. Sellman. *Neutralizing Staphylococcus aureus Virulence with AZD6389, a Three mAb Combination, Accelerates Closure of a Diabetic Polymicrobial Wound*. ASM Journals mSphere. Vol. 7, No. 3. <https://doi.org/10.1128/msphere.00130-22>.
- 32-** Viquez-Molina G, Aragón-Sánchez J, Pérez-Corrales C, Murillo-Vargas C, López-Valverde ME, Lipsky BA. *Virulence Factor Genes in Staphylococcus aureus Isolated From Diabetic Foot Soft Tissue and Bone Infections*. Int J Low Extrem Wounds. 2018 Mar;17(1):36-41. doi: 10.1177/1534734618764237. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29564946.
- 33-** Budzyńska A, Skowron K, Kaczmarek A, Wietlicka-Piszc M, Gospodarek-Komkowska E. *Virulence Factor Genes and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus Strains Isolated from Blood and Chronic Wounds*. Toxins (Basel). 2021 Jul 14;13(7):491. doi: 10.3390/toxins13070491. PMID: 34357963; PMCID: PMC8310355.
- 34-** Pouget C, Gustave CA, Ngba-Essebe C, Laurent F, Lemichez E, Tristan A, Sotto A, Dunyach-Rémy C, Lavigne JP. *Adaptation of Staphylococcus aureus in a Medium Mimicking a Diabetic Foot Environment*. Toxins (Basel). 2021 Mar 22;13(3):230. doi: 10.3390/toxins13030230. PMID: 33810194; PMCID: PMC8005162.
- 35-** Falcone M, De Angelis B, Pea F, Scalise A, Stefani S, Tasinato R, Zanetti O, Dalla Paola L. *Challenges in the management of chronic wound infections*. J Glob Antimicrob Resist. 2021 Sep;26:140-147. doi: 10.1016/j.jgar.2021.05.010. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34144200.
- 36-** Hurlow J, Bowler PG. *Acute and chronic wound infections: microbiological, immunological, clinical and therapeutic distinctions*. J Wound Care. 2022 May 2;31(5):436-445. doi: 10.12968/jowc.2022.31.5.436. PMID: 35579319.
- 37-** Bardill JR, Laughter MR, Stager M, Liechty KW, Krebs MD, Zgheib C. *Topical gel-based biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers*. Acta Biomater. 2022 Jan 15;138:73-91. doi: 10.1016/j.actbio.2021.10.045. Epub 2021 Oct 30. PMID: 34728428; PMCID: PMC8738150.
- 38-** Tecilazich F, Dinh TL, Veves A, *Emerging drugs for the treatment of diabetic ulcers*, Expert Opin Emerg Drugs 18(2) (2013) 207–217.
- 39-** Nieto-Gil MP, Ortega-Avila AB, Pardo-Rios M, Gijon-Nogueron G, *Effectiveness and Duration of Plantar Pressure Off-loading by Two Designs of Felt Padding: A Preliminary Study*, Journal of the American Podiatric Medical Association 109(6) (2019) 431–436.
- 40-** Dhasmana A, Singh S, Kadian S, Singh L, *Skin tissue engineering: Principles and advances*, J Dermatol Skin 1: 101 Abstract Keywords: Skin (2018).

- 41-** Harding K, Sumner M, Cardinal M, A prospective, multicentre, randomised controlled study of human fibroblast-derived dermal substitute (*Dermagraft*) in patients with venous leg ulcers, *International Wound Journal* 10(2) (2013) 132–137. [PMC free article]
- 42-** Kirsner RS, Sabolinski ML, Parsons NB, Skornicki M, Marston WA, *Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting*, *Wound Repair and Regeneration* 23(5) (2015) 737–744
- 43-** Diban F, Di Lodovico S, Di Fermo P, D'Ercole S, D'Arcangelo S, Di Giulio M, Cellini L. Biofilms in Chronic Wound Infections: *Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock Chronic Wound Biofilm Model*. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 5;24(2):1004. doi: 10.3390/ijms24021004. PMID: 36674518; PMCID: PMC9862456.
- 44-** Maria Stańkowska, Katarzyna Garbacz, Anna Korzon-Burakowska, Marek Bronk, Monika Skotarczak, and Anna Szymańska-Dubowik. *Microbiological, Clinical and Radiological Aspects of Diabetic Foot Ulcers Infected with Methicillin-Resistant and - Sensitive Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2022 Jun; 11(6): 701. doi: 10.3390/pathogens11060701.
- 45-** Selvarajan S, Dhandapani S, R. A, et al. (December 22, 2021) *Bacteriological Profile of Diabetic Foot Ulcers and Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producers in a Tertiary Care Hospital*. *Cureus* 13(12): e20596. doi:10.7759/cureus.20596.
- 46-** Field D, Baghou I, Rea MC, Gardiner GE, Ross RP, Hill C. Nisin in Combination with Cinnamaldehyde and EDTA to Control Growth of *Escherichia coli* Strains of Swine Origin. *Antibiotics (Basel)*. 2017 Dec 12;6(4):35. doi: 10.3390/antibiotics6040035. PMID: 29231854; PMCID: PMC5745478.
- 47-** Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2016, 6, 194. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version.
- 48-** Rui Silva Soares ,ORCID,Raquel Santos,Eva CunhaORCID,Luís Tavares, Alexandre Trindade ,ORCID and Manuela Oliveira. *Influence of Storage on the Antimicrobial and Cytotoxic Activities of a Nisin-biogel with Potential to be Applied to Diabetic Foot Infections Treatment*. *Antibiotics* 2020, 9(11), 781; <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110781>.
- 49-** Serrano I, Alhinho B, Cunha E, Tavares L, Trindade A, Oliveira M. *Bacteriostatic and Antibiofilm Efficacy of a Nisin Z Solution against Co-Cultures of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Diabetic Foot Infections*. *Life (Basel)*. 2023 Feb 11;13(2):504. doi: 10.3390/life13020504. PMID: 36836861; PMCID: PMC9964538.