

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Danguolė Važnaisienė

**PĖDOS INFEKCIJOS PLITIMAS
IR JO ĮTAKA APATINIŲ GALŪNIŲ
DIDŽIŲJŲ AMPUTACIJŲ IŠEITIMS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
medicina (06B)

Kaunas, 2016

Disertacija rengta 2011–2015 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete Medicinos akademijos Infekcinių ligų klinikoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Auksė Mickienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Konsultantas

prof. dr. Eric Senneville (Lilio universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. dr. Alvydas Pavilonis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Nariai:

prof. dr. Rasa Verkauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

doc. dr. Daiva Vėlyvytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Olivier Lesens (Clermont 1 universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija bus ginama viešame medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. liepos 7 d. 12 val. Kauno klinikinės ligoninės Didžiojoje auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Jostvainių g. 2, LT-47144 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Danguolė Važnaisienė

**THE SPREAD OF FOOT INFECTION
AND ITS IMPACT ON THE OUTCOMES
OF MAJOR AMPUTATIONS
OF LOWER EXTREMITIES**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Medicine (06B)

Kaunas, 2016

Dissertation has been prepared at the Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Department of Infectious Diseases during the period of 2011–2015.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Auksė Mickienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Consultant

Prof. Dr. Eric Senneville (Lille University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy:

Chairman

Prof. Dr. Alvydas Pavilionis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Members:

Prof. Dr. Rasa Verkauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Assoc. Prof. Dr. Daiva Vėlyvytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Habil. Arvydas Ambrozaitis (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Olivier Lesens (Clermont 1 University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dissertation will be defended at the open session of the Lithuanian University of Health Sciences at 12:00 on the 7th of July 2016, in the Didžioji auditorium of Kaunas Clinical Hospital.

Address: Joscvainių 2, LT-47144 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	9
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
2. DARBO AKTUALUMAS IR MOKSLINIS NAUJUMAS	11
3. LITERATŪROS APŽVALGA	13
3.1. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų paplitimas, priežastys ir rizikos veiksniai	13
3.2. Infekcijos įtaka apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikai ir bigės gijimui ...	14
3.3. Bigės infekcijos paplitimas, išsivystymo priežastys, diagnostika	15
3.4. Pėdos infekcijos plitimo patogenezės ypatumai	16
3.5. Kaulų infekcijų etiologinė diagnostika	18
3.5.1. Atvira (chirurginės intervencijos metu) kaulo biopsija	24
3.5.2. Perkutaninė (transkutaninė) kaulo biopsija	24
3.5.2.1. Perkutaninės kaulo biopsijos metodika	25
3.5.2.2. Indikacijos perkutanei kaulo biopsijai	27
3.5.2.3. Perkutaninės kaulo biopsijos saugumas	28
3.5.2.4. Perkutaninės kaulo biopsijos įtaka gydymo efektyvumui	28
3.5.2.5. Perkutaninės kaulo biopsijos naudojimo klinikinėje praktikoje problemos	29
3.5.3. Kaulo biopstatų mikrobiologinio ir histologinio vertinimo palyginimas	30
3.5.4. Laikotarpio be antibiotikų įtaka kaulo biopstatų mikrobiologinių pasėlių rezultatams	36
3.5.5. Cukrinio diabeto įtaka kaulo biopstatų mikrobiologinių pasėlių rezultatams	37
3.5.6. Gangrena, jos išplitimo iki kaulo ir infekcijos tikimybė	37
3.5.7. Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai ir kaulo biopsija	38
3.5.8. Molekulinės metodų taikymas etiologinėje diagnostikoje	38
3.6. Mikroorganizmų genetinių veiksnių svarba ir jų nustatymas sergant kaulų ir sąnarių infekcijomis	39
3.6.1. Infekcijos sukėlėjų virulentiškumas, audinių infekcija ir jų kolonizacija	40
3.6.2. Biofilmas: bakterijų sąveika	41
3.6.3. Bakterijų tipavimo svarba	41
3.7. Kaulų infekcijų pasveikimo kriterijai	42

4.	DARBO METODIKA.....	43
4.1.	Tyrimo schema	43
4.2.	Tyrimo imties apibūdinimas	44
4.2.1.	Retrospektyviojo tyrimo imtis	44
4.2.2.	Perspektyviojo tyrimo imtis	44
4.3.	Duomenų rinkimas.....	45
4.4.	Tiriamosios medžiagos surinkimas.....	45
4.4.1.	Chirurginė kaulo biopsija.....	46
4.4.2.	Perkutaninė kaulo biopsija.....	46
4.4.3.	Kaulo biopsija tarp pjūvio ir pažeistos zonos	46
4.5.	Mikrobiologiniai tyrimai.....	47
4.6.	Histologinis tyrimas.....	47
4.7.	Pacientų stebėjimas.....	49
4.8.	Statistinė analizė	49
4.9.	Tyrimo finansavimas	49
5.	REZULTATAI	50
5.1.	Retrospektyvusis tyrimas	50
5.1.1.	Retrospektyviajame tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys	50
5.1.2.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptatų mikrobiologinių tyrimų rezultatai ir jiems įtaką darantys veiksniai	50
5.1.3.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptatų mikrobiologinių tyrimų rezultatų palyginimas su tų pačių amputacijų metu atliktomis perkutaninėmis kaulo biopsijomis distalinėje pažeistoje zonoje.....	52
5.1.4.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptato mikrobiologiniame pasėlyje išskirtų sukėlėjų įtakos bigės gijimui nustatymas	52
5.2.	Perspektyvusis tyrimas	53
5.2.1.	Perspektyviajame tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys	53
5.2.2.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsijų rezultatai ir jiems įtaką darantys veiksniai.....	56
5.2.3.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptato mikrobiologinių tyrimų rezultatų palyginimas su perkutaninėmis kaulo biopsijomis distalinėje pažeistoje zonoje	61
5.2.4.	Kaulo biopsijų, atliktų tarp amputacijos pjūvio vietos ir distalinės pažeistos zonos, mikrobiologinių pasėlių rezultatai	62
5.2.5.	Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptato mikrobiologiniame pasėlyje išskirtų sukėlėjų įtaka bigės gijimui	66
5.2.6.	Neinfekcinių veiksnių įtaka apatinių galūnių didžiųjų amputacijų baigtims	67

5.2.7.	Cukriniu diabetu sergančių ir juo nesergančių pacientų tyrimo rezultatai	70
5.2.8.	Perkutaninės kaulo biopsijos iš pažeistos distalinės zonos mikrobiologinio pasėlio ir histologinio tyrimo duomenys.....	72
5.2.9.	Kaulo biopstatuose identifikuotų infekcijos sukėlėjų palyginimas su pasėlių iš žaizdos rezultatais	74
6.	TYRIMŲ REZULTATŲ PAGRINDIMAS, JŲ PATIKIMUMAS IR SANTYKIS SU KITŲ TYRĖJŲ DUOMENIMIS	76
	IŠVADOS.....	80
	PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	81
	DISERTACIJAI RENGTI NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS	83
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	89
	SUMMARY.....	104
	PRIEDAI	114
	CURRICULUM VITAE.....	121
	PADĖKA	122

SANTRUMPOS

AGDA	–	apatinių galūnių didžiosios (aukštos) amputacijos, t. y. amputacijos virš čiurnos sąnario. Disertacijoje nagrinėjamos apatinių galūnių didžiosios amputacijos skirstomos į amputacijas žemiau kelio (blauzdos srityje) ir amputacijas virš kelio (šlaunies srityje)
BA	–	biopsija amputacijos vietoje (atvira kaulo biopsija apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje)
BD	–	biopsija distalinėje zonoje (perkutaninė kaulo biopsija distalinėje pažeistoje zonoje, dažniausiai pėdoje)
BP	–	biopsija planuojamoje amputacijos vietoje (kaulo biopsija planuojamoje /numanomoje/ amputacijos vietoje žemiau kelio, tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos)
CD	–	cukrinis diabetas
CRB	–	C reaktyvinis baltymas
EDTA	–	etilendiamintetraacto rūgštis
HbA1c	–	gliukuotas hemoglobinas
HCl	–	druskos rūgštis
IDSA	–	<i>Infectious Diseases Society of America</i> (Amerikos infekcinių ligų draugija)
IWGDF	–	<i>International Working Group on the Diabetic Foot</i> (Tarptautinė diabetinės pėdos darbo grupė)
KFV /ml	–	kolonijas formuojantys vienetai mililitre
LSMU	–	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Maldi-TOF-MS	–	masių spektrometrinė analizė
Na ₂ SO ₄	–	natrio sulfatas
PAL	–	periferinių arterijų liga
PFA	–	paraformaldehidas
PI	–	pasikliautinis intervalas
PKB	–	perkutaninė kaulo biopsija
PNS	–	plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai
SN	–	standartinis nuokrypis
SR	–	santykinė rizika

IVADAS

Apatinių galūnių didžiosios amputacijos (AGDA) atliekamos tiek cukriniu diabetu (CD) sergantiems, tiek ir nesergantiems pacientams. Pagrindinės AGDA priežastys yra galūnių išemija, CD ir jo komplikacijos, infekcija, trauma, onkologinė patologija. Nemažai daliai šių pacientų prireikia pakartotinės amputacijos. Didelė infekcija po AGDA aprašoma nuo 5,5 proc. iki 48 proc. [1– 3], ji yra pagrindinė pakartotinės amputacijos priežastis [4]. Duomenų apie galimą pėdos infekcinio proceso išplitimą, sąlygojantį didžiąją amputaciją, ir jo įtaką bigės gijimui yra mažai. Neseniai apžvelgti ir aprašyti duomenys apie bigės mikroorganizmų įtaką tolesnei ligos eigai nagrinėja tik pasėlius iš žaizdos [5]. Kaulo biopsija pjūvio vietoje apatinių galūnių didžiųjų amputacijų metu retai atliekama klinikinėje praktikoje dėl didesnių finansinių išlaidų, galimų nepageidaujamų reiškinių, organizavimo sunkumų bei vyraujančios nuomonės, kad numatoma atlikti amputacija yra toli nuo infekcijos židinio ir mikroorganizmų neturėtų būti. Per stažuotę Prancūzijoje (Kaulų ir sąnarių infekcijų referencijos centre) pastebėta, kad kaulo biopsituose didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje (BA) nustatomi infekcijos sukėlėjai, ir tai labai padeda konsultuojant ir parenkant tinkamą antibakterinį bigės infekcijos gydymą. Todėl nuspręsta atlikti tyrimą ir nustatyti, kaip dažnai mikrobiologiniame pasėlyje iš amputacijos pjūvio vietos identifikuojami infekcijos sukėlėjai, ar atitinka sukėlėjus, nustatytus distalinėje pažeistoje zonoje, ir turi įtakos bigės gijimui.

1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas

Nustatyti pėdos infekcijos plitimą ir įvertinti jo įtaką apatinių galūnių didžiųjų amputacijų išeitims.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopstatų mikrobiologinio ir histologinio tyrimo rezultatus ir nustatyti veiksnius, skatinančius infekcijos plitimą iki amputacijos pjūvio vietos.
2. Palyginti kaulo biopsijų amputacijos pjūvio vietoje, distalinėje pažeistoje zonoje ir kaulo biopsijų, atliktų tarp amputacijos pjūvio vietos ir distalinės pažeistos zonos, mikrobiologinio ir histologinio tyrimo rezultatus.
3. Įvertinti infekcijos sukėlėjų, išskirtų apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje, įtaką bigės gijimui, pakartotinių operacijų, pakartotinio antibakterinio gydymo po amputacijos poreikiui, taip pat ir reikšmę pritaikant protezą.

2. DARBO AKTUALUMAS IR MOKSLINIS NAUJUMAS

Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet atliekama 40 000 amputacijų, iš jų 50–70 proc. sergantiesiems CD. Lietuvoje, remiantis kraujagyslių chirurgų tvarkomu registru (duomenys neskelbiami), per metus padaroma apie 600 amputacijų dėl galūnių išemijos. Kiek amputacijų dėl CD atliekama Lietuvoje, tiksliai nežinoma, nes valstybinė statistika tokių duomenų nekaučia [6]. Taip pat nėra tiksliai apibrėžti amputacijų rizikos veiksniai.

Literatūroje dažnai minima, kad infekcija padidina AGDA riziką ir turi įtakos bigės gijimui, tačiau infekcijos išplitimui įrodyti duomenų trūksta. Sulėtėjusio bigės gijimo ir besikartojančių infekcijos epizodų rizikos veiksniai nėra apibrėžti. Infekcinis procesas į amputacijos vietą gali išplisti iš pėdos, per kraują, nuo odos, iš kito šalia esančio infekcijos židinio (pvz. infekuotos pragulos). Duomenų apie galimą pėdos infekcinio proceso išplitimą išilgai kaulo, lemiantį didžiąją amputaciją, yra mažai. Literatūroje skelbiami tyrimų rezultatai apie rastų sukėlėjų tiesioginę įtaką žaizdos gijimui apsiriboja tik pasėliais iš žaizdos. Tačiau labai plačiai aprašoma pasėlių iš žaizdos menka diagnostinė vertė nustatant tiek diabetinės pėdos kaulų, tiek bigės kaulo infekcijas. Kaulo biopsija (tiek perkutaninė kaulo biopsija (PKB), tiek atvira, chirurginės intervencijos būdu atlikta, biopsija) apibrėžiama kaip informatyviausias diagnostinis metodas [7, 8], kai reikia patikimų mikrobiologinio pasėlio rezultatų pasirenkant ar koreguojant antibakterinį gydymą, nors ne visada naudojamas klinikinėje praktikoje.

PKB, dažnai apibūdinama kaip diabetinės pėdos osteomielito etiologinės diagnostikos „auksinis standartas“, deja dar gana retai naudojama Lietuvoje ir remiamasi pasėlių iš žaizdos ir radiologinių tyrimų rezultatais. Antra vertus, per pastaruosius metus jau dažniau atliekama klinikinėje praktikoje. Osteomielitas yra potenciali kiekvienos gilios opos komplikacija. Tačiau tikrąjį pažeidimo gylį, esant opai, pagal klinikinius požymius įvertinti sunku, o uždegiminiai rodikliai dažnai būna nespecifiniai. Remiantis Amerikos infekcinių ligų draugijos (*Infectious Diseases Society of America – IDSA*) [7] ir Tarptautinės diabetinės pėdos darbo grupės (*International Working Group on the Diabetic Foot – IWGDF*) [8] rekomendacijomis, osteomielitas neabejotinas, kai yra teigiamas kaulo bioptato mikrobiologinis ir histologinis tyrimas.

Ir vis dėlto lieka iki galo neaiški kaulo bioptato mikrobiologinio ir histologinio tyrimo reikšmė bei radiologinių tyrimų svarba. Diagnozuojant osteomielitą, rezultatai dažnai nesutampa, ir ne visada lengva apsispręsti, kokią gydymo taktiką pasirinkti, kaip įvertinti kiekvieno tyrimo trūkumus.

Klinikinėje praktikoje BA retai taikoma dėl papildomų išlaidų, atlikimo technikos, organizacinių sunkumų ir galimų nepageidaujamų reiškinių, o ypač dėl vyraujančios nuomonės, kad numatoma atlikti AGDA yra toli nuo infekcijos židinio ir mikroorganizmų, patekusių endogeniniu keliu, neturėtų būti. Studijų, lyginančių kaulo biopstatų mikrobiologinių pasėlių rezultatus BA ir distalinėje pažeistoje zonoje (BD), literatūroje trūksta.

Pastaruoju metu plačiai nagrinėjama plazmos nekoaguliuojančių stafilokokų (PNS), identifikuotų kaulo biopstatuose, kaip infekcijos sukėlėjų reikšmė. Tyrinėjami genetiniai virulentiškumo veiksniai tikslaus atsakymo kol kas nepateikia. Atskirti tikruosius infekcijos sukėlėjus nuo kolonizuojančių bakterijų ne visada paprasta. Dar ne iki galo aiškus PNS virulentiškumas, jų sąlygoti pakitimai, randami kituose tyrimuose.

Vis dažniau atliekamos tausojančios operacijos lėtiniam osteomielitui gydyti, ir pagal mikrobiologinių pasėlių rezultatus skiriamas antibakterinis gydymas yra ilgas (ne mažiau kaip 4–6 sav.), penetruojantis į kaulą, veikiantis biofilmą (rifampicinas, klindamicinas, fluorochinolonai, fuzidino r., daptomicinas), negana to, gali sukelti nemažai šalutinių reiškinių ir atsparumą antibiotikams, todėl svarbus išlieka patikimų pasėlių paėmimas. Antibakterinis gydymas yra problematiškas ir prieš paimant kaulo biopsijas, nes patikimiems rezultatams gauti reikalingas laiko tarpas be antibiotikų.

Nors manoma, kad dėl įvairių priežasčių (sensorinės neuropatijos, gliukemijos svyravimų) CD sergantiems pacientams infekcinės komplikacijos yra dažnesnės negu nesergantiems, antra vertus, CD sergantys pacientai yra dažniau stebimi gydytojų. Literatūroje trūksta palyginamųjų tyrimų, kurie analizuotų CD sergančių ir nesergančių pacientų infekcijos sukėlėjų identifikavimą kaulo biopstatuose.

Mūsų duomenimis, tai pirmasis tyrimas (tiek retrospektyvusis, tiek perspektyvusis multicentrinis kohortinis), nagrinėjantis pėdos infekcinio proceso galimą išplitimą į amputacijos vietą ir jo įtaką bigės gijimui, vertinant kaulo biopsijų rezultatus. Šio tyrimo hipotezė – jeigu infekcinis procesas plis išilgai kaulo iš pažeistos distalinės zonos į amputacijos pjūvio vietą (jeigu bus nustatyti sukėlėjai kaulo biopsijoje iš pjūvio vietos), tai jis gali turėti įtakos bigės gijimui.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų paplitimas, priežastys ir rizikos veiksniai

Kaip jau minėjome, Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet padaroma 40 000 amputacijų, iš jų 50–70 proc. sergantiesiems cukralige. Lietuvoje kraujagyslių chirurgų tvarkomas registras (duomenys neskelbiami) rodo, kad per metus atliekama apie 600 amputacijų dėl galūnių išemijos [6].

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) ligojinės Kauno klinikos Endokrinologijos klinikos kolektyvo surinktais duomenimis, 2012 metais Kauno ligojinėse atliktos 231, 2013 metais – 202 amputacijos CD sergantiems pacientams, iš jų 17 proc. sudarė AGDA. 2012 metais Kaune atlikta iš viso 167 AGDA (28,01/100 000 gyventojų), iš jų 43 CD sergantiems pacientams (7,21/100 000 gyventojų).

Žinomos AGDA priežastys:

- a) Kraujagyslių patologija
- b) CD ir jo komplikacijos
- c) Osteomielitas
- d) Trauma
- e) Piktybiniai navikai (odos, raumenų, kaulų)
- f) Įgimtos deformacijos (vaikams)

Remiantis akcinės bendrovės „Ortopedijos technika“ Fizinės medicinos ir reabilitacijos skyriuje protezuotų pacientų duomenimis, per pastaruosius 10 metų Lietuvoje dažniausios kojų AGDA priežastys yra šios: lėtinės ligos, t. y. periferinių kraujagyslių ligos (apie 50 proc.) ir CD (apie 30 proc.), eismo įvykių nulemtos bei terminės traumos (15 proc.), onkologinės ligos, osteomielitas ir kitos (5 proc.) [9].

Literatūroje aprašoma nemažai amputacijų rizikos veiksnių, tik kai kuriuose tyrimuose atskirai nagrinėjami AGDA rizikos veiksniai: amžius daugiau nei 60 metų, žasto ir kulkšnies indeksas $<0,8$, insultas, išeminė širdies liga, nefropatija, periferinių arterijų liga (PAL), sensorinė neuropatija, padidėjęs gliukoto hemoglobino kiekis (HbA1c), gangrena, infekcija, nustatyti sukėlėjai *Staphylococcus aureus* ir meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus* susiję su didesne AGDA rizika CD sergantiems pacientams [10]. Yra nustatytos amputacijų rizikos skalės, tačiau neišskirta tiksli AGDA grupė [11, 12].

Jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų konferencijoje mūsų komandos atliktuose ir pristatytuose tyrimuose nustatyti šie AGDA rizikos veiksniai CD sergantiems ir nesergantiems pacientams.

CD sergantiems pacientams lyginant pacientus, kuriems buvo atliktos AGDA ir kuriems jos neatliktos, buvo pastebėta statistiškai patikima priklausomybė tarp amžiaus, padidėjusio leukocitų, CRB (C reaktyvinio baltymo), kreatinino, šlapalo kiekio, CD tipo, diagnozuotos diabetinės pėdos, arterijų patologijos, anamnezėje buvusių mažųjų amputacijų, traumos anamnezėje ir AGDA. Tiems, kuriems diagnozuota diabetinė pėda, amputacijos atliekamos 5,94 karto dažniau nei tiems, kuriems ji nediagnozuota. Arterijų patologija 72,5 karto, o buvusios amputacijos anamnezėje apie 7,71 karto didina AGDA riziką [13].

Pacientams, sergantiems PAL, bet nesergantiems CD, palyginti su pacientais, kuriems buvo atliktos AGDA ir kuriems neatliktos, buvo nustatyta statistiškai patikima priklausomybė tarp padidėjusio leukocitų, CRB, šlapalo, gliukozės kiekio, mažųjų amputacijų, traumų anamnezėje, slaugos būtinybės, žaizdų ir AGDA. Tiems, kuriems anamnezėje atliktos mažosios amputacijos, didžiosios amputacijos atliekamos 23,04 karto dažniau nei tiems, kuriems mažosios nebuvo atliktos. Trauma anamnezėje 6,3 karto, slaugos būtinybė 7 kartus, žaizdos 4,13 karto didina AGDA riziką [14].

3.2. Infekcijos įtaka apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikai ir bigės gijimui

Literatūroje aprašoma, kad diabetinės pėdos infekcinės komplikacijos padidina amputacijų riziką 155 kartus, palyginti su CD sergančiais pacientais be pėdos infekcijos [15]. Amputacijų rizika tiesiogiai koreliuoja su infekcijos sunkumu. Ypač CD sergantiems pacientams infekcija dažnai priveda prie hospitalizacijos ir galūnės amputacijos, o kartu su PAL infekcija dramatiškai padidina amputacijų riziką [16, 17]. Tyrimas, į kurį buvo įtraukta 1666 CD sergantys pacientai, patvirtino hospitalizacijų dėl apatinių galūnių ($p < 0,001$) ir AGDA ($p < 0,001$) padidėjusią riziką pacientams pasunkėjus infekcijai remiantis IDSA klasifikacija [18, 7]. Eurodiale (*European Study Group on Diabetes and the Lower Extremity*) tyrimas patvirtina amputacijos grėsmę infekcijos atveju. Sunkios infekcijos su sisteminiais požymiais yra susiję su labai didele ankstyvos amputacijos rizika [19, 20].

Eurodiale tyrimu nustatyta, kad infekcijos ir PAL derinys patrigubina tikimybę, kad žaizda negis. CD sergantiems pacientams infekcija yra žaizdos negijimo predikcinis veiksnys pacientų grupėje su PAL [20]. Kai kurie autoriai yra aprašę, kad pacientams, prieš operaciją žaizdų pasėliuose turėjusiems išaugintą reikšmingą kiekį infekcijos sukėlėjų, statistiškai patikimai dažniau išsivysto pooperacinės žaizdos infekcija, jei lygintume su pacientais, turinčiais neigiamus pasėlius prieš operaciją, atitinkamai 57 proc. ir 33 proc.

[21]. Bigės infekcija po AGDA prailgina stacionarizavimo laiką ($p<0,002$) [22], yra pagrindinė pakartotinės amputacijos priežastis [4].

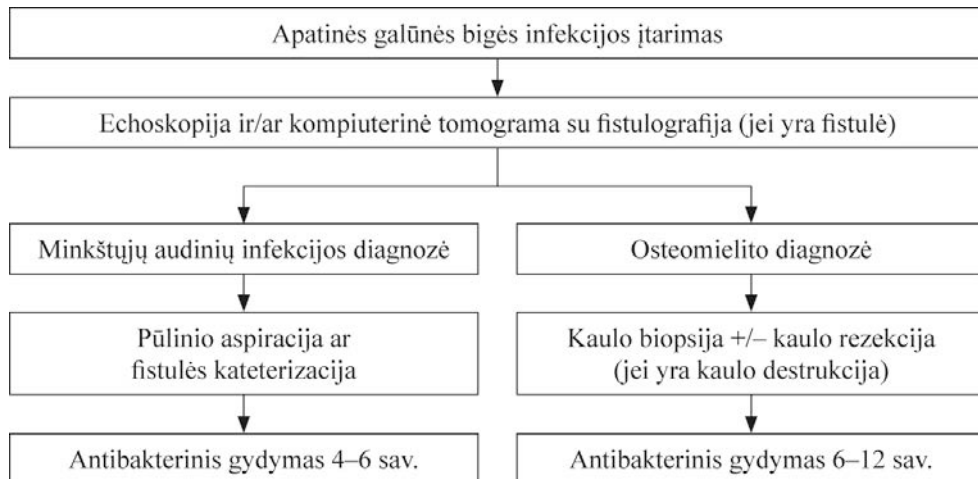
3.3. Bigės infekcijos paplitimas, išsivystymo priežastys, diagnostika

Bigės infekcija po AGDA aprašoma nuo 5,5 proc. iki 48 proc. [1–3, 22]. Praėjus daugiau nei 6 savaitėms po AGDA, bigės infekcija išsivystė pusei pacientų Herve Dutronc tyrime [23].

Viena iš aprašomų priežasčių galėtų būti prieš operaciją buvusi infekcija (šalia kitų galimų faktorių, kaip antai antibakterinio gydymo ir profilaktikos netinkamas taikymas, nepakankama mityba, socialiniai veiksniai [3]). Kiti autoriai tyrė infekcijos sukėlėjus, nustatytus prieš operaciją infekuotoje gangrenoje ir sukėlėjus, nustatytus pooperacinėje infekuotoje žaizdoje, 61 pacientui, kuriems atliktos AGDA dėl galūnių išemijos, įskaitant 34 sergančius CD. Tyrimas parodė, kad pooperacinė infekcija išsivystė 2/3 infekuotos gangrenos atvejų, palyginti su mažiau nei 1/3 neinfekuotos gangrenos atvejų ir CD infekcijos išsivystymui įtakos neturėjo [4]. Kai kurie autoriai yra aprašę, kad pacientams, prieš operaciją žaizdų pasėliuose turėjusiems išaugintą reikšmingą kiekį infekcijos sukėlėjų, statistiškai patikimai dažniau išsivysto pooperacinės žaizdos infekcija, palyginti su pacientais, kuriems bakterijos neišaugo prieš operaciją, atitinkamai 57 proc. ir 33 proc. [21]. Visais šiais aprašytais atvejais bigės infekcija buvo diagnozuota remiantis klinikiniais ir paviršinių žaizdų bakteriologinio tyrimo duomenimis.

Neseniai atliktas išsamus bigės infekcijų diagnostikos ir gydymo retrospektyvusis tyrimas, kuris pasiūlė bigės infekcijų diagnostikos algoritmą (3.3.1 pav.), kur kaulo biopsijos mikrobiologinio pasėlio svarba diagnozuojant bigės kaulo infekciją yra neabejotina gydymo taktikos pasirinkimui (šiam tyrimui nėra duomenų apie kaulo biopsijos histologinius duomenis) [23]. Taip pat tie patys autoriai siūlo multidisciplininę bigės infekcijų priežiūrą (chirurgo ortopedo, reabilitologo ir infekcinių ligų gydytojo). Įtariant bigės infekciją, iš klinikinių požymių išskirti: fistulės atsiradimas (65 proc.), vietiniai uždegimo požymiai (19 proc.), opėjimas (18 proc.), pūlinys (8 proc.), skausmas pritaikant protezą (7 proc.), osteomielito atveju gali padėti kontakto su kaulu nustatymas. Ne visada lengva bigės infekciją diferencijuoti nuo normalios uždegiminės gijimo fazės, alerginės reakcijos ar išemijos. Pacientams, kuriems nustatyta bigės kaulo infekcija, dažniau prireikė pakartotinės operacijos ir dažniau pasikartojo infekcijos epizodai, palyginti su pacientais, kuriems nustatyta bigės minkštųjų audinių infekcija ($p<0,001$). Kaulo

infekcijos atveju veikiausiai buvo sunkesnė ir labiau išplitusi pradinė infekcija prieš operaciją [23].



3.3.1 pav. *Bigės infekcijos diagnostikos algoritmas [23]*

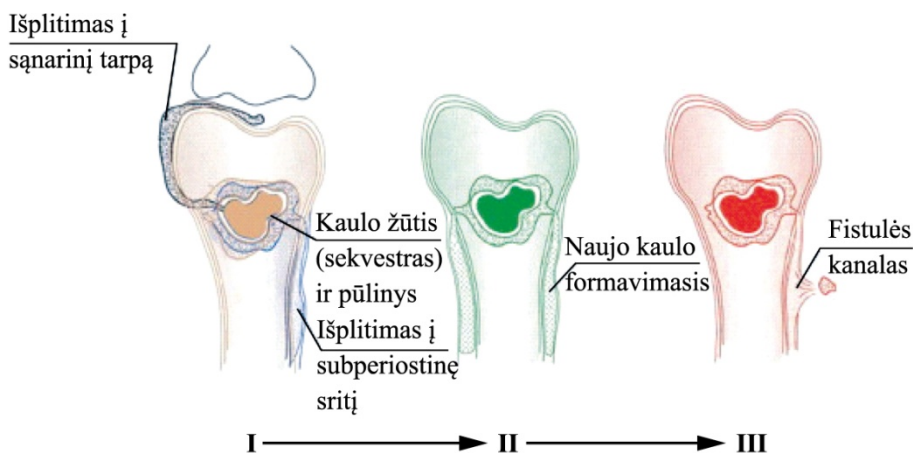
3.4. Pėdos infekcijos plitimo patogenezės ypatumai

Nors diabetinės pėdos infekcijos paprastai atrodo paviršinės, jos gali išplisti į gretimas sritis – minkštuosius audinius, fascijas, sausgysles, raumenis, sąnarius ir kaulus [24]. Diabetinės pėdos infekcija apima paronychia, celiulitą, miozitą, pūlinį, nekrotizuojantį fasciitą, septinį artritą, tendinitą ir osteomielitą. Praktiškai naudinga išskirti šiuos osteomielito tipus: osteomielitas, susidaręs nuo šalia esančio infekcijos židinio (po traumos, operacijos, implantų), osteomielitas su kraujagyslių nepakankamumu (taip pat ir diabetinės pėdos infekcijos) ir hematogeninis osteomielitas [25, 26]. Dažniausias klasikinis pažeidimas yra infekuota diabetinės pėdos opa. Didžiausią vaidmenį opos susidarymui turi diabetinė neuropatija, kai pakinta sensorinė, motorinė ir autonominė funkcijos. Tada traumos ar padidinto spaudimo metu pažeidžiama oda. Pažeidus odos barjerą, audiniai yra pasiekiami kolonizuojančių bakterijų. Tai gali vystytis iki aktyvios infekcijos ir plisti į gilesnius audinius. Šis procesas gali užtrukti labai trumpai (kelias dienas ar kelias valandas), ypač kai yra kojų išemija. Įvairūs imunologiniai, ypač polimorfonuklearinių leukocitų pokyčiai turi įtakos infekcijos vystymuisi ir sunkumui [27]. Pėdos anatomija, kuri padalinta į keletą nelanksčių, bet susisiekiančių skyrelių, skatina proksimalinę infekcijos plitimą.

Mikroorganizmai į chirurginę žaizdą gali patekti iš kito infekcijos židinio [28] (pvz., infekuotos pragulos), nuo odos intervencijos metu [29], iš

buvusios gangrenos [30]. Kaip aprašyta anksčiau, kai kuriais tyrimais [4, 21] nustatyta infekuotos gangrenos ir apibrėžtų sukėlėjų žaizdoje įtaka bigės infekcijų išsivystymui. Šiais aprašytais atvejais bigės infekcija buvo diagnozuota remiantis klinikiniais duomenimis ir mikrobiologiniais paviršiniais žaizdų pasėliais.

Literatūroje mažai duomenų apie tai, kaip infekcija iš pėdos galėtų patekti iki AGDA vietos išilgai kaulo, iš dalies tai yra kelias fascijom, taip pat šiame kelyje dar pasitaiko keletas sąnarių, kuriuos reikia apeiti. Diabetinės pėdos osteomielito hematogeninis plitimo kelias beveik nėra aprašomas. Pradžioje infekcija iš odos išplinta per visus audinius iki kaulo, ką rodo ir dažnai žaizdose daugiau randamų sukėlėjų negu kaule. Tačiau įdomu pastebėti, kad PKB metu nustatyta daugiau PNS negu pasėliuose iš žaizdos (atitinkamai 22,6 proc. ir 4,6 proc.; $p < 0,001$) [31], o adatinės kaulo biopsijos (siekiamas antkaulis) mėginių mikrobiologiniuose tyrimuose rečiau išauginami infekcijos sukėlėjai negu paviršinių žaizdos mikrobiologinių tyrimų metu [32] (kai lyginamos procedūros atliktos tiems patiems pacientams). Tai galėtų rodyti susidariusį didesnį mikroorganizmų kiekį kaule, kurie gali vėliau išplisti į sąnario ertmę arba sudaryti fistulę ir patekti į kitą odos vietą, o vėliau vėl į kaulą (3.4.1 pav.) [25].



3.4.1 pav. Lėtinio osteomielito progresavimo etapai
(adaptuota pagal Lew DP et al., 2004) [25]

Pastaba: I: Nuo sekvestro (negyvo be kraujotakos kaulo ploto) infekcijos progresavimas intrameduliariai, patekus į sąnario kapsulę, gali lemti septinį artritą, patekus į antkaulį, gali lemti antkaulio iškilimą. II: Naujo kaulo formavimasis yra masyvaus antkaulio iškilimo rezultatas III: Sekvestro ir nekrotinės masės išplitimas į kaulo žievę sudaro fistulę ir galiausiai pažeidžia odą.

Lėtinio osteomielito plitimui įtakos turi daugelis faktorių. Bakterijos prikimba prie kaulo per receptorius prie fibronektino ir kitų struktūrinių baltymų ir formuoja biofilmą (bioplėvelę). Biofilmas yra ypač būdingas su implantais susijusioms infekcijoms, bet gali būti svarbus ir nesant jokio svetimkūnio. Biofilme patogenai patiria sudėtingus metabolinius pakitimus ir pasidaro mažiau jautrūs ne tik imuninei sistemai, bet ir antibiotikams. Ląstelės sienoje veikiančiams antibiotikams, kad paveiktų biofilmą, dažnai reikalinga 100–1000 kartų didesnė koncentracija už standartinę. Be to, biofilmas slopina mononuklearinių ląstelių, T ir B limfocitų chemotaksį, kas neigiamai veikia ląstelinį ir humoralinį gynybos atsaką. Kai uždegimas užkemša kraujagysles, makroskopiniame lygyje susidaro fragmentuota išeminė kaulo nekrozė. Kaulų segmentai netenka kraujo tiekimo ir susiformuoja sekvestrai [26].

3.5. Kaulų infekcijų etiologinė diagnostika

Pastaruoju metu mokslinėje literatūroje yra plačiai aprašoma ir aptarinėjama kaulų infekcijų (čia nekalbama apie sąnarių infekcijas) etiologinė diagnostika. Siekiant laiku paskirti tinkamą antibakterinį gydymą, yra svarbu nustatyti tikrąją infekciją sukėlusį mikroorganizmą. Išsivysčius kaulų infekcijoms, skirtingai nei kitoms, be įprastų bakteriologinės diagnostikos problemų, susiduriama dar ir su tam tikromis specifinėmis:

- a) kontaminacijos rizika nuo odos ir minkštųjų audinių;
- b) identifikuotų sukėlėjų diferencijavimas tarp kolonizuojančių mikroorganizmų ir tikrų infekcijos sukėlėjų (ypač PNS atveju);
- c) daugeliu atvejų (ypač diabetinės pėdos atveju) aptikus kelis mikroorganizmus, dominuojančio(ų) patogeno (ų) nustatymas;
- d) klaidingai neigiamų rezultatų rizika (nepataikymas į infekcijos židinio vietą, empirinio antibakterinio gydymo skyrimas prieš tyrimų atlikimą, laiko tarpo be antibiotikų poreikis (dėl antibiotikų išsilaišymo kaule), nedidelis bakterijų kiekis, per ilgas medžiagos transportavimo laikas ir kt.);
- e) kadangi numatomas antibakterinis gydymas paprastai ilgas (6–12 sav., jeigu numatomas neradikalus chirurginis gydymas), difunduojantis į kaulą ir dažnai kombinuojamas su kitais antibiotikais kaulų infekcijų metu, antibakterinio gydymo skyrimo indikacijos svarbios šalutinių reiškinių ir bakterijų atsparumo vystymosi bei kainos prasme;

- f) kaulo biopsijų saugumo, atlikimo technikos, organizavimo problemos (ypač bendradarbiaujant su chirurgais, ortopedais traumatologais)
- g) sulėtėjęs mikroorganizmų augimas, biofilmo įtaka lėtinio osteomielito atveju kartais vertinama taip pat, kaip implantų atveju [33] (nustatymui gali būti reikalingas papildomas inkubavimas, specialios terpės).

Pastarąjį dešimtmetį mokslinėje literatūroje tyrinėjami ir lyginami įvairūs etiologinės diagnostikos metodai. Kaulo biopsija daugeliu atvejų apibrėžiama kaip „auksinis standartas“ diagnozuojant osteomielitą ir su juo paprastai lyginami kiti diagnostikos metodai. Tačiau, prieštaraujant terminui „auksinis standartas“, pastebima, kad gan retai kaulo biopsija naudojama klinikinėje praktikoje dėl aukščiau paminėtų problemų ir vis dar tyrinėjami mažiau invaziniai metodai (3.5.1 lentelė).

3.5.1 lentelė. Etiologinės osteomielito diagnostikos metodai, jų palyginimas

Etiologinės osteomielito diagnostikos metodas	Privalumai	Trūkumai	Identifikuotų mikroorganizmų tikrumas, tyrinėję autoriai	Atlikimo technikos ypatumai, kiti pastebėjimai
1	2	3	4	5
Pasėlis iš žaizdos	Lengvai prieinama klinikinėje praktikoje. Paprasta ir nebrangu atlikti, gali atlikti slaugytojos.	Didelė kontaminacijos rizika, nereikalingo antibakterinio gydymo skyrimo rizika. Yra tikimybė neišauginti anaerobų ar kitų išrankių bakterijų dėl mažo medžiagos kiekio, kai kurių kitų bakterijų slopinimo, blogesnių sąlygų išgyventi ar dėl bakterijų prikibimo prie tampono tyrimo metu [34]	Identifikuoti sukėlėjai ir kaulo biopsijos sukėlėjai daugumoje tyrimų nepakankamai atitinka: 22,5 proc., Senneville 2006 [31], 38,2 proc., Elamurugan 2011 [35], 65 proc. (35 proc. osteomielito atveju), Slater 2004 [36], reikšmingai nesiskyrė Senneville, 2008 [37] (tačiau kiekvienam pacientui atliktas tik vienas tyrimas iš dviejų), 66 neigiamų kaulo biopsijų, visais atvejais buvo teigiamas tepinėlis iš žaizdos (0 proc.), Senneville 2011 [38], 31 iš 55 atvejų kaulo biopsiatuose nustatyti sukėlėjai nebuvo rasti žaizdose, Khatri 2001 [39]	Reikalingas kruopštus žaizdos paruošimas prieš tyrimą Dažnai pasirenkamas klinikinėje praktikoje Tinka, jei nepažeistas kaulas
Adatinė punkcija	Gana lengvai prieinama klinikinėje praktikoje. Gan paprasta atlikti, mažesnė kontaminacijos nuo odos rizika negu pasėlių iš žaizdos	Dažnai nepasiekiamas pažeistas kaulas, paimami pūliai	Labiau atitinka tikruosius sukėlėjus, negu pasėlis iš žaizdos, bet vis tiek nepakankamai: 41,7 proc., Senneville 2009 [40], palyginti su pasėliais iš žaizdos 4/21 tapatūs mikroorganizmai, Kessler 2006 [31]	Autoriai siūlo šį tyrimą, kai chirurginė procedūra kontraindikuotina ar atidėta Labiau tinka sąnarių infekcijų atveju

3.5.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5
Atvira (chirurginė intervencijos metu) kaulo biopsija	Galima tiksliai paimti tiriamąją medžiagą iš pažeistos vietos, paimama vienos intervencijos (tos pačios anestezijos) metu	Tinka ligoniams, kuriems numatyta chirurginė intervencija (amputacija, negyvybingų audinių šalinimas), sudėtinga kartoti tyrimą dažnai besikartojant opoms, išlieka kontaminacijos nuo minkštųjų audinių ar chirurginių instrumentų rizika	Tikslūs sukėlėjai, perkutaninės kaulo biopsijos ir chirurginės kaulo biopsijos mikrobiologiniai ir histologiniai rezultatai sutampa, Wu 2007 [41]	
Pasėlis iš gilių minkštųjų audinių (ne kaulo)	Mažesnė kontaminacijos rizika, palyginti su pasėliais iš žaizdos	Kaulo infekcijos atveju gali ne visai atitikti tikruosius sukėlėjus	Atitikimas lyginant su kaulo biopsija: 44 proc., Mackowiak 1978 [43], 90 proc. (monomikrobinė flora), Perry 1991 [44], >47 proc., Patzakis 1994 [45], 89 proc., Mousa 1997 [46], 28 proc., Zuluaga 2002 [47], 47 proc., Agarwal 2005 [48], 74 proc., Onuminya 2006 [49], 38 proc., Ulug 2009 [50], jautrumas 50,9 proc., specifiškumas 20 proc., <i>Staphylococcus aureus</i> infekcijos atveju jautrumas 60,5 proc., specifiškumas 45 proc., Akinyoola 2009 [51], 49 proc., Ertugrul 2008 [52]	Reikalingas tinkamas žaizdos paruošimas

3.5.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5
Perkutaninė (transkutani nė) kaulo biopsija	„Auksinis diagnostikos standartas“, gali būti atliekama pacientams, kuriems nenumatyta chirurginė intervencija	Procedūros organizavimas, atlikimo technikos įsisavinimas, atlikimo technikos sudėtingumas pažeisto pėdos piršto atveju, echoskopijos poreikis tikslesnei infekcijos židinio vietai nustatyti, ne diabetinės pėdos atveju anestezijos poreikis, nedidelė komplikacijų rizika, sunku nustatyti retus mikroorganizmus, kontaminacijos nuo odos nedidelė rizika (nepaisant odos antiseptikų)	Tikslūs sukėlėjai, palyginti su paviršiniaus mikrobiologiniais pasėliais, polimikrobinės infekcijos atveju nustatoma mažiau infekcijos sukėlėjų, Senneville 2006, 2009 [31, 40], Elamurugan 2010 [35] Perkutaninės kaulo biopsijos ir chirurginės kaulo biopsijos mikrobiologiniai ir histologiniai rezultatai sutampa, Wu 2007 [41]	Atliekama kaulo biopsine adata apie 1–2 cm nuo žaizdos, norint išvengti kontaminacijos, echoskopu galima pasitiksinti pažeidimo vietą (nors vis tiek lieka tikimybė nepaaiškinti aktyvų osteomielito židinį), diabetinės pėdos atveju anestezija dažnai nereikalinga Klinikinėje praktikoje gan retai naudojama, prieštaraujama „auksinio standarto“ terminui

3.5.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5
Kaulo fragmento biopsija per žaizdą	Mažiau invazinis metodas nei kaulo biopsija, galima nustatyti tikrus kaulų infekcijų sukėlėjus, mažesnė rizika nepataikyti į infekcijos židinį, nes galima tiksliai pasižiūrėti, nepadaroma papildoma žaizda, nekrotinis kaulas turi didesnę kiekį bakterijų, lengviau išauginti sukėlėjus, po kaulo fragmento išėmimo galimas greitesnis gijimas	Turi būti žaizdos susisiekimas su kaulu, kaulo ryški destrukcija, išlieka nemaža kontaminacijos rizika	Tikslūs sukėlėjai, tačiau jie lyginami tik su literatūros duomenimis, Lesens 2011 [42]	Tinkamas žaizdos paruošimas, kruopštus negyvybingų audinių pašalinimas, nemaža chirurginė intervencija, tinka tik jau pažengusio osteomielito atveju, autorių nuomone, šis metodas tikėtų ligo-niams su sunkia arterijų patologija, kai perkutaninės kaulo biopsijos metu padaryta nauja žaizda apsunkintų gijimą Tyrinėjamas metodas, debatai
Du pasėliai iš gilios žaizdos, kai yra kontaktas su kaulu	Mažiau invazinis metodas negu perkutaninė kaulo biopsija, tikslesnis negu pasėlis iš žaizdos, nebūtinai išauginama daugiau bakterijų negu atliekant kaulo biopsiją	Turi būti kontaktas su kaulu, tyrimas atliekamas du kartus, nemaža kontaminacijos rizika nuo žaizdos	Sukėlėjai tikslūs, monomikrobinės infekcijos atveju tikslumas 94,3 proc., Bernard 2010, 2011 [53,54]	Autorių nuomone, šis metodas galėtų būti taikomas, kai atlikti perkutaninę kaulo biopsiją sudėtinga ar ligonis atsisako amputacijos

3.5.1. Atvira (chirurginės intervencijos metu) kaulo biopsija

Chirurginės intervencijos metu (negyvybingų audinių šalinimo, mažųjų amputacijų, AGDA), jeigu reikia nustatyti ar patikslinti infekcijos sukėlėjus, paprastai klinikinėje praktikoje paimami žaizdų ar aplinkinių audinių, bet ne kaulo pasėliai. Chirurginis negyvybingų audinių pašalinimas kartu su kaulo biopsija ir mikrobiologiniu pasėliu indikuotinas, jei yra bent viena iš šių sąlygų: pado išopėjimas, kai matosi negyvybingi audiniai, tokie kaip kremzlės, sausgyslės, kai yra opa su pažeistais kraštais arba reikia drenuoti fistulę ar pūlinį [55]. Įtarti osteomielitą ir apsispręsti dėl kaulo biopsijos taip pat padeda radiologiniai tyrimai [55]. Khatri tyrime nustatyta nepakankama koreliacija tarp žaizdų ir kaulų mikrobiologinių pasėlių rezultatų, atliekant negyvybingų audinių šalinimo intervenciją, be to, vertinant antibakterinį gydymą, jis buvo pakeistas, kai sužinota apie kaulo biopsijos pasėlio rezultatus – 20 iš 44 atvejų [39]. Kadangi kaulo biopsija šalinant negyvybingus audinius labai padėjo koreguoti antibakterinį gydymą beveik pusei pacientų, tyrimo autoriai siūlo tokių intervencijų metu šį diagnostikos metodą taikyti reguliariai [39]. Kai gydant osteomielitą pašalinamas negyvybingas kaulas, IDSA rekomenduoja jo mėginį ištirti histologiškai ir mikrobiologiškai [7].

Apie kaulo biopsijų atlikimo techniką, jų įvairovę literatūroje duomenų nėra daug. Jeigu pašalinami negyvybingi audiniai ir kaulas, tuomet kaulo dalis gali būti išsiunčiama tirti, jeigu šalinami tik aplinkiniai audiniai, kaulo mėginys gali būti paimamas trepano biopsija ar kitais chirurginiais instrumentais (žnyplėmis, kiuretėmis) [55].

3.5.2. Perkutaninė (transkutatinė) kaulo biopsija

PKB yra informatyviausias intervencinis tyrimo metodas, padedantis diagnozuoti osteomielitą CD sergantiems pacientams [7]. PKB gana retai atliekama klinikinėje praktikoje dėl galimų, nors retai pasitaikančių komplikacijų, atlikimo technikos, intervencijos organizavimo ir kainos, todėl dažnai pasikliaujama rentgenologiniu tyrimu ir pasėliu iš žaizdos. Kaip jau buvo anksčiau rašyta, PKB yra dažnai vertinama kaip osteomielito diagnostikos „auksinis standartas“, tačiau šio vertinimo nelabai paisoma ir PKB ne visur atliekama klinikinėje praktikoje [56]. Nors tam turi įtakos techniniai sunkumai, laikas procedūrai organizuoti, kaina, visa tai turėtų būti išsprendžiama, jeigu metodas tikrai efektyvus. Deja, vertinant antibakterinio gydymo (paskirto remiantis įvairių osteomielito etiologinės diagnostikos metodų rezultatais) efektą, randomizuotų tyrimų nėra (žr. 3.5.2.4 skyrių), ir nemažai autorių vis dar aprašo gerą efektą, taikant empirinį antibakterinį gydymą, kuris gali būti iki 95,2 proc. (empiriniam gydymui buvo pasirinkti ciprofloks-

sacinas, klindamicinas; autorių teigimu, šalutiniai reiškiniai buvo nedideli, tačiau įtaka atsparumo išsivystymui neįvertinta) [57].

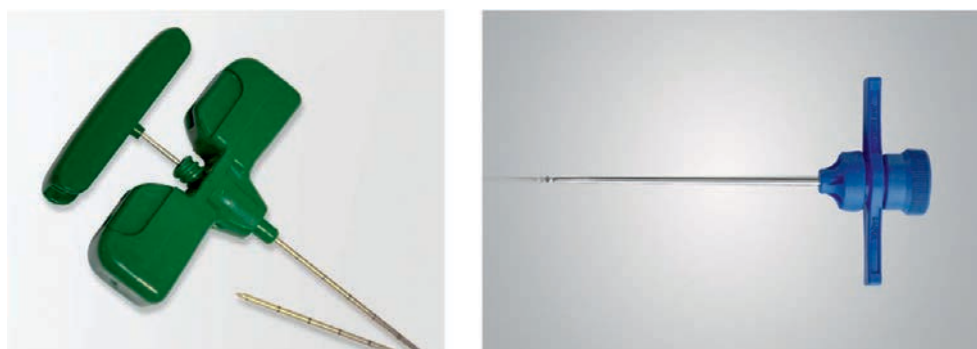
3.5.2.1. Perkutaninės kaulo biopsijos metodika

Literatūroje PKB dažnai aprašoma kaip nesudėtinga procedūra (3.5.2.1.1 pav.). Ji turėtų būti atliekama operacinėje vidutiniškai 11G 10 cm kaulo biopsine (Jamshidi tipo, trepano, kaulų čiulpų) adata (3.5.2.1.2 pav.). Biopsija gali būti atliekama taikant bendrinę, regioninę ar vietinę anesteziją, dėl neuropatijos diabetinės pėdos atveju anestezijos dažniausiai nereikia. Norint patikslinti infekcijos židinį, kaulo biopsija gali būti atliekama kontroliuojant echoskopu. Kad mikrobiologinių pasėlių rezultatai būtų patikimi, bent dvi savaites prieš kaulo biopsiją nereikia skirti antibiotikų. Adata įduriama 5–10 mm per nepažeistą odą bent 20 mm nuo žaizdos krašto, kad būtų išvengta kontaminacijos [31]. Siekiant jos išvengti pado pažeidimo atveju, kaulo biopsija gali būti atliekama per nugarinį pėdos paviršių [8]. Kai pajaučiama, kad adata truputį praduria kaulą, ištraukiamas stiletas, ir adata dar apie 10 mm sukamuoju judesiu įduriama į kaulą. Paimami bent du kaulo bioptatai mikrobiologiniam ir vienas histologiniam tyrimui. Yra alternatyva vieną kaulo bioptatą perkirpti pusiau ir vieną jo gabaliuką tirti mikrobiologiškai, o kitą – histologiškai.



3.5.2.1.1 pav. Kaulo biopsijos atlikimo procedūra

(Nuotraukų autorius: E. Beltrand, Turkueno universitetinė ligoninė, ortopedijos ir traumatologijos skyrius)



3.5.2.1.2 pav. Jamshidi tipo kaulo biopsijos adatos (kairėje – su T formos rankena, dešinėje – originali Jamshidi adata)

3.5.2.2. Indikacijos perkutaninei kaulo biopsijai

Kaulo biopsija gali būti atliekama šiais dviem atvejais:

1. Kaulo biopsija, siekiant nustatyti tikslų infekcijos sukėlėją, kai osteomielito diagnozė jau yra nustatyta pagal klinikinius ir radiologinius požymius. Esant diabetinės pėdos odos ir minkštųjų audinių infekcijai, kai siekiama išvengti greito jos plitimo, antibakterinis gydymas dažniausiai skiriamas empiriškai. Osteomielito atveju būtina tiksliai nustatyti infekcijos sukėlėjus, jų jautrumą antibiotikams ir parinkti tinkamą gydymą. Kai atliekamas radikalus chirurginis gydymas, biopsija nebūtina. Tačiau kai numatoma tausojanti operacija (šiuo metu jas stengiamasi atlikti kuo dažniau) ir tolesnis medikamentinis gydymas, būtina patikimai nustatyti infekcijos sukėlėjus, nes kaulų infekcijų antibakterinis gydymas trunka ilgai.
2. Kaulo biopsija osteomielito diagnozei nustatyti. Tais atvejais, kai diagnozė yra abejotina pagal klinikinius ir radiologinius požymius, diagnozei nustatyti gali būti atliekama kaulo biopsija. Atlikus biopsiją, diagnozė patvirtinama mikrobiologiniu ir histologiniu tyrimu. Biopsijos metu paimami bent 2 gabalėliai mikrobiologiniam, ir vienas – histologiniam tyrimui. Jeigu histologiniame tyrime neaptinkama osteomielito požymių, kur kas lengviau interpretuoti neigiamus mikrobiologinio pasėlio rezultatus ar išaugintus normalios odos mikrofloros mikroorganizmus. Tačiau histologiniame tyrime aptikus osteomielito požymius, galima pagrįsti kaulo infekcijos diagnozę net ir esant odos mikroflorai (plazmos nekoaguliuojantiems stafilokokams ar *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*). Histologinis tyrimas gali padėti ir tada, kai pasėlio rezultatai gali būti klaidingai neigiami dėl skirto antibakterinio gydymo.

Remiantis osteomielito tyrimų gausa ir IDSA [8] bei IWGDF [7] rekomendacijomis, šiuo metu PKB turėtų būti atliekama šiais atvejais:

1. Kai neaiški osteomielito diagnozė pagal klinikinius ir radiologinius požymius, bet norima tikslios diagnozės, apsisprendžiant dėl ankstyvo chirurginio, ilgo antibakterinio gydymo, arba kai prie įtartino kaulo planuojamos metalo konstrukcijos;
2. Kai neigiami (arba neaiškūs, įtariamas didelis atsparumas antibiotikams) minkštųjų audinių, kraujo mikrobiologinio tyrimo rezultatai;
3. Kai neefektingas (progresuoja kaulo pažeidimas, išlieka padidėję uždegiminiai rodikliai) empirinis antibakterinis gydymas arba anti-

- bakterinis gydymas remiantis pasėlių rezultatais (turėtų būti apsvaistyta kaulo rezekcija);
4. Kai planuojama skirti antibiotikus, ypač efektyvius osteomielito atveju, tačiau esant didelei rizikai išsivystyti mikroorganizmų atsparumui jiems (rifampicinas, fluorochinolonai, fuzidino r. ar klindamicinas).

3.5.2.3. Perkutaninės kaulo biopsijos saugumas

Perkutaninė kaulo biopsija aprašoma kaip saugi procedūra. Nustatytos pavienės komplikacijos. Charcot osteoartropatijos išsivystymas praėjus 4 savaitėms po PKB stebėtas vienu atveju (1/69 [31]). Minimalus kraujavimas stebėtas 3/100 biopsijų [58]. Daugelio kitų tyrimų metu komplikacijų nestebėta [35, 38, 40, 59, 60].

3.5.2.4. Perkutaninės kaulo biopsijos įtaka gydymo efektyvumui

Vertinant antibakterinio gydymo (paskirto remiantis PKB mikrobiologinio pasėlio rezultatais) efektą, randomizuotų tyrimų nėra. Viena tyrimo nustatyta, kad pasiekamas geresnis gydymo efektas skiriant antibakterinį gydymą remiantis PKB duomenimis, negu pasėliu iš žaizdos (18 iš 32 t. y. 56,3 proc. ir 4 iš 18 t. y. 22,2 proc.; $p=0,02$), tačiau tai ne randomizuotas tyrimas [37]. Khatri tyrime nustatyta nepakankama koreliacija tarp žaizdų ir kaulų mikrobiologinių pasėlių rezultatų, atliktų negyvybingų audinių šalinimo intervencijos metu. Vertinant antibakterinį gydymą, jis buvo pakeistas kaip nepakankamai efektingas, sužinojus kaulo biopsijos mikrobiologinio pasėlio rezultatus – 20 iš 44 atvejų [39].

Remisijų dažnis gydant diabetinės pėdos kaulų osteomielitą (skiriant empirinį antibakterinį gydymą, taip pat gydymą remiantis kaulo biopsijos ar kitais etiologinės diagnostikos metodais) svyruoja nuo 29 iki 100 proc., tačiau juos palyginti, norint įvertinti kaulo biopsijos svarbą, yra sunku, nes pasirinkti skirtingi prognozės kriterijai [61]. Taip pat daug kur neįvertinta ilgalaikio antibakterinio gydymo šalutinių reiškinių rizika ar infekcijos sukėlėjų atsparumas antibiotikams (ypač taikant empirinį gydymą).

Tik vienas ketvirtadalis iš pacientų, kuriems nenustatyti infekcijos sukėlėjai kaulo biopsijos mikrobiologiniame tyrime (paimta neskyrus bent 2 savaites antibiotikų), susirgo osteomielitu stebint 2 metus [38]. Kito tyrimo metu iš 10 neigiamų kaulo biopsijų, atliktų be prieš tai skirto antibakterinio gydymo, nei vienu atveju, stebint kliniškai ir radiologiškai metus laiko po procedūros, osteomielitas nebuvo diagnozuotas [31].

3.5.2.5. Perkutaninės kaulo biopsijos naudojimo klinikinėje praktikoje problemos

Nepaisant PKB saugumo ir iš kaulo biopstatų nustatytų infekcijos sukėlėjų tikslumo, Prancūzijos multicentrinio perspektyvaus kohortinio tyrimo metu nustatyta, kad PKB naudota tik 20 proc. įtarto osteomielito atvejų [62]. Tam nemažai turi įtakos ir klinikinėje praktikoje vyraujančios, dažnai nepagrįstos nuomonės (3.5.2.5.1 lentelė) [61].

3.5.2.5.1 lentelė. Perkutaninės kaulo biopsijos naudojimo klinikinėje praktikoje problemos

Nuomonė	Pagrindimas	Argumentai prieš
Žaizda po perkutaninės kaulo biopsijos neužgis, todėl reikia vengti bet kokios papildomos žaizdos cukriniu diabetu sergantiems pacientams	Diabetinė neuropatija ir angiopatija lemia sudėtingą opų priežiūrą ir gijimą	Turimi literatūros duomenys patvirtina perkutaninės kaulo biopsijos saugumą (žr. 3.5.2.3 skyrių)
Sudėtingas būtinas skirtingų specialistų bendradarbiavimas	Chirurgams, ortopedams traumatologams papildomas darbas, kuris nėra skatinamas Trūksta įrodymų, kad kaulo biopsija padidins paciento šansus pasveikti, kurie paskatintų įvairius specialistus atlikti šią procedūrą	Diabetinės pėdos atveju ir taip organizuojama įvairių specialistų komanda ir dirbama bendradarbiaujant
Komplikacijų tikimybė (pvz. lūžiai, periferinių arterijų ligos ar neuropatijos paūmėjimas)	Invazinis tyrimas	Aprašytas tik vienas Charcot osteoartropatijos atvejis, 3 nežymūs kraujavimai. Poveikis periferinių arterijų ligai ar neuropatijai nėra įrodytas
Klaidingai teigiami ar neigiami rezultatai	Kontaminacija Vartoti antibiotikai (išsilaiko kaule), mažas kiekis patogeninių bakterijų, transportavimo problemos (laikas), biopsija atlikta ne osteomielito zonoje, osteomielito atveju daugiau židininė negu difuzinė infekcija	Ne didesnė negu kitų etiologinės diagnostikos metodų; įmanoma atlikti biopsiją per neinfekuotus audinius [63] Reikalinga: tarpo be antibiotikų, specialių terpių naudojimas, laikymasis transportavimo reikalavimų, echoskopo pagalba

3.5.2.5.1 lentelės tęsinys

Nuomonė	Pagrindimas	Argumentai prieš
Perkutaninė kaulo biopsija gali išsėti infekciją iš odos ir minkštųjų audinių į kaulą	Adata praeina per odą ir minkštuosius audinius prieš patekdama į kaulinį audinį	Šita tikimybė yra daugiau teorinė, kadangi ji galėtų pasireikšti tik šalia esant minkštųjų audinių infekcijai. Tai ūmi infekcija, ir tik išimtiniais atvejais kaulo biopsija galėtų būti atliekama šiomis sąlygomis. Lėtesnės infekcijos atveju, kai abejojama dėl odos pažeidimo, dažnai tinkamas antibakterinis gydymas (amoksicilinas – klavulaninė rūgštis ar pristinamicinas) paskiriamas iškart, vos tik atlikus kaulo biopsiją, ir taip sumažinama ne tik kaulo inokuliacijos, bet ir minkštųjų audinių infekcijos pablogėjimo rizika, praeinant adatai [61]
Kaina	Invazinis tyrimas	Kaina neturėtų labai padidėti, nes kaulo biopsija galėtų būti atliekama ambulatorinės chirurgijos, „išorinės konsultacijos“, radiologinių procedūrų metu, juolab kad mažiau nei pusei pacientų reikalinga anestezija [61]

3.5.3. Kaulo biopstatų mikrobiologinio ir histologinio vertinimo palyginimas

Remiantis IDSA gairėmis, osteomielitas standartiškai diagnozuojamas pagal nustatytas bakterijas patikimai paimtuose kaulo mėginiuose (laikantis priemonių, kurios iki minimumo sumažina kontaminaciją) bei histologinius pakitimus (uždegimines ląsteles ir osteonekrozę) [7].

Naujausiose IDSA ir IWGDF rekomendacijose neabejojama kaulo biopstatų mikrobiologinio ir histologinio tyrimo svarba osteomielito diagnostikai, kai tuo pačiu atveju atliekamas tiek vienas, tiek kitas tyrimas. Tačiau jie abu gali būti ir klaidingai teigiami, ir klaidingai neigiami, o lyginami tiek vienas, tiek kitas turi ir privalumų, ir trūkumų (3.5.3.1 lentelė), todėl mokslinėje literatūroje aprašomi gana dažni rezultatų nesutapimai.

3.5.3.1 lentelė. Kaulo biopsijos mikrobiologinio ir histologinio vertinimo privalumai ir trūkumai

Tyrimai	Klaidingai teigiamas	Klaidingai neigiamas	Privalumai	Trūkumai
Mikrobiologinis tyrimas	a) kontaminacija nuo odos ir minkštųjų audinių (ne visada apsaugoma antiseptinėmis priemonėmis) b) kai žaizdą kolonizuojantys mikroorganizmai dar nesukelia infekcijos	a) reti, sunkiai nustatomi mikroorganizmai b) mažas bakterijų ir biopato kiekis c) prieš tyrimą skirtas antibakterinis gydymas d) paėmimo klaidos (net pagal radiologinių tyrimų duomenis – įskaitant echoskopiją – kaulo biopsijos metu aktyvus osteomielito plotas gali būti nepasiektas)	Skirtingai nei histologiniu tyrimu, dar nustatomi papildomai ir sukėlėjai, ne tik osteomielito diagnozė, o tai svarbu pasirenkant antibakterinį gydymą	
Histologinis tyrimas	a) kitos uždegiminės ligos b) kitos kilmės kaulo nekrozė (gangrena)	a) paėmimo klaidos	a) histologinis infekcijos nepažeisto kaulo vaizdas cukriniu diabetu sergantiems pacientams yra normalus, įskaitant atvejus su neuropatija ar periferinių kraujagyslių patologija [64] b) histologinis tyrimas gali padėti diferencijuoti nuo kontaminacijos [65]	a) nėra tiksliai apibrėžti vertinimo kriterijai b) kaina – iki 10 kartų brangiau negu mikrobiologinis tyrimas (222,1\$ ir 23,26\$) [66]; Lietuvoje – 43,35 euro (Valstybinis patologijos centras) ir 15,36 euro (LSMU ligoninė Kauno klinikos, Laboratorinės medicinos klinika) c) reikalingi technikos ir rezultatų interpretavimo įgūdžiai

Šioje 3.5.3.2 lentelėje pateikiama, kaip autoriai interpretuoja tuos abiejų tyrimų neatitikimus ir kaip apsisprendžia esant priešingiems rezultatams.

3.5.3.2 lentelė. Kaulo biopsijos mikrobiologinio ir histologinio vertinimo rezultatų sutapimas (atitikimas) ir galimos nesutapimo priežastys

Tyrimas, autorius	Sutapimas	Nesutapimo galimos priežastys	Apsisprendimas, išvada	Papildomi tyrimai ar argumentai apsisprendimui, kitos pastabos																									
Weiner, 2011 [66] Cukriniu diabetu sergantys pacientai	a) sutapo ($p > 0,05$), teigiamų mikrobiologiškai neigiamų histologiškai mėginių skaičius nesiskiria nuo neigiamų mikrobiologiškai teigiamų histologiškai b) rezultatai visiškai sutapo 29/44 (65,9 proc.) atvejų c) mikrobiologinio tyrimo jautrumas 75 proc., specifiškumas 42 proc. <table border="1"> <tr> <td></td><td></td><td>H</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>+</td><td>–</td><td></td></tr> <tr> <td>M</td><td>+</td><td>24</td><td>7</td><td>31</td></tr> <tr> <td></td><td>–</td><td>8</td><td>5</td><td>13</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>32</td><td>12</td><td>44</td></tr> </table>			H					+	–		M	+	24	7	31		–	8	5	13			32	12	44	a) nėra duomenų apie gretutines ligas (klaidingai teigiamų histologinių tyrimų tikimybė) b) galimi klaidingai neigiami mikrobiologiniai tyrimai dėl nevertinto prieš pasėlius skirto antibakterinio gydymo (tai paveiktų tyrimo rezultatus, ypač mikrobiologinio tyrimo jautrumą)	Nors išsiunčiama medžiaga ir histologiniam, ir mikrobiologiniam vertinimui, dauguma gydytojų labiau pasitiki histologinio tyrimo rezultatais	a) reikiamas imties dydis apskaičiuotas b) mikrobiologinio tyrimo jautrumas ir specifiškumas vertintas pagal histologinį, kuris taip pat galėjo būti nevisiškai tikslus
		H																											
		+	–																										
M	+	24	7	31																									
	–	8	5	13																									
		32	12	44																									

3.5.3.2 lentelės tęsinys

Tyrimas, autorius	Sutapimas	Nesutapimo galimos priežastys	Apsisprendimas, išvada	Papildomi tyrimai ar argumentai apsisprendimui, kitos pastabos																									
Senneville, 2009 [40] Cukriniu diabetu sergantys pacientai	a) rezultatai visiškai sutapo 6/14 (42,9 proc.) atvejų <table border="1"> <tr><td></td><td></td><td>H</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>+</td><td>–</td><td></td></tr> <tr><td>M</td><td>+</td><td>4</td><td>7</td><td>11</td></tr> <tr><td></td><td>–</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td></tr> <tr><td></td><td></td><td>5</td><td>9</td><td>14</td></tr> </table>			H					+	–		M	+	4	7	11		–	1	2	3			5	9	14	Autorių nuomone, literatūroje neaiškiai apibrėžti osteomielito diagnostikos histologiniai kriterijai	Mikrobiologinis tyrimas galėtų būti dažniau naudojamas negu histologinis tyrimas (taip pasiūlė ir Lavery [67])	a) į tyrimą neįtraukti pacientai, vartoję antibiotikus 2 savaites iki intervencijos b) į tyrimą neįtraukti atvejai su gangrena c) nedidelė imtis
		H																											
		+	–																										
M	+	4	7	11																									
	–	1	2	3																									
		5	9	14																									
Wu, 2007 [41] Visi osteomielitai, išskyrus stuburo (neišskirta cukriniu diabetu sergančių ir nesergančių grupė)	a) mikrobiologinio ir histologinio tyrimo rezultatai skiriasi ($p=0,03$) b) rezultatai visiškai sutapo 44/75 (58,67 proc.) <table border="1"> <tr><td></td><td></td><td>H</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>+</td><td>–</td><td></td></tr> <tr><td>M</td><td>+</td><td>14</td><td>4</td><td>18</td></tr> <tr><td></td><td>–</td><td>27</td><td>30</td><td>57</td></tr> <tr><td></td><td></td><td>41</td><td>34</td><td>75</td></tr> </table>			H					+	–		M	+	14	4	18		–	27	30	57			41	34	75	a) nėra duomenų apie gretutines uždegimines ligas (klaidingai teigiamų histologinių tyrimų tikimybė) b) per trypas pasirinktas antibiotikų neskirimo prieš biopsiją laikotarpis, norint išvengti neigiamų mikrobiologinių tyrimų rezultatų (kad antibiotikai neskirti prieš procedūrą vertinta tada, jei neskirti bent 24 val.)	Kaulo biopato mikrobiologinio tyrimo metu infekcijos sukėlėjų nustatymas yra nedidelis	a) vertinta eilė klinikinių ir laboratorinių faktorių, kurie galėjo turėti įtakos mikrobiologinių tyrimų rezultatams – statistiškai patikimai įtakos rezultatams neturėjo padidėję leukocitai, ENG, CRB, antibiotikų neskirimas, karščiavimas, ūmus ar lėtinis osteomielitas, biopsinės adatos dydis, statistiškai patikimai įtakos turėjo pūlingo eksudato kiekis b) kaip standartinis diagnostinis tyrimas pasirinktas histologinis
		H																											
		+	–																										
M	+	14	4	18																									
	–	27	30	57																									
		41	34	75																									

3.5.3.2 lentelės tęsinys

Tyrimas, autorius	Sutapimas	Nesutapimo galimos priežastys	Apsisprendimas, išvada	Papildomi tyrimai ar argumentai apsisprendimui, kitos pastabos																									
White, 1995 [68] Įvairūs osteomielitai	a) mikrobiologinio tyrimo jautrumas 42 proc., kombinuojant su histologiniu – 84 proc. b) rezultatai visiškai sutapo 17/25 (68 proc.) <table border="1"> <tr> <td></td><td></td><td>H</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>+</td><td>–</td><td></td></tr> <tr> <td>M</td><td>+</td><td>8</td><td>0</td><td>8</td></tr> <tr> <td></td><td>–</td><td>8</td><td>9</td><td>17</td></tr> <tr> <td></td><td></td><td>16</td><td>9</td><td>25</td></tr> </table>			H					+	–		M	+	8	0	8		–	8	9	17			16	9	25	Nėra duomenų apie antibiotikų vartojimą prieš tyrimą	Nors kaulo bioptato tinkamas kiekis svarbus infekcijos sukėlėjų išauginimui, dalis mėginio turėtų būti ištirta ir histologiškai dėl osteomielito	
		H																											
		+	–																										
M	+	8	0	8																									
	–	8	9	17																									
		16	9	25																									

Santrumpos: M – mikrobiologinis tyrimas, H – histologinis tyrimas, + teigiamas tyrimas diagnozuojant osteomielitą, – neigiamas tyrimas diagnozuojant osteomielitą.

Meyr [69] tyrime vertintas skirtingų patologų tos pačios tiriamosios medžiagos histologinio tyrimo rezultatų interpretavimas (priešingi rezultatai gauti 16, t. y. 41,03 proc. atvejų – bent vienas patologas vertino, kad nėra osteomielito ir bent vienas vertino, kad yra osteomielito požymiai). Į šį tyrimą įtraukta ir Charcot neuroartropatija. Vertinimo kriterijuose nėra patikslinta, ar rastos uždegiminės ląstelės, patys kriterijai nelabai aiškiai standartizuoti įvairiems osteomielito tipams.

Dėl minėtų kaulo biopatų mikrobiologinio ir histologinio tyrimo neatitikimų ir trūkumų dažnai gali prireikti papildomų tyrimų ar kriterijų kaulų infekcijai diagnozuoti. Berendt su bendraautorais [65] yra pasiūlę panašius į endokardito ar kai kurių reumatinių ligų diagnostinius kriterijus diabetinės pėdos kaulų osteomielitui nustatyti [65].

Dažniausiai aprašomi histologinio tyrimo osteomielito kriterijai [25, 68]:

- a) uždegiminių ląstelių buvimas (ypač neutrofilų);
- b) kaulo erozija ir fragmentacija;
- c) reaktyvaus kaulo formavimasis (gali būti ir Charcot osteoartropatijos bei lūžio pasekmė).

Lew aprašė ir kiekybinio histologinio tyrimo uždegiminių ląstelių svarbą, kai daugiau negu penki neutrofilai regėjimo lauke rodo infekciją [25]. Šis tyrimas pasižymi 43–84 proc. jautrumu ir 98–97 proc. specifiškumu [25].

Histologiniai kaulo biopsijos duomenys dažnai išskiriami kaip ūmus osteomielitas, jeigu matoma nekrozė, kaulo destrukcija ir neutrofilų infiltracija kietajame kaule ir kaulų čiulpuose. Meduliarinės dalies ir antkaulio smulkių kraujagyslių pilnakraujiskumas ar trombozė irgi yra dažnas radinys. Lėtinis osteomielitas vertinamas, jeigu matoma kaulo destrukcija ir limfocitų, histiocitų ir/arba plazminių ląstelių infiltracija kietajame kaule ir kaulų čiulpuose. Lėtinio osteomielito paūmėjimas nustatomas, kai lėtinio osteomielito fone yra neutrofilų infiltracija. Visais osteomielito atvejais gali būti stebimi įvairaus laipsnio fibrozės plotai ir kaulų čiulpų edema [70]. Kitame neseniai atliktame tyrime kaip atskiras osteomielito histologinis tipas išskiriama fibrozė [71].

Išanalizavus literatūros duomenis osteomielito diagnozei patvirtinti, lieka keletas iki galo neatsakytų ir nepatikslintų klausimų:

– Ar mikroorganizmas gali būti nustatomas anksčiau už histologinio tyrimo pakitimus kaulo infekcijos atveju, kas irgi galėtų lemti tyrimų neatitikimą?

– Gal mažiau virulentiški mikroorganizmai gali sukelti mažiau pakitimų histologinio tyrimo metu?

- Ar negali uždegiminės ląstelės iš minkštųjų audinių patekti ant kaulo (biopsijos metu) ir būti klaidingai teigiamo histologinio tyrimo priežastimi?
- Ar reikia gydyti nustatytus patogeninius sukėlėjus kaule ir kada gydyti be kitų infekcijos požymių, galvojant, kad jie nustatyti anksčiau, t. y. dar prieš uždegimo požymių susidarymą?
- Ar verta skaičiuoti jautrumą ir specifiskumą, jei nežinia kurį tyrimą (histologinį ar mikrobiologinį) priimti kaip standartą?

3.5.4. Laikotarpio be antibiotikų įtaka kaulo biopstatų mikrobiologinių pasėlių rezultatams

Prieš atliekant kaulo biopsiją, siekiant išvengti klaidingai neigiamų mikrobiologinių pasėlių rezultatų, naujausiose IDSA gairėse rekomenduojamas dviejų savaitių laiko tarpas be antibiotikų. Būtent tiek laiko kaule išsilaiko pagrindiniai antibiotikai, vartojami sergant kaulų infekcijomis. Nustatyta, kad beta laktaminiai antibiotikai (penicilinas, cefalosporinai) ir aminoglikozidai (gentamicinas, amikacinas ir kiti) pasišalina per 1 savaitę, fluorochinolonai (ciprofloksacinas, ofloksacinas) ir klindamicinas – per 2 savaites, o rifampicinas – per 3 savaites [72]. Kadangi rifampicinas retai naudojamas empiriniam gydymui be tiksliai nustatytų infekcijos sukėlėjų ir jų jautrumo antibiotikams, palyginus 2 ir 4 savaitių tarpą be antibiotikų, skirtumas nenustatytas, todėl įprastai taikomas 2 savaitių laikotarpis [61].

Ne visada yra paprasta tai padaryti klinikinėje praktikoje. Pirmiausia reikia pasverti ir infekcijos išplitimo galimybę neskiriant antibakterinio gydymo. Vienas tyrimas parodė, kad amputacijų dažnis statistiškai patikimai mažesnis, jeigu pacientams skirtas antibakterinis gydymas priėmimo metu dėl pradinio infekcijos epizodo [61]. Be to, laikotarpį be antibiotikų sunku išlaikyti, kai viena iš kaulo biopsijos indikacijų yra neefektyvus gydymas.

Marschall neseniai aprašė, kad spondilodiscito atveju kaulo biopstatų mikrobiologiniuose tyrimuose buvo bent pusei išauginti sukėlėjai nepaisant prieš procedūrą skirto antibakterinio gydymo [73]. Duomenų apie laiko tarpo be antibiotikų įtaką diabetinės pėdos osteomielito kaulo biopstatų mikrobiologinių pasėlių rezultatams yra nedaug. Wu tyrimo metu laikotarpis be antibiotikų buvo pasirinktas tuomet, jei antibiotikai nebuvo skirti bent 24 val. iki procedūros; tai iš dalies nulėmė į tyrimą įtrauktų institucijų naudojama klinikinė praktika prieš kaulo biopsiją 24 val. neskirti antibakterinio gydymo. Šis tyrimas parodė, kad antibakterinio gydymo skyrimas neturėjo įtakos mikrobiologinių pasėlių rezultatams [41]. Lesens tyrimas nenustatė statistiškai patikimo ryšio tarp antibiotikų vartojimo prieš tyrimą ir neigiamo kaulo fragmento biopsijos per žaizdą mikrobiologinio pasėlio [42].

3.5.5. Cukrinio diabeto įtaka kaulo biopatų mikrobiologinių pasėlių rezultatams

Diabetinės pėdos kaulų osteomielitas skiriasi nuo kitų osteomielitų ir kitų kaulų infekcijų specifiniais, dažnai tik CD būdingais bruožais: specifine anatominė kaulų struktūra, neuropatija, išemija, angiopatija, glikemijų svyravimais, sumažėjusiu atsparumu infekcijoms. Tai dažnai verčia galvoti apie dažnesnes ir sunkesnes kaulų infekcijas, dažniau nustatomus infekcijos sukėlėjus. Dėl minėtų ypatybių diabetinės pėdos kaulų osteomielitas dažniausiai nagrinėjamas ir tyrinėjamas kaip atskira grupė.

Literatūroje mažai duomenų apie tai, ar skiriasi kaulo biopsijos rezultatai cukriniu CD sergančių ir nesergančių pacientų kaulų infekcijų metu. Neseniai atliktas tyrimas parodė, kad histologinis infekcijos nepažeisto kaulo vaizdas CD sergančių pacientų yra normalus, įskaitant atvejus su neuropatija ar periferinių kraujagyslių patologija [64]. Diabetinės pėdos kaulų osteomielito atveju, įvairių tyrimų duomenimis, kaulo biopato mikrobiologinis pasėlis gali būti teigiamas 70,45–78,57 proc. [66, 40], įvairių osteomielitų atvejais kartu su CD sergančiais – 24–95,6 proc. [41, 68, 47], spondilodiscito (stuburo osteomielito) atvejais 40–91 proc. [74–76], osteomielitų atvejais, neįtraukus diabetinės pėdos, kaulo biopate nustatyti infekcijos sukėlėjai gali siekti 94 proc. atvejų [77]. Palyginamųjų tyrimų literatūroje nepavyko rasti.

3.5.6. Gangrena, jos išplitimo iki kaulo ir infekcijos tikimybė

Paprastai gangrena skirstoma į sausąją (dėl išemijos) ir šlapiąją (dėl infekcijos; į šią sąvoką įeina ir dujinė, vidinė gangrena). Tipiškai infekcijos nebūna sausosioje gangrenoje, tačiau sausoji gangrena gali virsti šlapiaja, jeigu ji infekuojasi. Sausosios gangrenos atveju tampa negyvybingas odos plotas dėl nepritekančio kraujo be bakterinės infekcijos, šis tipas neplinta į kitus audinius. Tai gali būti dėl aterosklerozės, CD, insulto, trombozės, nušalimo. Šlapioji gangrena išsivysto dėl sausosios gangrenos bakterinės infekcijos arba kraujo tėkmės obstrukcijos žaizdos srityje. Ši gangrenos forma gali labai greitai išplisti ir pasidaryti mirtina per kelias dienas [78]. Dėl blogo audinių aprūpinimo deguonimi, besitęsiančio uždegimo, pūlinio, osteomielito ir sisteminių pokyčių gali išsivystyti gangrena ir nekrozė, lemianti amputaciją, t. y. radikalų infekuoto audinio pašalinimą [79]. Chantelau tyrimo metu gangrenos atvejais buvo pakenktas ir kaulas (histologiškai patvirtintas osteomielitas), tik rečiau negu kliniškai išreikšto osteomielito atvejais (8/18 ir 22/22; $p < 0.001$) [64]. Šiame tyrime autoriai į gangrenos atvejų skaičių įtraukė ir sausąją, ir šlapiąją gangreną, tačiau įdomu, kad histologiniai osteomielito požymiai buvo rasti ir sausosios gangrenos atveju.

Apie mikroorganizmų nustatymą ir jų skirtumus gangrenos ir osteomielito atveju literatūroje duomenų nepavyko rasti.

3.5.7. Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai ir kaulo biopsija

PNS nustatomi mėginiuose iš kaulo 10–50 proc. [31, 80–82]. Ir daugeliu atvejų vertinami kaip tikri infekcijos sukėlėjai. Lavery [81] aprašė, kad atvira kaulo biopsija operacijos metu, kuri buvo naudojama jų tyrime, turi mažesnę kontaminacijos riziką negu PKB ir nustatė mažesnę PNS kiekį (11 prieš 50 proc.) negu Newman tyrime [82]. Tačiau įdomu, kad viename tyrime PKB metu rasta daugiau PNS negu pasėliuose iš žaizdos (25,6 proc. ir 4,6 proc.; $p < 0,001$) [31]. Tai rodytų PNS kaip infekcijos sukėlėjų tikrumą, nors minėtame tyrime infekcijai patvirtinti nebuvo naudotas histologinis tyrimas. Kitoje studijoje PNS kaip vienintelis patogenas nustatytas ir histologiškai patvirtintų osteomielitų CD atvejais [80], nors nebuvo tiriami anaerobai. Kad PNS nėra lengvos infekcijos sukėlėjas, rodo tyrimai, kuriuose vertinta ligos prognozė statistiškai patikimai nesiskyrė tarp *Staphylococcus aureus* ir PNS sukulto diabetinės pėdos osteomielito [80], sąnario protezo infekcijos [83].

Atskirti PNS kaip tikruosius infekcijų sukėlėjus nuo kontaminacijos yra svarbu pasirenkant diagnostikos ir gydymo taktiką. Tam gali padėti klinikiniai, radiologiniai tyrimai, histologiniai infekcijos požymiai. Neseniai atliktame tyrime pakartotiniai teigiami mikrobiologiniai pasėliai, identifikavimas tos pačios rūšies infekcijos sukėlėjų, pasižyminčių tokiu pat jautrumu antibiotikams, vertinti kaip stiprus tikros infekcijos argumentas [84]. Šiame tyrime, taikant genotipavimo metodus, išsiaiškinta, kad iš nustatytų vienodos rūšies PNS, pasižyminčių tokiu pat jautrumu antibiotikams, 93,3 proc. buvo tos pačios padermės [84]. Diferencijuojant bakteriemiją nuo kontaminacijos gali būti svarbus kiekybinis mikrobiologinis tyrimas (kontaminacija, kai < 10 KFV/ml [85]) ir laikas iki teigiamo mikrobiologinio pasėlio (kontaminacija, kai > 20 h [85], laikas iki teigiamo mikrobiologinio tyrimo iki 24 val. – predikcinis veiksnys tikros bakteriemijos, jautrumas 94 proc., specifiškumas 83 proc. [86]). Esant kaulų infekcijoms, dažnos polimikrobinės infekcijos. Bernard studijoje su kiekybiniu mikrobiologiniu tyrimu PNS vertinti kaip komensalai, jeigu jų kiekis buvo mažesnis negu kitų kartu nustatytų ir klasikinių osteomielito sukėlėjų, o dominuojančio mikroorganizmo kiekis turi būti didesnis bent 3 kartus negu kitų nustatytų infekcijos sukėlėjų [54]. Pažymėtina, kad genetiniai virulentiškumo žymenys mažai padeda atskirti tikrus sukėlėjus PNS nuo komensalų [87–89].

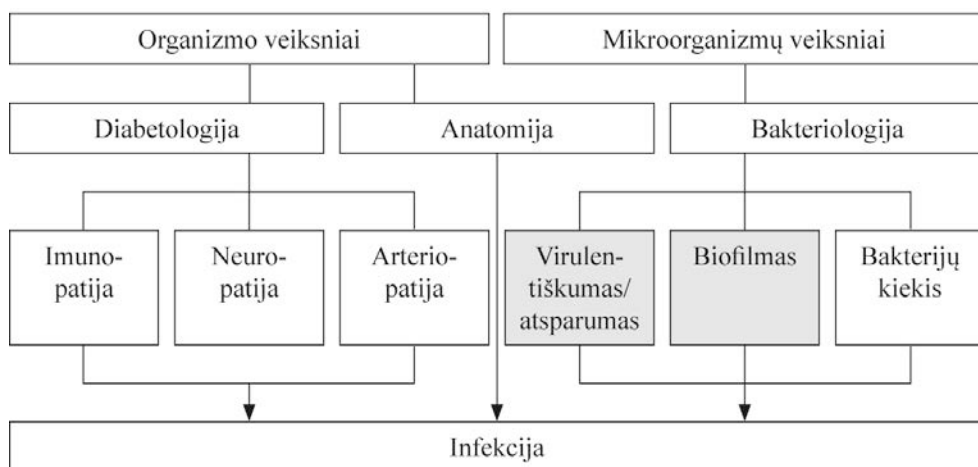
3.5.8. Molekulinį metodų taikymas etiologinėje diagnostikoje

Neseniai atliktais tyrimais įrodyta, kad standartiniai mikrobiologiniai pasėliai identifikuoja nedidelį procentą žaizdoje esančių infekcijos sukėlėjų, įskaitant diabetinės pėdos infekcijų atvejus. Molekuliniiais metodais galima nustatyti daugiau infekcijos sukėlėjų ir rezultatus gauti kur kas greičiau. Be to, molekuliniai metodai padeda surasti patogeninių bakterijų virulentiškumo faktorius ir genus, koduojančius atsparumą antibiotikams. Tai gali padėti kliniciams parinkti optimalų antibakterinį gydymą ir pagerinti gydymo rezultatus. Viena retrospektyviajame lėtinių žaizdų tyrime visiškai žaizdų užgijimas stebėtas gerokai dažniau, kai buvo pasitelkti molekulinės diagnostikos metodai (298 iš 479, t. y. 62,4 proc. ir 244 iš 503 pacientų, t. y. 48,5 proc.), užgijimo laikas buvo statistiškai patikimai trumpesnis ($p < 0,05$) ir vartojimas brangių „pirmo pasirinkimo“ antibiotikų sumažėjo siekiamo antibakterinio gydymo naudai [7, 90].

Kaip molekulinį metodų trūkumai vertinama tai, kad jie blogai nustato mikroorganizmo gyvybingumą ir riboja galimybes suskaičiuoti patogenines bakterijas [91].

3.6. Mikroorganizmų genetinių veiksnių svarba ir jų nustatymas sergant kaulų ir sąnarių infekcijomis

Diabetinės pėdos patologiją apsunkina įvairūs organizmo ir mikroorganizmų veiksniai (3.6.1 pav.), tarp jų ir nemažą įtaką darantys genetiniai veiksniai [92].



3.6.1 pav. Metabolinių, anatominių ir bakteriologinių veiksnių sąveika sergant diabetinės pėdos infekcija [92]

3.6.1. Infekcijos sukėlėjų virulentiškumas, audinių infekcija ir jų kolonizacija

Bakterijų virulentiškumo nustatymas padeda apibūdinti infekciją ir diferencijuoti nuo kolonizacijos. Yra atlikta nemažai tyrimų su *Staphylococcus aureus*, dažniausiu infekcijos sukėlėju, išskirtu iš diabetinės pėdos žaizdos, naudojant įvairius metodus, įskaitant genotipavimą mikrogardelių pagrindu, dauginę polimerazės grandininę reakciją ir bandymus su *Caenorhabditis elegans* bei *Danio rerio* žuvimi [92]. DNR mikrogardelių analizė yra molekulinės biologijos metodas, kuriuo galima nustatyti bakterijų virulentiškumo ir atsparumo antibiotikams genus. Naudojant šį metodą įrodyta, kad virulentiškumo ir atsparumo antibiotikams genai yra dažniau randami kliniškai infekuotose diabetinės pėdos opos, negu neinfekuotose žaizdose. Vieno tyrimo duomenimis, 20 iš 22 iš neinfekuotų opų izoliuotų *Staphylococcus aureus* neturėjo virulentiškumo genų, o šie genai rasti visose, išskyrus vieną iš 85 padermių, išskirtų iš infekuotų opų. Dauginės polimerazės grandininės reakcijos metodas leidžia tikrinti daug virulentiškumo genų. Šiuo būdu nustatyta, kad iš infekuotų opų išskirtos padermės turi dešimt genų statistiškai patikimai dažniau, nei iš neinfekuotų opų. Logistinės regresinės analizės būdu apskaičiuota, kad penkių genų kombinacija (*sea*, *sei*, *HLGV*, *cap5* ir *lukDE*) leidžia diferencijuoti infekuotą diabetinės pėdos opą nuo neinfekuotos su geru jautrumu (0,98) ir specifiškumu (0,87) [93]. Kitoje naujoje studijoje, pritaikius naujos kartos DNR mikrogardelių analizę, kuri padengė 334 skirtingus genus genotipuojant 195 *Staphylococcus aureus*, išskirtus kaip vienintelius sukėlėjus iš diabetinės pėdos, paaiškėjo, kad gali užtekti ir vieno geno (*lukDE*) diferencijuojant infekuotą opą nuo neinfekuotos. Taip pat *lukDE* genas turi reikšmės patikimai prognozei pirmo laipsnio diabetinės pėdos opos atveju [94]. Bakterijų virulentiškumo svarba sukelti infekciją yra patvirtinta su *Caenorhabditis elegans* ir *Danio rerio* žuvimi [92].

Staphylococcus aureus ekologinė niša yra šnervės, tačiau ši bakterija kolonizuoja nosiaryklę ir kitas kūno vietas, nesukeldama infekcinio proceso. Sutrikus organizmo balansui, kolonizacija gali pereiti į infekciją. Vis dar aktyviai diskutuojama, ar tam tikrų genotipų stafilokokai yra labiau linkę kolonizuoti ir/ar infekuoti. Genetinė struktūra plačiai nagrinėta remiantis DNR polimorfizmu. Tačiau nors dėta daug pastangų, kol kas iki galo neatskleista reikšmė kolonizacijai ir infekcijai, išskyrus tai, kad tam tikros linijos yra labai epideminės. Tinkamomis sąlygomis *Staphylococcus aureus* gali tapti invaziniu, ir tai visų pirma lemia organizmo veiksniai, tačiau yra daugybė *Staphylococcus aureus* virulentiškumo ir kolonizacijos veiksnių [95].

3.6.2. Biofilmas: bakterijų sąveika

Nors dažniausiai biofilmas yra minimas sąnarių protezų infekcijų atveju, jis randamas ir pas sergančius diabetinės pėdos kaulų osteomielitu. Biofilmui būdinga bakterijų adhezija prie sąnario protezo ar kaulo paviršiaus tiesiogiai arba per adhezinus (fibrinogenas, fibronektinas, kolagenas), sulėtėjęs bakterijų augimas, gaminamas glikokaliksas (slime), klinikiniai simptomai būna mažai išreikšti, o infekcija išlieka ir plinta. Be to, biofilmui būdinga didesnis atsparumas antibiotikams ir organizmo imuninei sistemai bei virulentiškumo genų suaktyvėjimas, taip pat, esant bakterijų glaudžiai sąveikai, gali būti perduodami ir genai iš vienos bakterijos kitai. Visa tai gali lemti diabetinės pėdos infekcijos sunkumą, lėtinę eigą ir recidyvus. Be to, ląstelėms atsiskyrus nuo biofilmo, infekcija gali lengviau plisti į kaulą. Yra bandomi nauji molekulinės biologijos metodai įvairioms lėtinės diabetinės pėdos opos grupėms nustatyti. Pavyzdžiui, kokybinė atstumo analizė nustatė, kad *Pseudomonas aeruginosa* agregatai yra giliau negu *Staphylococcus aureus*, todėl pasėly iš žaizdos tamponu gali būti ne visada aptinkama esanti opeje *Pseudomonas aeruginosa*. Remiantis šiais tyrimais, praktiškai yra svarbus žaizdos gramdymas, šalinant biofilmą, pasėlių ėmimas iš giliųjų audinių bei molekulinį biologinių metodų plėtojimas, kai šias bakterijas sunku izoliuoti įprastais metodais [92].

3.6.3. Bakterijų tipavimo svarba

Bakterijų tipavimas molekuliniiais biologiniais metodais gali būti svarbus infekcijos šaltiniui nustatyti, greičiau išsiaiškinti infekcijos sukėlėjus, taip pat identifikuoti bakterijas, kai yra skirtas antibakterinis gydymas ar sudėtinga išsiaiškinti bei patikslinti infekcijos sukėlėjus įprastais metodais

Remiantis tyrimu, kuriame buvo palygintos bakterijos, išskirtos iš nesėkmingai gydytos diabetinės pėdos žaizdos standartiniu mikrobiologiniu pasėliu, bakterijų tipavimas molekuliniiais biologiniais metodais gali būti svarbus diabetinės pėdos žaizdoms gydyti. Pvz. mikrobiologiniame pasėlyje buvo identifikuota tik *Bacteroides fragilis*, o DNR sekvenavimu dar ir *Pseudomonas mephitica* [96].

Neseniai aprašyta keletas įdomių klinikinių atvejų, kai infekcijos sukėlėją padėjo nustatyti molekulinės biologijos metodai. Esant sąnario protezo infekcijai, sąnarinio skysčio mikrobiologiniai pasėliai buvo paimti prieš skiriant antibiotikus, bet augimo nebuvo, tačiau universali 16S rRNR PGR ir sekvenavimas nustatė *Legionella micdadei* abiejuose sąnarinio skysčio mėginiuose [97]. Kitas atvejis – pirmas aprašytas spondilodiscitas, kur adatinės biopsijos iš slankstelio metu išaugo *Shewanella putrefaciens*, tačiau

sukėlėjas patikslintas molekulinės biologijos metodais – *Shewanella algae* [98].

3.7. Kaulų infekcijų pasveikimo kriterijai

Kaulų infekcijų pasveikimo kriterijai literatūroje nėra tiksliai apibrėžti, todėl, vertinant prognozę, jie pasirenkami įvairūs. Tarp dažnai minimų yra užgijusi žaizda, rentgenologinis tyrimas rodo stabilizavimąsi ar pagerėjimą. Kadangi kaulų infekcijos dažniausiai yra lėtinės, išgijimui apibūdinti įprastai vartojamas remisijos terminas. Taip pat svarbus ir vertinimo laikas, t. y. kada jau galima teigti, kad įvyko ligos remisija. Atskiruose tyrimuose šis laikas taip pat pasirenkamas įvairus. Diabetinės pėdos kaulų osteomielito remisija konstatuojama nesant jokių infekcijos požymių ir/ar per metus po užbaigto gydymo nepasikartoję infekcijos epizodas, neskirtas antibakterinis gydymas, netaikytas chirurginis gydymas biopsijos srityje ir nebuvo reikalinga rentgenograma [61].

Bendri terminai vartojami diabetinės pėdos kaulų osteomielito sėkmingam gydymui įvertinti: akivaizdžiai išnykusi liga ir uždegimo požymiai, užgijusi žaizda, remiantis radiologiniais tyrimais, užgijęs kaulas, nėra pasikartojimo epizodų per stebėjimo laikotarpį. Osteomielito pasikartojimui vartojami terminai: nesėkmingas pradinis chirurginis gydymas, pakartotinis gydymas ligoninėje ir naujas infekcijos epizodas toje pačioje ar gretimose srityje [99].

Yra aprašyti osteomielito atkryčiai praėjus keleriems metams, kartais net dešimtmečiams, ir tarptautiniu mastu nėra priimtina minimali stebėjimo laikotarpio trukmė. Kai kurių autorių nuomone, remisija yra tikslesnis terminas lėtinio osteomielito gydymo rezultatams apibūdinti negu išgijimas. Remiantis dabartine literatūra, remisija apibrėžiama, kai nėra jokių aktyvios infekcijos požymių ar simptomų po minimalaus nuo 1 iki 2 metų stebėjimo laikotarpio. Paprastai remisijos dažnumas tarp lėtiniu osteomielitu sergančių pacientų svyruoja nuo 40 iki 90 proc., su piku 80 proc. beveik nepriklausomai nuo chirurginio gydymo, intraveninio ar viso antibakterinio gydymo trukmės, taip pat nustatyto infekcijos sukėlėjo [100].

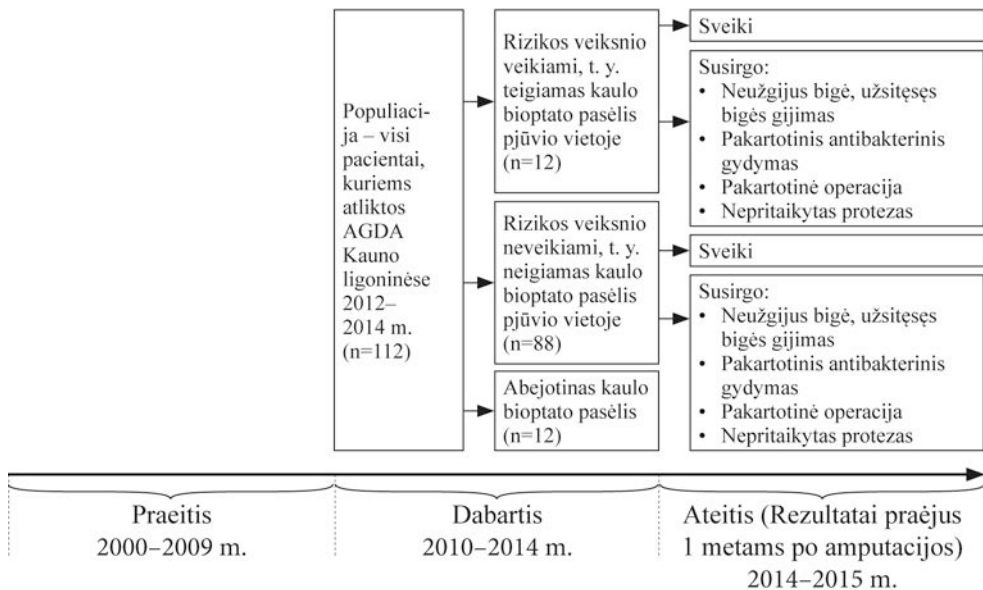
4. DARBO METODIKA

4.1. Tyrimo schema (4.1.1 pav.)

Retrospektyvusis tyrimas



Perspektyvusis tyrimas



4.1.1 pav. Retrospektyviojo ir perspektyviojo multicentrinio kohortinio tyrimo schema

4.2. Tyrimo imties apibūdinimas

4.2.1. Retrospektyviojo tyrimo imtis

Multicentrinis retrospektyvusis kohortinis tyrimas. Gavus visų 2000-01-01–2009-12-31 Turkueno ir Lilio universitetinių ligoninių (Prancūzija) infekcinių ligų ir chirurginio profilio skyriuose gydytų pacientų (≥ 18 metų), kuriems atliktos AGDA ($n=57$), asmens duomenis (vardą, pavardę ir ligos istorijos numerį), iš archyvo buvo paimtos ir analizuotos jų ligos istorijos.

Šią imtį sudarė 57 pacientai – 42 vyrai (73,68 proc.), 15 (26,32 proc.) moterų. Jauniausias pacientas buvo 23 metų, vyriausias – 89 metų. Vidutinis pacientų amžius buvo 52,16 metų ($SN=16,99$).

4.2.2. Perspektyviojo tyrimo imtis

Multicentrinis perspektyvusis kohortinis tyrimas. Skaičiuotas imties dydis pagal santykinę riziką (SR), panaudojant retrospektyviojo tyrimo rezultatus. Imties dydis skaičiuotas pagal tai, koks procentas pacientų su užgijusia bige buvo grupėje su nustatytais sukėlėjais kaulo biopato mikrobiologiniame pasėlyje (71 proc.) ir grupėje be sukėlėjų kaulo biopato mikrobiologiniame pasėlyje (94 proc.) retrospektyviojo tyrimo metu. Iš viso apskaičiuota minimali pacientų imtis – 100. Apskaičiuoti minimalūs imčių dydžiai: 17 su identifikuotais sukėlėjais AGDA pjūvio vietos kaulo biopato mikrobiologiniame tyrime ir 83 be sukėlėjų pjūvio vietos kaulo biopato mikrobiologiniame tyrime.

Įtraukimo į perspektyvųjį tyrimą kriterijai:

1. Suaugę pacientai (≥ 18 metų), kuriems buvo atliktos AGDA Kauno ligoninėse.
2. Gautas sutikimas dalyvauti tyrime.

Neįtraukimo į tyrimą kriterijus:

Pacientas atsisakė dalyvauti tyrime.

Kiekvienas pacientas, kuris atitiko įtraukimo į perspektyvųjį tyrimą kriterijus, buvo informuotas apie tyrimą ir pasirašė sutikimo formą. Studijos protokolas buvo patvirtintas Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto (BE-2-23). Gautas leidimas atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus iš Lietuvos Respublikos valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos (2R-6247).

Perspektyviojo tyrimo imtį sudarė pacientai ($n=112$) ≥ 18 metų, gydyti LSMU ligoninėje Kauno klinikos, Kauno klinikinėje ligoninėje ir Respublikinėje Kauno ligoninėje endokrinologijos ir chirurginio profilio skyriuose, kuriems 2012-05-01–2014-04-30 buvo atliktos AGDA. Visi pacientai atiti-

ko įtraukimo į tyrimą kriterijus. Vienas pacientas atsisakė nuo tolesnio stebėjimo.

Šią imtį sudarė 112 pacientų – 60 (53,6 proc.) vyrų ir 52 (46,4 proc.) moterų. Jauniausias pacientas buvo 32 metų, vyriausias – 102 metų. Vidutinis pacientų amžius buvo 71,3 m. (SN=13,8).

4.3. Duomenų rinkimas

Duomenys apie ligos eigą, rizikos veiksnius užpildyti pagal iš anksto parengtą anketą (žr. priedą) iš ligonio ir medicininių dokumentų. Atliekant retrospektyvųjį ir perspektyvųjį tyrimą, rinkti šie duomenys: amžius, lytis, ūgis, svoris, sirgimas CD ir glikemijos kontrolė, PAL, artritas, infekcijos vieta, trauma anamnezėje, amputacijos lygis, imunosupresija, slaugomas ligonis, gretutinė patologija, ligos anamnezė, amputacijos priežastis, laikas nuo sprendimo atlikti amputaciją iki operacijos, amputacijos anamnezėje, antibiotikų vartojimo trukmė prieš amputaciją, laiko tarpas be antibiotikų prieš amputaciją, uždegiminiai rodikliai (CRB, leukocitai), inkstų funkcija (kreatininas, glomerulų filtracijos greitis), antibiotikų vartojimas prieš ir po stacionarizavimo, anamnezėje nustatyti infekcijos sukėlėjai žaizdoje paskutinių 6 mėn. laikotarpiu. PAL buvo apibrėžta, jei 1) nečiuopiami nugarinės pėdos arterijos (*arteria dorsalis pedis*) ir užpakalinės blauzdos arterijos (*arteria tibialis posterior*) pulsai ir/arba 2) nustatomi pakitimai ultragarsinio tyrimo, angiografijos metu ir/arba 3) anamnezėje kraujagyslių chirurgo nustatyta PAL diagnozė, remiantis prieš tai paminėtais kriterijais. Gretutinė patologija vertinta esant širdies, inkstų ar kepenų nepakankamumui. Laiko tarpas be antibiotikų buvo apibrėžtas, jeigu pacientai nevartojo jokių sisteminių antibiotikų bent 2 savaites iki amputacijos. Antibiotikai, skirti premedikacijai operacijos metu, nevertinti kaip antibakterinis gydymas, skirtas prieš kaulo biopsiją.

4.4. Tiriamosios medžiagos surinkimas

AGDA metu buvo kartu atliekamos BA ir BD. Siekiant išvengti kryžminės kontaminacijos per operaciją, naudoti skirtingi chirurginiai instrumentai. Per kiekvieną BA ir BD buvo paimama po tris kaulo fragmentus. Du iš jų buvo naudojami mikrobiologiniam tyrimui, trečiasis – histologiniam. PKB technika įsisavinta Turkueno universitetinėje ligoninėje (Prancūzija), ortopedijos ir traumatologijos skyriuje (skyriaus vadovas Eric Beltrand).

4.4.1. Chirurginė kaulo biopsija

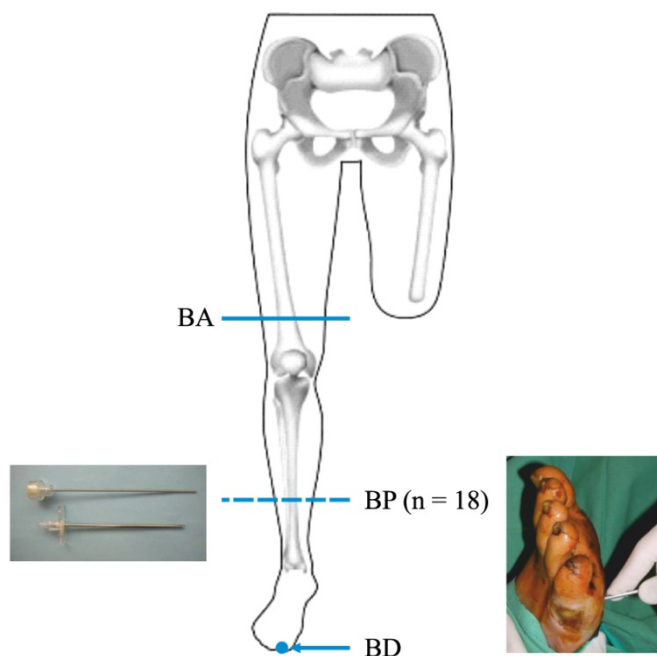
Operacinėje AGDA metu amputacijos pjūvio vietoje iš amputuotos galūnės pusės, naudojant Liston kaulų pjovimo žnyplės, buvo paimami kaulo fragmentai (kietojo kaulo ir kaulų čiulpų per kiekvieną biopsiją).

4.4.2. Perkutaninė kaulo biopsija

PKB buvo atliekama operacijų metu, naudojant 11G 10 cm biopsinę adatą, kuri buvo įduriama 5–10 mm per odą bent 20 mm nuo žaizdos (opos) krašto, kad būtų išvengta kontaminacijos nuo odos, t. y. pagal literatūroje aprašytą metodiką [31] (žr. 3.5.2.1 skyrių).

4.4.3. Kaulo biopsija tarp pjūvio ir pažeistos zonos

Atsižvelgiant į tai, kad mūsų ligoninėse dažniausiai taikoma radikali chirurgija, ir siekiant išaiškinti, kaip plinta infekcija, perspektyviojo tyrimo metu, amputuojant šlaunį diabetikams ir/ar akivaizdaus osteomielito atvejais (n=18), kaulo biopsija buvo atlikta ir planuojamoje (numanomoje) blauzdos amputacijos vietoje (BP) tarp distalinės pažeistos ir amputacijos pjūvio vietos su atskirais instrumentais (biopsine adata) (4.4.3.1 pav.).



4.4.3.1 pav. Kaulo biopsijų atlikimo vietos tyrimo metu

(Nuotraukų autorius: E. Beltrand, Turkueno universitetinė ligoninė, ortopedijos ir traumatologijos skyrius)

4.5. Mikrobiologiniai tyrimai

Retrospektyviojo tyrimo metu vienas kaulo fragmentas buvo pasėtas į Rosenow terpę (Biorad), kitas patalpintas į standartinę transportinę sistemą (Porta-germ; Biomerieux), perspektyviojo tyrimo metu tiriamoji medžiaga buvo paimta į Amies terpę (Brescia, Italy). Abiejų tyrimų metu tiriamoji medžiaga į mikrobiologijos laboratoriją buvo pristatyta per 1 valandą nuo paėmimo. Perspektyviajam tyrimui buvo naudotos terpės, atitinkančios retrospektyviojo tyrimo terpes. Tiriamoji medžiaga sterilia kilpele pasėta į kraujo agarą (BBL, JAV), šokoladinio agarą (BBL, JAV), MacConkey terpę (Oxoid, Anglija), Šedlerio agarą (BBL, JAV) kelių kvadratinų centimetrų ploto sektorius ir į tioglikolio terpę (Oxoid, Anglija). Užsėti kraujo ir šokolado agarai inkubuoti 5 proc. CO₂ sąlygomis 35 °C temperatūroje 24–48 val. MacConkey terpė inkubuota 18–24 val. 35 °C temperatūroje. Jeigu po 18–24 val. bakterijos neišaugo, kraujo agarą ir šokolado agarą Petrio lėkštelės buvo pakartotinai vertinamos po antros 24 val. inkubacijos. Tioglikolio terpė buvo inkubuota 35 °C temperatūroje 5 dienoms. Šedlerio agaras buvo inkubuotas 35 °C temperatūroje anaerobinėms sąlygom Bug Box (Anglija) 2 savaitėms. Išaugusiems PNS Maldi-TOF-MS (BRUKER) masių spektrometrijos analizė buvo naudojama padermėms nustatyti. Taip pat buvo skaičiuota KVFV/ml. Teigiamas kaulo biopato mikrobiologinis tyrimas vertintas tada, kai bent viename biopate išaugo infekcijos sukėlėjas, nepriklausantis odos mikroflorai, arba dviejuose išaugo bakterija(os) iš odos mikrofloros (PNS, *Corynebacterium* species arba *Propionibacterium acnes*) tos pačios rūšies ir tokio pat jautrumo antibiotikams. Pasėlis buvo vertintas kaip abejotinas, jeigu buvo identifikuojama viena bakterija, priklausanti odos mikroflorai. Dominuojantis mikroorganizmas turėjo pasižymėti bent tris kartus spartesniu augimu kaulo pasėliuose negu kiti mikroorganizmai. Visi teigiami kaulo pasėliai buvo užšaldyti –60 °C temperatūroje tolesniems tyrimams. Izoluoti vienodos rūšies ir tokio paties jautrumo antibiotikams infekcijos sukėlėjai BA, BP ir BD buvo palyginti naudojant genotipavimo metodus (pulsuojančio lauko gelio elektroforezė, Maldi-TOF-MS), siekiant patvirtinti vienodą padermę. Tyrimus atliko LSMU Laboratorinės medicinos klinikos mikrobiologai.

4.6. Histologinis tyrimas

Kaulo fragmentai buvo fiksuoti 4 proc. paraformaldehido tirpale (PFA), dekalcinuoti 10 proc. druskos rūgšties (HCl) tirpale ir įlieti į parafiną histologinei analizei. Atlikti 3 µm storio pjūviai, dažyti su hematoksilinu ir eozinu.

Kaulo biopstatų histologinis tyrimas atliktas LSMU Anatomijos institute, kur yra visa reikalinga įranga. Pabandžius kelis metodus (šaldomasis būdas, liejimas į parafiną) ir protokolus (dekalcinavimas 10 proc. HCl, 15 proc. HCl, 10 proc. etilendiamintetraacto rūgštis – EDTA), įvairi mėginių laikymo trukmė ksilole (2–0,5 val.), parafine (parafinas I – 1 val. ir parafinas II – 1 val. – parafinas II – 0,5 val.), buvo pritaikytas ir pakoreguotas kaulo įliejimo į parafiną protokolą.

Kaulo įliejimo į parafiną protokolą:

Kaulo biopstatai 3–7 d. fiksuojami PFA 4 proc.

2–30 d. dekalcinuojami 10 proc. HCl (kol suminkštėja)

10 proc. natrio sulfato tirpalas (Na_2SO_4) – 12 val.

Plaunama tekančiu vandeniu – 4–6 val.

70° spiritas – 24 val.

96° spiritas – 24 val.

100° spiritas I – 1 val.

100° spiritas II – 1 val.

Ksilolas + 100° spiritas – 2 val. (1:1)

Ksilolas – 0,5 val.

Ksilolas + parafinas – per naktį vėsiai (1:1)

Parafinas – 0,5 val.

Įliejimas

Parafino nuėmimo ir dažymo hematoksilinu-eozinu protokolą:

Ksilolas – 20 min.

96° spiritas – 20 min.

70° spiritas – 20 min.

Distiliuotam vandeniu, kol nusiskaidrins

Hematoksilinas – 15 min.

Šaltam vandeniu, kol pamėlynuoja

Eozinas – 1 min.

70° spiritas – praskalauti

Į švarų 70° spiritą – 1 min.

96° spiritas – 1–2 min.

Ksilolas – praskalauti

Dengimas

Taip pat LSMU Anatomijos institute kiekvienam tyrimui visą laiką ruošiamas šviežias 4 proc. PFA fiksatorius ir laikomas šaldytuve iki 2 sav. Kaulo biopstatai į konteinerius su fiksatoriumi patalpinti amputacijos metu operacinėje ir pristatyti į LSMU Anatomijos institutą.

Buvo vertinti histologiniai infekcijos požymiai. Histologiniai kaulo biopsijos duomenys vertinti kaip ūmus osteomielitas, jeigu buvo matoma nekrozė, kaulo destrukcija ir neutrofilų infiltracija kietajame kaule ir kaulų

čiulpuose bei meduliarinės dalies ir antkaulio smulkių kraujagyslių pilnakraujisškumas ar trombozė. Lėtinis osteomielitas buvo apibrėžiamas tuomet, jeigu buvo matoma kaulo destrukcija ir limfocitų, histiocitų ir/arba plazminių ląstelių infiltracija kietajame kaule ir kaulų čiulpuose. Visais osteomielito atvejais galėjo būti stebimi įvairaus laipsnio fibrozės (randėjimo) plotai ir kaulų čiulpų edema. Neinformatyvus (abejotinas) histologinis tyrimas buvo vertintas, jei pasirodė sunku įvertinti uždegimo požymius (blogai nusidažęs preparatas, sunkiai įžiūrima kaulo struktūra). Tyrimų atlikimo technika įsisavinta LSMU Anatomijos institute (neuromorfologijos laboratorijos vedėja Kristina Rysevaitė-Kyguolienė).

Retrospektyviojo tyrimo metu histologinis tyrimas nebuvo vertintas.

4.7. Pacientų stebėjimas

Pacientai stebėti po 1, 6 ir 12 mėnesių po amputacijos – buvo vertinama ligos eiga ir išeitis po operacijos. Objektivaus tyrimo metu su pacientu, apklausiant telefonu artimuosius, šeimos gydytoją ar slaugos ligoninių personalą, vertinta, kaip gyja pjūvis, ar reikėjo pakartotinės operacijos, ar antibiotikoterapijos, taip pat ligonio autonomijos įgijimas (pritaikytas protezas) (žr. priedą). Pooperacinė mirtis apibrėžta, jeigu ji įvyko per 30 dienų po operacijos.

4.8. Statistinė analizė

Kiekybiniams rodikliams grupėse charakterizuoti pateiktas vidurkis ir standartinis nuokrypis (SN). Kokybiniai nominalieji dydžiai pateikti kaip tiriamųjų skaičius (proc.). Vidurkiams palyginti taikytas Stjudento kriterijus. Tais atvejais, kai duomenys netenkino normaliojo pasiskirstymo sąlygų, naudotas Mann-Whitney testas. Kokybinių rodiklių palyginimui grupėse naudotas tikslus χ^2 bei tikslus Fišerio kriterijus. Tikrinant statistines hipotezes, naudotas 0,05 reikšmingumo lygmuo. Vertinant teigiamą kaulo kultūros įtaką tolesnei ligos eigai, skaičiuota SR bei jos 95 proc. pasikliautinis intervalas (PI). Iškraipiančių veiksnių nepriklausoma įtaka ligos baigtims vertinta naudojant stratifikuotą rezultatų analizę ir Kokso proporcingų rizikų regresinę analizę. Duomenys apdoroti *Excel* ir *SPSS 20* programomis.

4.9. Tyrimo finansavimas

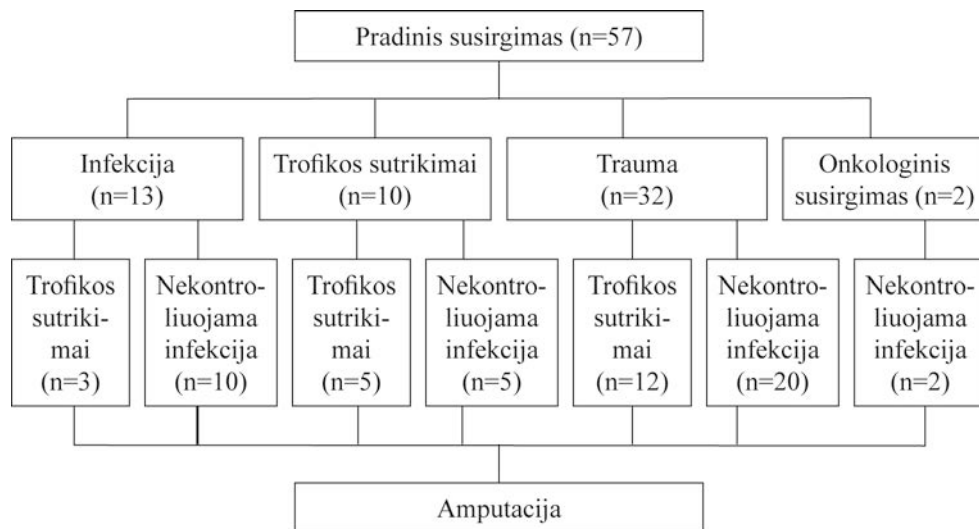
Tyrimas finansuotas LSMU mokslo fondo lėšomis.

5. REZULTATAI

5.1. Retrospektyvusis tyrimas

5.1.1. Retrospektyviajame tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys

Prancūzijos Turkueno ir Lilio universitetinėse ligoninėse 2000–2009 metais atliktos 57 AGDA (10 virš kelio, 47 žemiau kelio). Įtrauktų į tyrimą pacientų pradinis susirgimas buvo: trauma (n=32), infekcija (n=13), trofikos sutrikimai (n=10) ir onkologinis susirgimas (n=2). Nekontroliuojama infekcija kaip pagrindinė amputacijos priežastis buvo 37 atvejais, t. y. 64,9 proc. (pažeista pėda – 5, čiurna /blauzda/ – 8, visa koja – 24), likusiems 20 pacientų amputacijos priežastis buvo trofikos sutrikimai (5.1.1.1 pav.).



5.1.1.1 pav. Pradinis susirgimas ir amputacijos priežastys

Diabetinės pėdos infekcija stebėta 14 atvejų (24,6 proc.), osteoartritas – 24 (42,1 proc.), trauma anamnezėje – 38 (66,67 proc.), imunosupresija – 7 (12,28 proc.), PAL – 23 (40,35 proc.), slaugomas ligonis – 1 (1,75 proc.).

5.1.2. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopatų mikrobiologinių tyrimų rezultatai ir jiems įtaką darantys veiksniai

Retrospektyviai išanalizavus duomenis, 24 (42,1 proc.) atvejais nustatyti teigiami kaulo biopsijos mikrobiologiniai pasėliai BA, 12 (21,1

proc.) – abejotini ir 21 (36,8 proc.) – neigiami. Trisdešimt vienam pacientui (54,4 proc.) prieš amputaciją bent 2 savaites neskirti antibiotikai. Pacientai, kurių kaulo mikrobiologinis tyrimas buvo teigiamas, statistiškai patikimai ilgiau neapsisprendė dėl sutikimo amputacijai (200,2 ir 70,1 dienos; $p < 0.03$) ir buvo trumpiau gydyti antibiotikais prieš amputaciją negu pacientai, kurių kaulo mikrobiologinis tyrimas buvo neigiamas (3,68 ir 6,08 mėnesiai; $p < 0,03$) (5.1.2.1 lentelė).

5.1.2.1 lentelė. *Pacientų su teigiamu ir su neigiamu kaulo bioptato mikrobiologiniu pasėliu amputacijos pjūvio vietoje demografiniai ir klinikiniai duomenys*

Rodiklis	Teigiamas kaulo bioptato pasėlis (n=24)	Neigiamas kaulo bioptato pasėlis (n=21)	p
Amžius, metai, vidurkis	51,29	51,38	1
Amputacijos lygis			
– aukščiau kelio, n (proc.)	5 (20,8)	4 (19,1)	1
– žemiau kelio, n (proc.)	19 (79,2)	17 (80,9)	1
Patologijos trukmė iki amputacijos, dienos, vidurkis	2075,2	2124,8	1
Pažeidimo vieta			
– pėda, n (proc.)	3 (12,5)	5 (23,8)	0,44
– blauzda, n (proc.)	6 (25)	5 (23,8)	1
– visa koja, n (proc.)	15 (62,5)	10 (47,6)	0,38
Diabetinės pėdos infekcija, n (proc.)	4 (16,7)	7 (33,3)	0,3
Trauma anamnezėje, n (proc.)	17 (70,8)	14 (66,7)	1
Imunosupresija, n (proc.)	4 (16,7)	1 (4,8)	0,35
Periferinių arterijų liga, n (proc.)	7 (29,2)	9 (42,9)	0,37
Gretutinė patologija, n (proc.)	6 (25)	10 (47,6)	0,13
Amputacijos anamnezėje, n (proc.)	4 (16,7)	9 (42,9)	0,1
Trukmė nuo paciento supažindinimo su amputacija iki amputacijos atlikimo, dienos, vidurkis	200,25	70,15	0,03
Suminė antibakterinio gydymo trukmė prieš amputaciją, mėnesiai, vidurkis	3,68	6,08	0,03
Tarpas be antibiotikų iki amputacijos, dienos, vidurkis	22,19	27,9	0,8

5.1.3. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopstatų mikrobiologinių tyrimų rezultatų palyginimas su tų pačių amputacijų metu atliktomis perkutaninėmis kaulo biopsijomis distalinėje pažeistoje zonoje

Trisdešimt dviem pacientams (56,1 proc.) amputacijos metu buvo atlikta BD. 69,6 proc. atvejų (16/24) BA rasti mikroorganizmai buvo rasti ir BD. 11 (68,8 proc.) atvejų tapatūs infekcijos sukėlėjai nustatyti abiejose zonose buvo PNS, 3 (18,8 proc.) atvejais – *Staphylococcus aureus* (iš kurių 2 meticilinui atsparūs), 7 (43,8 proc.) atvejais sutapo daugiau nei vienas mikroorganizmas (5.1.3.1 lentelė).

5.1.3.1 lentelė. Tokie patys infekcijos sukėlėjai nustatyti kaulo biopstatų mikrobiologiniame pasėlyje amputacijos pjūvio vietoje ir distalinėje pažeistoje zonoje

Paciento Nr.	Vienodi sukėlėjai nustatyti amputacijos pjūvio vietoje ir distalinėje zonoje
1	Meticilinui jautrus <i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Citrobacter braakii</i>
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , meticilinui atsparus <i>Staphylococcus aureus</i>
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	Meticilinui atsparus <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Morganella morganii</i>
6	<i>Staphylococcus capitis</i>
7	<i>Proteus mirabilis</i>
8	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
9	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterococcus spp</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
10	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Staphylococcus capitis</i>
11–16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

5.1.4. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopstatų mikrobiologiniame pasėlyje išskirtų sukėlėjų įtakos bigės gijimui nustatymas

Bigės užgijimo trukmė buvo ilgesnė pacientams su nustatytu teigiamu kaulo biopstatų mikrobiologiniu pasėliu, palyginti su pacientais, kuriems nustatytas neigiamas kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis amputacijos pjūvio vietoje (3,57 ir 2,48 mėn.; $p < 0,03$) (5.1.4.1 lentelė). Pacientams su teigiamu kaulo biopstatų mikrobiologiniu pasėliu po operacijos statistiškai patikimai dažniau buvo skiriami fluorochinolonai ($p = 0,04$) ir antibiotikai,

veikiantys meticilinui atsparius *Staphylococcus aureus* ($p=0,03$), negu pacientams su neigiamu kaulo bioptato mikrobiologiniu pasėliu.

5.1.4.1 lentelė. *Teigiamų kaulo bioptato mikrobiologinių pasėlių amputacijos pjūvio vietoje įtaka bigės gijimui*

	Teigiama kaulo bioptato pasėlis (n=24)	Neigiamas kaulo bioptato pasėlis (n=21)	p
Bigės užgijimo trukmė, mėnesiai	3,57	2,48	0,03
Neužgijusi bigė	3	1	0,61
Reamputacijos (pakartotinės amputacijos)	7	5	0,75
Pakartotinio antibakterinio gydymo poreikis po amputacijos	9	5	0,36
Pritaikytas protezas	17	19	0,14

5.2. Perspektyvusis tyrimas

5.2.1. Perspektyviajame tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys

Per tiriamąjį laikotarpį atlikta 112 AGDA. 37 (33 proc.) pacientai sirgo CD, diabetinė pėda diagnozuota 19 (17 proc.) atvejų. Atlikta 31 (27,68 proc.) amputacija žemiau kelio ir 81 (72,32 proc.) amputacija virš kelio. 90 (80,4 proc.) amputacijų atlikta Respublikinėje Kauno ligoninėje. Amputacijos anamnezėje buvo 38 (33,9 proc.) atvejais. Tarpas be antibiotikų prieš amputaciją (bent dvi savaites) stebėtas 59 (52,7 proc.) pacientų. Nekontrliuojama infekcija kaip amputacijos priežastis nustatyta 18 (16,1 proc.), o didelė galūnių išemija – 73 (65,2 proc.) atvejais. 5 pacientams per tiriamąjį laikotarpį kaulo biopsijos buvo atliktos amputuojant abi kojas, 1 pacientui atliktos kaulo biopsijos amputuojant tą pačią koją žemiau kelio, o po to virš kelio. Tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai, anamnestiniai, antropometriniai, klinikiniai, laboratoriniai duomenys pateikiami 5.2.1.1 lentelėje.

5.2.1.1 lentelė. *Perspektyviajame kohortiniame tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai, anamnestiniai, antropometriniai, klinikiniai, laboratoriniai duomenys*

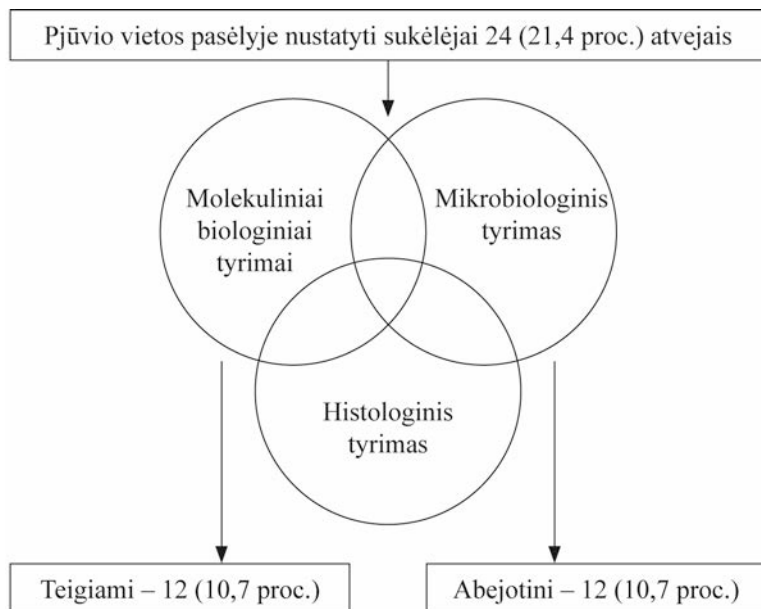
Rodiklis	Duomenys (n=112)
Amžius, metai, vidurkis	71,32 (SN=13,8)
Lytis, vyrai (proc.)	60 (53,6)
Ligoninė	
– LSMU ligoninė Kauno klinikos, n (proc.)	12 (10,7)
– Kauno klinikinė ligoninė, n (proc.)	10 (8,9)
– Respublikinė Kauno ligoninė, n (proc.)	90 (80,4)
Dešinės kojos amputacija, n (proc.)	66 (58,9)
Amputacijos lygis	
– aukščiau kelio, n (proc.)	81 (72,3)
– žemiau kelio, n (proc.)	31 (27,7)
Pradinis susirgimas	
– infekcija, n (proc.)	18 (16,1)
– trofikos sutrikimai, n (proc.)	88 (78,6)
– onkologinis susirgimas apatinėje galūnėje, n (proc.)	1 (0,9)
– trauma, n (proc.)	5 (4,5)
Pradinio susirgimo trukmė iki amputacijos, dienos, vidurkis	238,55 (SN=876,37)
Pažeista pėda, n (proc.)	100 (89,3)
Pažeista blauzda, n (proc.)	22 (19,6)
Osteoartritas, n (proc.)	22 (19,6)
Cukrinis diabetas, n (proc.)	37 (33)
Diabetinė pėda, n (proc.)	19 (17)
Trauma anamnezėje, n (proc.)	37 (33,3)
Imunosupresija, n (proc.)	3 (2,7)
Periferinių arterijų liga, n (proc.)	98 (87,5)
Kojų arterijų intervencijos anamnezėje, n (proc.)	40 (35,7)
Slaugomas pacientas, n (proc.)	31 (27,7)
Gretutinė patologija, n (proc.)	28 (25)
Amputacijos anamnezėje, n (proc.)	38 (33,9)
Trukmė nuo paciento supažindinimo su amputacija iki amputacijos atlikimo, dienos, vidurkis	2,52 (SN=4,6)
Prieš pat amputaciją vartoti antibiotikai, n (proc.)	42 (38,4)
Suminė antibakterinio gydymo trukmė prieš amputaciją, dienos, vidurkis	13,65 (SN=39,7)
Nevartoti antibiotikai prieš amputaciją bent dvi savaites (tarpas be antibiotikų), n (proc.)	59 (52,7)

5.2.1.1 lentelės tęsinys

Rodiklis	Duomenys (n=112)
Amputacijos priežastis	
– nekontroliuojama infekcija, n (proc.)	18 (16,1)
– trofikos sutrikimai, n (proc.)	20 (17,9)
– nekontroliuojamas skausmas, n (proc.)	1 (0,9)
– didelė galūnių išemija, n (proc.)	73 (65,2)
Ūgis, cm, vidurkis	170,50 (SN=9,71)
Svoris, kg, vidurkis	80,57 (SN=2,06)
Kūno masės indeksas, vidurkis	22,23 (SN=12,96)
Leukocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	12,83 (SN=4,98)
Hemoglobinas, g/l, vidurkis	117,42 (SN=29,04)
Trombocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	337,33 (SN=150,22)
C reaktyvinis baltymas, mg/l, vidurkis, n=61	136,67 (SN=96,91)
Kreatininas, $\mu\text{mol/l}$, vidurkis	116,58 (SN=101,69)
Šlapalas, mmol/l, vidurkis	10,03 (SN=7,42)
Glikemija, mmol/l, vidurkis	7,64 (SN=3,94)
Albuminas, g/l, vidurkis, n=8	43,9 (SN=19,44)
Glomerulų filtracijos greitis, ml/min., vidurkis, n=5	83,22 (SN=56,36)
Glikuotas hemoglobinas, proc., vidurkis, n=15	8,84 (SN=2,13)
Prieš amputaciją atlikta rentgenograma, n (proc.)	17 (15,2)
Rentgenogramoje rasti osteomielito požymiai, n (proc.)	12/17 (70,59)
Prieš amputaciją ar amputacijos metu atliktas pasėlis iš žaizdos, n (proc.)	15 (13,39)
Prieš amputaciją pasėlyje iš žaizdos nustatyti infekcijos sukėlėjai, n (proc.)	11 (9,8)

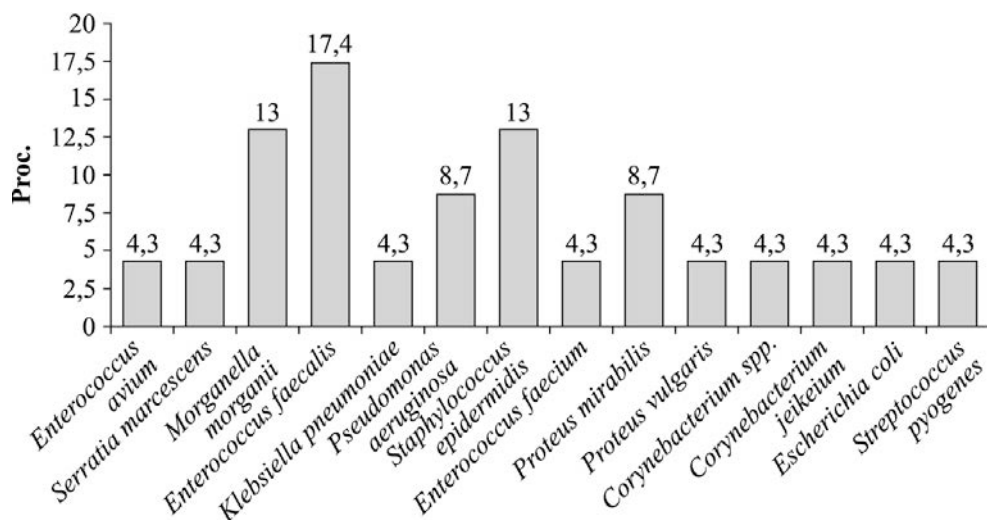
5.2.2. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsijų rezultatai ir jiems įtaką darantys veiksniai

Iš 112 AGDA BA identifikuoti infekcijos sukėlėjai 24 (21,4 proc.) atvejais.



5.2.2.1 pav. Teigiamų ir abejotinių kaulo bioptatų mikrobiologinių pasėlių patikslinimui naudoti tyrimai

Diferencijuojant teigiamus pasėlius ir abejotinus bei lyginant su BD, buvo remiamasi mikrobiologinio tyrimo (infekcijos sukėlėjo rūšies, atsoparumo antibiotikams, kiekybinio tyrimo, tapataus sukėlėjo nustatymo dviejuose pasėliuose), bakterijų tipavimo metodų (pulsuojančio lauko gelio elektroforezės, Maldi-TOF-MS) bei histologinio tyrimo rezultatais. 12 (10,7 proc.) kaulo bioptato pasėlių buvo įvertinti kaip teigiami (5.2.2.1 pav.). Teigiamų BA pasėlių sukėlėjai pavaizduoti 5.2.2.2 pav. Iš 12 teigiamų BA iš viso buvo identifikuoti 23 sukėlėjai. Dažniausiai išskirti *Enterococcus faecalis* – 4 padermės, *Morganella morganii* ir *Staphylococcus epidermidis* po 3, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis* po 2 atvejus, kitų mikroorganizmų nustatyta po vieną padermę.



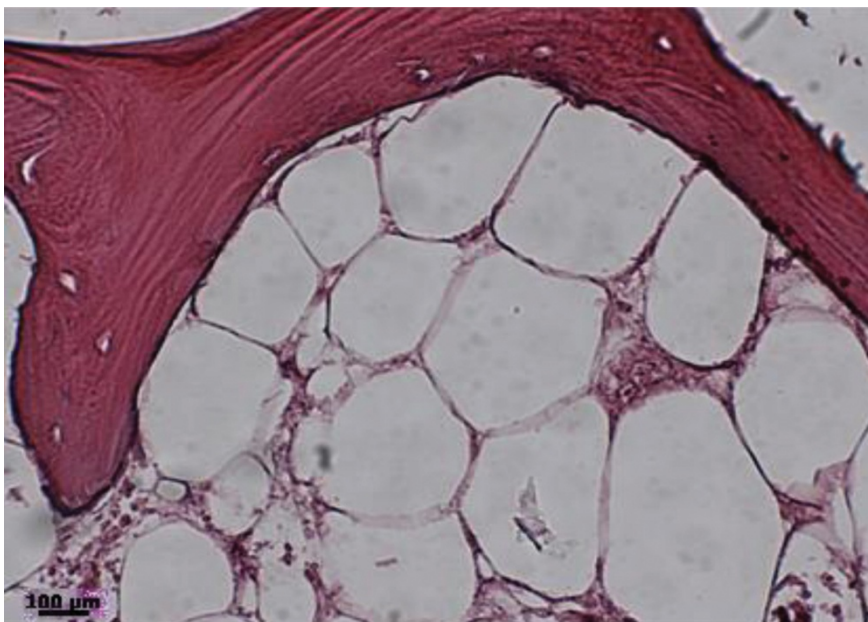
5.2.2.2 pav. Amputacijos pjūvio vietos kaulo biopstatų teigiamuose pasėliuose identifikuotų infekcijos sukėlėjų pasiskirstymas (proc.)

Dažniausiai išskirtas sukėlėjas buvo *Enterococcus faecalis*, iš kurių 83,3 proc. buvo jautrūs vankomicinui. Gramneigiamųjų infekcijos sukėlėjų atsparumas ciprofloksacinui buvo 12,5 proc. *Pseudomonas aeruginosa* buvo nustatytas 50 proc. atsparumas imipenemui ir 50 proc. atsparumas ceftazidimui.

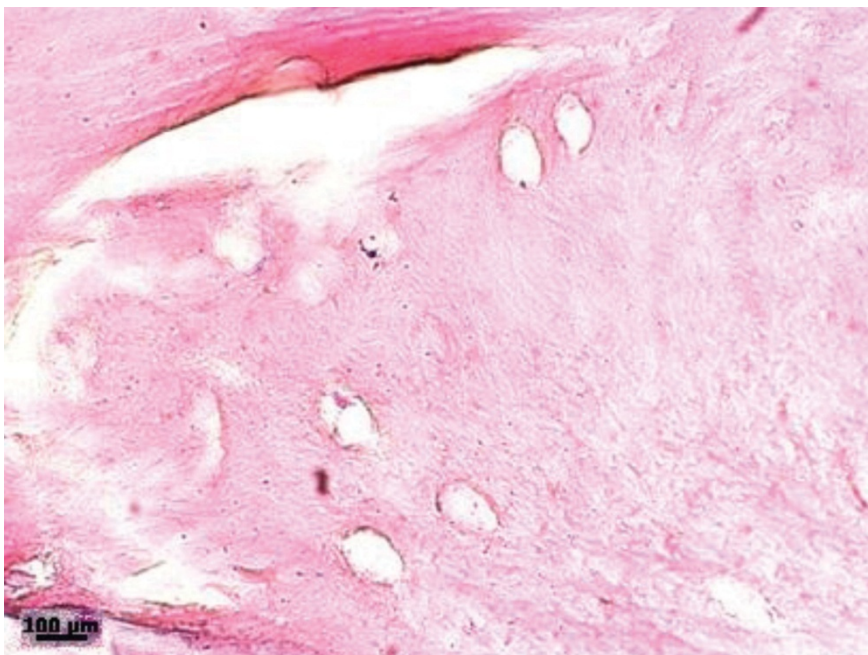
BA mikrobiologiniai pasėliai buvo abejotini 12 (10,7 proc.) atvejų, histologiniai tyrimai 13 (11,6 proc.) atvejų buvo neinformatyvūs. Iš jų 3 kaulo biopstatų rezultatai buvo abejotini tiek mikrobiologinio, tiek histologinio tyrimo metu. Palyginus BA mikrobiologinius (teigiamas pasėlis) ir histologinius (teigiamas – osteomielito požymiai) rezultatus, atmetus 22 atvejus su abejotinais tyrimų rezultatais, abiejų tyrimų rezultatai sutapo 76/90 (84,44 proc.) atvejais (5.2.2.1 lentelė). Iš visų 12 BA teigiamų mikrobiologinių pasėlių atvejų histologiniu tyrimu rasti infekcijos požymiai 3 atvejais (5.2.2.3, 5.2.2.4 pav.).

5.2.2.1 lentelė. BA histologinių ir mikrobiologinių tyrimų rezultatai

Tyrimas		Mikrobiologinis tyrimas		
		Teigiamas	Neigiamas	Iš viso
Histologinis tyrimas	Teigiamas	3	6	9
	Neigiamas	8	73	81
	Iš viso	11	79	90



5.2.2.3 pav. Normalus kaulinio audinio ir kaulų čiulpų vaizdas



5.2.2.4 pav. Lėtinio osteomielito požymiai – kaulų čiulpų ertmė užpildyta randiniu audiniu

Pacientai su nustatytu teigiamu kaulo biopato pasėliu statistiškai patikimai dažniau buvo iš LSMU ligoninės Kauno klinikos ($p<0,001$), su atlikta amputacija anamnezėje ($p=0,023$), didesniu kūno masės indeksu ($p=0,038$), jiems dažniau amputuotos galūnės žemiau kelio ($p=0,013$), dažnesnė amputacijos priežastis nustatyta nekontroliuojama infekcija ($p=0,008$), dažniau prieš amputaciją atlikta rentgenograma ir rasti osteomielito požymiai ($p=0,005$), prieš amputaciją nustatyti infekcijos sukėlėjai žaizdoje ($p<0,0001$) negu pacientams, kuriems infekcijos sukėlėjai neišaugo. CD ir tarpas be antibiotikų prieš amputaciją BA rezultatams įtakos neturėjo (5.2.2.2 lentelė).

5.2.2.2 lentelė. *Pacientų, kuriems nustatytas teigiamas arba neigiamas kaulo biopato mikrobiologinis pasėlis amputacijos pjūvio vietoje, demografiniai ir klinikiniai duomenys*

Rodiklis	Teigiamas kaulo biopato pasėlis (n=12)	Neigiamas kaulo biopato pasėlis (n=88)	p
Amžius, metai, vidurkis	64,83 (SN=17,26)	71,9 (SN=13,5)	0,318
Lytis, vyrai (proc.)	5 (41,7)	49 (55,7)	0,361
Ligoninė			<0,001
– LSMU ligoninė Kauno klinikos, n (proc.)	6 (50)	6 (6,8)	
– Kauno klinikinė ligoninė, n (proc.)	1 (8,3)	9 (10,2)	
– Respublikinė Kauno ligoninė, n (proc.)	5 (41,7)	73 (83)	
Dešinės kojos amputacija, n (proc.)	8 (66,7)	50 (56,8)	0,517
Amputacijos lygis			0,013
– aukščiau kelio, n (proc.)	5 (41,7)	67 (76,1)	
– žemiau kelio, n (proc.)	7 (58,3)	21 (23,9)	
Pradinis susirgimas			0,157
– infekcija, n (proc.)	3 (25)	13 (14,8)	
– trofikos sutrikimai, n (proc.)	7 (58,3)	71 (80,7)	
– onkologinis susirgimas apatinėje galūnėje, n (proc.)	0 (0)	1 (1,1)	
– trauma, n (proc.)	2 (16,7)	3 (3,4)	
Pradinio susirgimo trukmė iki amputacijos, dienos, vidurkis	126,33 (SN=175,49)	265,64 (SN=973,571)	0,444
Pažeista pėda, n (proc.)	10 (83,3)	80 (90,9)	0,412
Pažeista blauzda, n (proc.)	1 (8,3)	18 (20,5)	0,315
Cukrinis diabetas, n (proc.)	5 (41,7)	28 (31,8)	0,496
Diabetinė pėda, n (proc.)	3 (25)	14(15,9)	0,432
Osteoartritas, n (proc.)	1 (8,3)	17 (19,3)	0,353
Trauma anamnezėje, n (proc.)	5/11 (41,7)	29/88 (33,3)	0,559

5.2.2.2 lentelės tęsinys

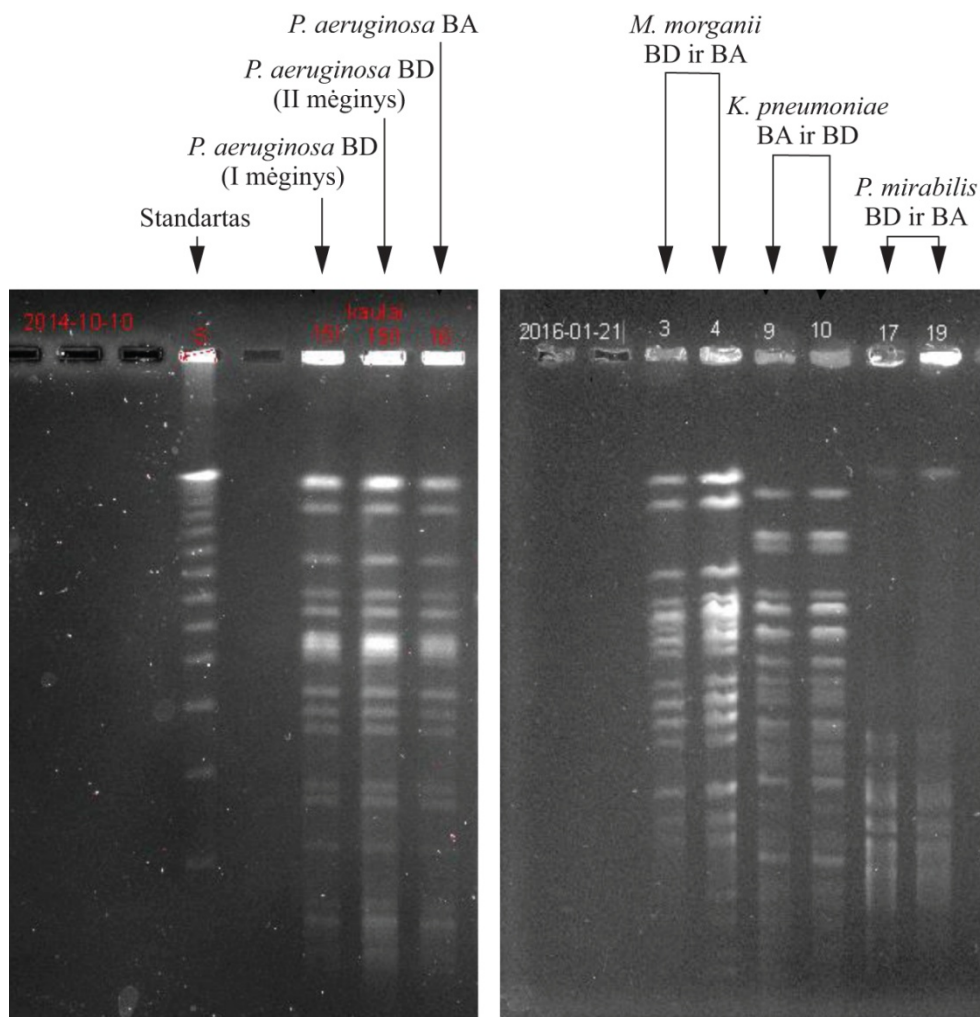
Rodiklis	Teigiamas kaulo biopato pasėlis (n=12)	Neigiamas kaulo biopato pasėlis (n=88)	p
Imunosupresija, n (proc.)	0 (0)	3 (3,4)	0,516
Periferinių arterijų liga, n (proc.)	9 (75)	79 (89,8)	0,14
Kojų arterijų intervencijos anamnezėje, n (proc.)	4 (33,3)	35 (39,8)	0,668
Slaugomas pacientas, n (proc.)	5 (41,7)	22 (25)	0,222
Gretutinė patologija, n (proc.)	0 (0)	1 (1,1)	0,905
Amputacijos anamnezėje, n (proc.)	8 (66,7)	29 (33)	0,023
Trukmė nuo paciento supažindinimo su amputacija iki amputacijos atlikimo, dienos, vidurkis	2,5 (SN=3,61)	2,28 (SN=4,63)	0,482
Prieš pat amputaciją vartoti antibiotikai, n (proc.)	5 (41,7)	36 (40,9)	0,933
Suminė antibakterinio gydymo trukmė prieš amputaciją, dienos, vidurkis	52,42 (SN=104,66)	10 (SN=19,22)	0,248
Tarpas be antibiotikų (nevertoti antibiotikai prieš amputaciją bent dvi savaites), n (proc.)	5 (41,7)	43 (48,9)	0,750
Amputacijos priežastis – nekontroliuojama infekcija, n (proc.) – trofikos sutrikimai, n (proc.) – nekontroliuojamas skausmas, n (proc.) – didelė išemija, n (proc.)	6 (50) 1 (8,3) 0 (0) 5 (41,7)	10 (11,4) 15 (17) 1 (1,1) 62 (70,5)	0,008
Ūgis, cm, vidurkis	170,09 (SN=8,84)	171,03 (SN=9,85)	0,729
Svoris, kg, vidurkis	89,09 (SN=22,1)	79,88 (SN=19,27)	0,234
Kūno masės indeksas, vidurkis	29,26 (SN=13,97)	21,2 (SN=12,83)	0,038
Leukocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	11,49 (SN=2,97)	12,94 (SN=5,15)	0,603
Hemoglobinas, g/l, vidurkis	104,5 (SN=16,74)	120,28 (SN=31,3)	0,067
Trombocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	329,92 (SN=190,48)	332,98 (SN=145,15)	0,303
C reaktyvinis baltymas, mg/l, vidurkis, n=61	137,34 (SN=92,67)	136,06 (SN=98,49)	0,821
Kreatininas, $\mu\text{mol/l}$, vidurkis	128,64 (SN=142,57)	116,39 (SN=98,55)	0,730

5.2.2.2 lentelės tęsinys

Rodiklis	Teigiamas kaulo bioptato pasėlis (n=12)	Neigiamas kaulo bioptato pasėlis (n=88)	p
Šlapalas, mmol/l, vidurkis	8,5 (SN=6,69)	10,32 (SN=7,75)	0,429
Glikemija, mmol/l, vidurkis	8,11 (SN=2,95)	7,68 (SN=4,31)	0,321
Albuminas, g/l, vidurkis, n=8	30,93 (SN=17,51)	51,68 (SN=17,5)	0,143
Glomerulų filtracijos greitis, ml/min., vidurkis, n=5	104 (SN=79,2)	69,36 (SN=49,97)	0,8
Glikuotas hemoglobinas, proc., vidurkis, n=15	7,85 (SN=1,2)	9,18 (SN=2,23)	0,421
Prieš amputaciją atlikta rentgenograma, n (proc.)	6 (50)	13 (14,77)	0,005
Rentgenogramoje rasti osteomielito požymiai, n (proc.)	3 (25)	8 (9,1)	0,005
Infekcijos sukėlėjai nustatyti prieš amputaciją žaizdoje, n (proc.)	6 (50)	5 (5,7)	<0,0001

5.2.3. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo bioptato mikrobiologinių tyrimų rezultatų palyginimas su perkutaninėmis kaulo biopsijomis distalinėje pažeistoje zonoje

Penkiems pacientams (5/12, 41,67 proc.) BA ir BD nustatyti tapatūs sukėlėjai: pas keturis ligonius BA ir BD aptikta po vieną bakteriją (*Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*), pas vieną – ir BA, ir BD aptiktos kartu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* ir *Enterococcus faecium*. Naudojant bakterijų tipavimo metodus, visiems penkiems pacientams patvirtinta identifikuotų sukėlėjų tapati padermė abiejose biopsijos zonose (5.2.3.1 pav.). BD iš viso mikroorganizmai buvo nustatyti 54 pacientams.



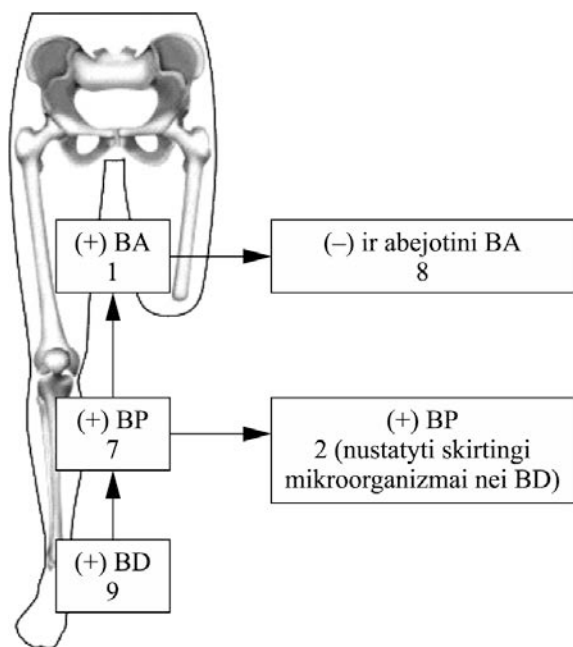
5.2.3.1 pav. Pulsuojančio lauko gelio elektroforezė

Santrumpos: 15I, 15II, 16 – vienodos *Pseudomonas aeruginosa* padermės BA, BD, S – DNR ilgio standartas nuo 100 bp iki 1000 bp (MBI fermentas), 3, 4 – vienodos *Morganella morganii* BA ir BD, 9, 10 – vienodos *Klebsiella pneumoniae* padermės BA ir BD, 17, 19 – vienodos *Proteus mirabilis* padermės BA ir BD. BA – atvira kaulo biopsija apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje, BD – perkutaninė kaulo biopsija distalinėje pažeistoje zonoje.

5.2.4. Kaulo biopsijų, atliktų tarp amputacijos pjūvio vietos ir distalinės pažeistos zonos, mikrobiologinių pasėlių rezultatai

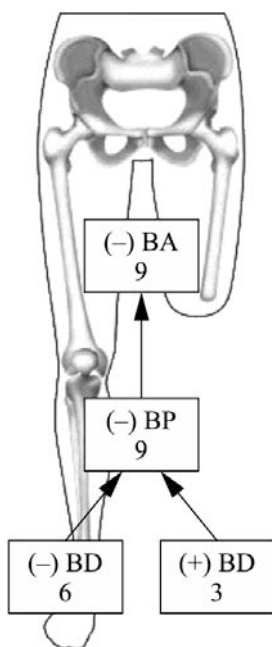
Atliekant perspektyvų tyrimą, 18 iš 81 šlaunies amputacijų metu (CD sergantiems pacientams ir/ar aiškaus osteomielito atvejais) kaulo biopsijos buvo atliktos ir planuojamoje (numanomoje) blauzdos (žemiau kelio) ampu-

tacijos vietoje (BP), t. y. biopsija tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos infekcijos plitimui įrodyti ir amputacijos radikalumui įvertinti. BP išauginti infekcijos sukėlėjai 9 (50 proc.) atvejais. Mikroorganizmas, rastas BP, nustatytas toks pats ir BD 7 (77,8 proc.) atvejais (sukėlėjo vienoda padermė patikslinta molekuliniiais biologiniais tyrimais). Iš atvejų, kuomet buvo išauginti infekcijos sukėlėjai BP, 8 (88,9 proc.) BA nebuvo jų rasta, o 1 (11,1 proc.) atveju toks pats mikroorganizmas rastas visose trijose zonos (5.2.4.1 pav., 5.2.4.1 lentelė). Nagrinėjant 9 neigiamų BP atvejus, 3 (33,3 proc.) atvejais infekcijos sukėlėjai, nustatyti pėdoje, nerasti nei blauzdos nei šlaunies lygyje, todėl blauzdos amputacija galėjo būti mažiau radikali operacija, kitų neigiamų BP pasėlių atvejais pėdos pasėliai buvo irgi neigiami, šiais atvejais amputacijos pasirinkimas šlaunies lygyje buvo dėl didelės išemijos (5.2.4.2 pav.).



5.2.4.1 pav. Teigiamų planuojamų kaulo biopstatų tarp amputacijos pjūvio vietos ir pažeistos zonos mikrobiologinių pasėlių rezultatai infekcijos plitimui nustatyti

Santrumpos: BA – atvira kaulo biopsija apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje, BD – perkutaninė kaulo biopsija distalinėje pažeistoje zonoje, BP – kaulo biopsija planuojamoje (numanomoje) amputacijos vietoje žemiau kelio, tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos, (+) – teigiamas kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis, (–) – neigiamas kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis.



5.2.4.2 pav. Neigiamų planuojamų kaulo biopstatų tarp amputacijos pjūvio vietos ir pažeistos zonos mikrobiologinių pasėlių rezultatai amputacijos radikalumui įvertinti

Santrumpos: BA – atvira kaulo biopsija apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje, BD – perkutaninė kaulo biopsija distalinėje pažeistoje zonoje, BP – kaulo biopsija planuojamoje (numanomoje) amputacijos vietoje žemiau kelio, tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos, (+) – teigiamas kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis, (-) – neigiamas kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis.

5.2.4.1 lentelė. Infekcijos sukėlėjų pasiskirstymas pas pacientus, kuriems atlikta BP, visose kaulo biopsijų zonose

Paciento Nr.	BD	BP	BA
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i>
2.	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Neišaugo
3.	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Neišaugo
4.	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Neišaugo

5.2.4.1 lentelės tęsinys

Paciento Nr.	BD	BP	BA
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> , Plazmos nekoaguliuojantis stafilokokas, <i>Acinetobacter spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Neišaugo
6.	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i>	Neišaugo
7.	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Neišaugo
8.	Neišaugo	<i>Morganella morganii</i>	Abejotina*
9.	<i>Proteus mirabilis</i>	Neišaugo**	Abejotina*
10.	<i>Streptococcus anginosus</i>	Neišaugo**	Neišaugo
11.	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Neišaugo**	Neišaugo
12.	6 Neišaugo	6 Neišaugo	5 Neišaugo, 1 abejotina*
13.	<i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Neišaugo

Santrumpos: *Abejotina – plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai 1 mėginyje <1KfV/g, **Osteomielitas arba įtariamasis osteomielitas, blauzdos amputacija galėtų būti kaip mažiau radikali operacija, BA – atvira kaulo biopsija apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietoje, BD – perkutaninė kaulo biopsija distalinėje pažeistoje zonoje, BP – kaulo biopsija planuojamoje (numanomoje) amputacijos vietoje žemiau kelio, tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos.

Įvertinus ir šiuos planuojamos blauzdos amputacijos vietos kaulo biopatato pasėlio (BP) rezultatus, pjūvio vietos pasėlyje iš viso išauginti sukėlėjai 21 (16,1 proc.) atveju, iš kurių nustatyti tokie patys ir pažeistoje distalinėje zonoje 12 (57,1 proc.) atvejų (5.2.4.2 lentelė).

5.2.4.2 lentelė. *Teigiamų kaulo biopatų mikrobiologinių pasėlių pjūvio vietoje rezultatai įtraukus biopsiją tarp amputacijos pjūvio vietos ir distalinės zonos*

	Retrospektyvusis tyrimas	Perspektyvusis tyrimas	Tik BP	Pridedant visus teigiamus BP perspektyviajame tyrime
Teigiamas kaulo biopatato pasėlis didžiosios amputacijos pjūvio vietoje	42,1 proc.	10,7 proc.	50 proc.	16,1 proc.
Tie patys mikroorganizmai nustatyti ir distalinėje zonoje	69,6 proc.	41,67 proc.	77,8 proc.	57,1 proc.

Santrumpos: BP – kaulo biopsija planuojamoje (numanomoje) amputacijos vietoje žemiau kelio, tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos.

Lyginant histologinius ir mikrobiologinius infekcijos požymius BP, atmetus abejotinus ir neinformatyvius atvejus (8 atvejais histologinis tyrimas BP buvo neinformatyvus), rezultatai sutapo 10/10 (100 proc.) (5.2.4.3 lentelė).

5.2.4.3 lentelė. *Kaulo biopsijų, atliktų tarp amputacijos pjūvio vietos ir distalinės pažeistos zonos histologinių ir mikrobiologinių tyrimų rezultatai*

Tyrimas		Mikrobiologinis tyrimas		
		Teigiamas	Neigiamas	Iš viso
Histologinis tyrimas	Teigiamas	3	0	3
	Neigiamas	0	7	7
	Iš viso	3	7	10

5.2.5. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopatato mikrobiologiniame pasėlyje išskirtų sukėlėjų įtaka bigės gijimui

Pacientams, kurių BA mikrobiologinis tyrimas buvo teigiamas, statistškai patikimai ilgiau gijo bigė, dažniau prireikė pakartotinės operacijos ir pakartotinio antibakterinio gydymo per metus laiko po amputacijos, negu pacientams, kurių BA pasėlis buvo neigiamas (5.2.5.1 lentelė). Teigiamas BA mikrobiologinis pasėlis užsitęsusio bigės gijimo riziką padidina 6,86 kartus (SR=6,86; 95 proc. PI 2,36–19,91, p=0,04), pakartotinės operacijos riziką – 6,4 (SR=6,4; 95 proc. PI 2,37–17,26, p=0,038) ir pakartotinio antibakterinio gydymo riziką – 7,75 kartus (SR=7,75; PI 3,24–18,52), p=0,002).

5.2.5.1 lentelė. Infekcijos sukėlėjų, nustatytų BA bakteriologiniu tyrimu, įtaka bigės gijimui

Rodiklis	Teigiamas kaulo bioptato pasėlis	Neigiamas kaulo bioptato pasėlis	p; SR (95 proc. PI)
Bigės užgijimo trukmė	3,59 mėn. (SN=3,91)	1,21 mėn. (SN=1,51)	0,0005
Užsitęsęs bigės gijimas (daugiau nei 6 mėn.)	2/9	1/66	0,04;6,86 (2,36–19,91)
Reamputacijos (pakartotinės amputacijos)	2/12	1/87	0,038;6,4 (2,37–17,26)
Pakartotinio antibakterinio gydymo poreikis po amputacijos	4/12	2/87	0,002;7,75 (3,24–18,52)
Pritaikytas protezas	5/12	30/87	p=0,75
Mirštamumas	6/12	36/87	p=0,77

Ankstyva pooperacinė mirtis (per 1 mėn. po AGDA) įvyko 18 (16,07 proc.) pacientų, iš viso per stebėtą laikotarpį mirė 47 (41,96 proc.) pacientai. BA rezultatai įtakos mirštamumui neturėjo.

5.2.6. Neinfekcinių veiksnių įtaka apatinių galūnių didžiųjų amputacijų baigtims

Pasitelkus stratifikuotą duomenų analizę, vertinti ir kontroliuoti galimi iškraipantys veiksniai (amžius, lytis, PAL, CD, gretutinė patologija, slaugomas ligonis). Nustatyta sąsaja tarp PAL, amžiaus, viršijančio 55 metus, vyriškos lyties ir neužgijusios bigės per 6 mėn., esant teigiamam mikrobiologiniam kaulo bioptato pasėliui pjūvio vietoje, todėl duomenys šiuose sluoksniuose analizuoti atskirai (5.2.6.1 lentelė). Kai bigė neužgijo per 6 mėn. teigiamo pasėlio pjūvio vietoje, slaugos būtinybė, CD, gretutinė patologija šiems atvejams įtakos neturėjo.

Išanalizavus atskirai grupes pagal lytį, amžių ir PAL diagnozę, nustatyta, kad teigiama BA pasižymintioje grupėje pakartotinio antibakterinio gydymo rizika yra didesnė pacientams vyrams, ≥ 55 metų ar su PAL, tuo tarpu moterims, pacientams iki 55 metų ar nesergantiems PAL teigiamas mikrobiologinis pasėlis BA nedidino pakartotinio antibakterinio gydymo rizikos.

Taikant vienmatę Kokso proporcingų rizikų regresinę analizę, įvertinti kintamieji, galintys turėti įtakos ilgesniam bigės gijimui. Nustatyta, kad lytis (izoliuota pavojaus rizika 1,426; 95 proc. PI 0,777–2,619), amžius (izoliuota pavojaus rizika 1,007; 95 proc. PI 0,981–1,034), gretutinė patologija (izoliuota pavojaus rizika 1,288; 95 proc. PI 0,416–3,987), slaugos būtinybė

(izoliuota pavojaus rizika 0,765; 95 proc. PI 0,360–1,626), PAL (izoliuota pavojaus rizika 0,551; 95 proc. PI 0,245–1,241), CD (izoliuota pavojaus rizika 1,053; 95 proc. PI 0,558–1,987) statistiškai patikimai neturėjo įtakos bigės užgijimo trukmei, neatsižvelgiant į kitų veiksnių įtaką. Pacientų su nustatytu teigiamu mikrobiologiniu pasėliu BA ilgesnio bigės gijimo rizika 3,495 karto didesnė, nei pacientų, kuriems nustatytas neigiamas mikrobiologinis pasėlis BA (santykinė rizika neatsižvelgiant į kitų veiksnių įtaką, t. y. izoliuota pavojaus rizika, yra 3,495, arba 95 proc. PI 1,355–9,013, regresijos koeficientas 1,251; $p=0,01$). Kadangi nenustatyta kitų veiksnių, galinčių reikšmingai lemti bigės gijimo laiką, daugiamatis Kokso modelis nenaudotas ir nenustatyta koreguota (standartizuota likusių veiksnių atžvilgiu) pavojaus rizika.

5.2.6.1 lentelė. Sukėlėjų, nustatytų BA bakteriologiniu tyrimu, įtaka bigės gijimui grupėse pagal lytį, amžių ir diagnozuotą periferinių arterijų ligą

	Teigiamas kaulo bioptato pasėlis	Neigiamas kaulo bioptato pasėlis	p; SR (95 proc. PI)						
			Visi pacientai	Vyrai	Moterys	Su PAL	Be PAL	Amžius	
								≥ 55	< 55
Bigės užgijimo trukmė	3,59 mėn. (SN=3,91)	1,21 mėn. (SN=1,51)	0,0005	0,003	0,062	<0,001	0,449	<0,0001	0,631
Užsitęsęs bigės gijimas (daugiau nei 6 mėn.)	2/9	1/66	0,04; 6,86 (2,36–19,91)	0,006; 0,66 (0,3–1,484)	0,268	<0,0001; 0,667 (0,379–1,174)	0,546	<0,0001; 0,667 (0,379–1,174)	0,513
Reamputacijos (pakartotinės amputacijos)	2/12	1/87	0,038; 6,4 (2,37–17,26)	1	0,054	<0,0001; 0,75 (0,503–1,119)	0,346	<0,0001; 0,750 (0,503–1,119)	0,513
Pakartotinio antibakterinio gydymo poreikis po amputacijos	4/12	2/87	0,002; 7,75 (3,24–18,52)	0,001; 18,5 (2,118–161,62)	0,051	<0,0001; 29 (3,686–228,186)	0,546	<0,0001; 30 (3,811–236,181)	0,513
Pritaikytas protezas	5/12	30/87	p=0,75						
Mirštamumas	6/12	36/87	p=0,77						

5.2.7. Cukriniu diabetu sergančių ir juo nesergančių pacientų tyrimo rezultatai

Lyginant CD sergančius pacientus su nesergančiais, CD sergantys pacientai statistiškai patikimai dažniau buvo gydyti LSMU ligoninėje Kauno klinikos ($p=0,002$), jiems dažniau buvo atliktos amputacijos žemiau kelio ($p<0,001$), dažnesnis pradinis susirgimas – infekcija ($p=0,04$), dažniau pažeista pėdos ($p=0,047$), rečiau blauzdos sritis ($p=0,031$), dažnesnės amputacijos anamnezėje ($p=0,021$), amputacijos priežastis – nekontroliuojama infekcija ($p=0,01$) negu pacientams, nesergantiems CD. Pacientams, sergantiems CD, buvo nutatytas didesnis svoris ($p<0,001$), kūno masės indeksas ($p=0,012$), leukocitų ($p<0,001$), Hb ($p=0,003$), CRB ($p=0,004$), kreatinino ($p=0,01$), glikemijos kiekis ($p<0,001$), dažniau prieš amputaciją atlikta rentgenograma ir rasti osteomielito požymiai ($p=0,012$), nustatyti sukėlėjai prieš amputaciją ($p=0,025$) negu pacientams be CD. Kaulo biopatų BA mikrobiologinių pasėlių rezultatai statistiškai patikimai nesiskyrė tarp CD sergančių ir nesergančių pacientų (5.2.7.1 lentelė).

5.2.7.1 lentelė. CD sergančių ir nesergančių pacientų palyginamoji charakteristika

Rodiklis	Cukriniu diabetu sergantys pacientai (n=37)	Cukriniu diabetu nesergantys pacientai (n=75)	p
1	2	3	4
Amžius, metai, vidurkis	69,41 (SN=12,69)	72,7 (SN=14,31)	0,493
Lytis, vyrai (proc.)	20 (54,1)	40 (53,3)	0,943
Ligoninė			
– LSMU ligoninė Kauno klinikos, n (proc.)	9 (24,3)	3 (4)	0,002
– Kauno klinikinė ligoninė, n (proc.)	1 (2,7)	9 (12)	
– Respublikinė Kauno ligoninė, n (proc.)	27 (73)	63 (84)	
Dešinės kojos amputacija, n (proc.)	19 (51,4)	47 (62,7)	0,252
Amputacijos lygis			
– aukščiau kelio, n (proc.)	17 (45,9)	64 (85,3)	<0,001
– žemiau kelio, n (proc.)	20 (54,1)	11 (14,7)	
Pradinis susirgimas			
– infekcija, n (proc.)	11 (29,7)	7 (9,3)	0,04
– trofikos sutrikimai, n (proc.)	24 (64,9)	64 (85,3)	
– onkologinis susirgimas apatinėje galūnėje, n (proc.)	0 (0)	1 (1,3)	
– onkologinis susirgimas apatinėje galūnėje, n (proc.)	2 (5,4)	3 (4)	

5.2.7.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4
Pradinio susirgimo trukmė iki amputacijos, dienos, vidurkis	63,65 (SN=94,87)	327,19 (SN=1053,927)	0,528
Pažeista pėda, n (proc.)	36 (97,3)	64 (85,3)	0,047
Pažeista blauzda, n (proc.)	3 (8,1)	19 (25,3)	0,031
Osteoartritas, n (proc.)	7 (18,9)	15 (20)	0,892
Trauma anamnezėje, n (proc.)	10 (27)	27 (36)	0,319
Imunosupresija, n (proc.)	0 (0)	3 (4)	0,218
Periferinių arterijų liga, n (proc.)	30 (81,1)	68 (90,7)	0,149
Kojų arterijų intervencijos anamnezėje, n (proc.)	13 (35,1)	27 (36)	0,928
Slaugomas pacientas, n (proc.)	8 (21,6)	23 (30,7)	0,314
Gretutinė patologija, n (proc.)	14 (37,8)	14 (18,7)	0,074
Amputacijos anamnezėje, n (proc.)	18 (48,6)	20 (26,7)	0,021
Trukmė nuo paciento supažindinimo su amputacija iki amputacijos atlikimo, dienos, vidurkis	3,35 (SN=6,18)	2,11 (SN=3,54)	0,614
Prieš pat amputaciją vartoti antibiotikai, n (proc.)	19 (51,4)	23 (30,7)	0,09
Suminė antibakterinio gydymo trukmė prieš amputaciją, dienos, vidurkis	16,52 (SN=28,23)	12,16 (SN=44,45)	0,115
Nevartoti antibiotikai prieš amputaciją bent dvi savaites, n (proc.)	14 (37,8)	45 (60)	0,085
Amputacijos priežastis – nekontroliuojama infekcija, n (proc.) – trofikos sutrikimai, n (proc.) – nekontroliuojamas skausmas, n (proc.) – didelė išemija, n (proc.)	12 (32,4) 6 (16,2) 0 (0) 19 (51,4)	6 (8) 14 (18,7) 1 (1,3) 54 (72)	0,01
Ūgis, cm, vidurkis	171,56 (SN=10,83)	169,93 (SN=8,97)	0,422
Svoris, kg, vidurkis	91,37 (SN=20,46)	74,79 (SN=15,52)	<0,001
Kūno masės indeksas, vidurkis	25,27 (SN=13,96)	20,64 (SN=12,2)	0,012
Leukocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	15,62 (SN=5,97)	11,42 (SN=3,69)	<0,001
Hemoglobinas, g/l, vidurkis	106,69 (SN=18,62)	122,71 (SN=31,79)	0,003
Trombocitai, $\times 10^9/l$, vidurkis	354,44 (SN=122,72)	328,89 (SN=162,2)	0,125

5.2.7.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4
C reaktyvinis baltymas, mg/l, vidurkis, n=61	176,4 (SN=118,47)	107,16 (SN=64,41)	0,004
Kreatininas, µmol/l, vidurkis	153,17 (SN=137,48)	95,18 (SN=74,42)	0,01
Šlapalas, mmol/l, vidurkis	10,94 (SN=6,65)	9,63 (SN=7,74)	0,059
Glikemija, mmol/l, vidurkis	10,06 (SN=5,73)	6,41 (SN=1,54)	<0,001
Albuminas, g/l, vidurkis, n=8	51,46 (SN=17,5)	31,3 (SN=18,14)	0,250
Glomerulų filtracijos greitis, ml/min,, vidurkis, n=5	83,22 (SN=56,36)	neatlikta	
Glikuotas hemoglobinas, proc., vidurkis, n=15	8,84 (SN=2,13)	neatlikta	
Prieš amputaciją atlikta rentgenograma, n (proc.)	10 (27)	7 (9,3)	
Rentgenogramoje rasti osteomielito požymiai, n (proc.)	9/10 (90)	3/7 (42,86)	0,012
Sukėlėjai, nustatyti prieš amputaciją žaizdoje, n (proc.)	7 (18,9)	4 (5,4)	0,025
Kaulo biopato amputacijos pjūvio vietoje pasėlis – teigiamas, n (proc.) – neigiamas, n (proc.) – abejotinas, n (proc.)	5 (13,5) 28 (75,7) 4 (10,8)	7 (9,3) 60 (80) 8 (10,7)	0,793
Tokie patys infekcijos sukėlėjai nustatyti pjūvio vietoje ir pažeistoje distalinėje zonoje, n (proc.)	1/5 (20)	4/7 (57,14)	0,29

Kaip minėta anksčiau (žr. 5.2.6 skyrių), CD įtakos ligos baigtims neturėjo.

5.2.8. Perkutaninės kaulo biopsijos iš pažeistos distalinės zonos mikrobiologinio pasėlio ir histologinio tyrimo duomenys

5.2.8.1 lentelėje pateikta nustatytų sukėlėjų BA ir BD pasiskirstymas. Iš 98 BD ir 23 BA identifikuotų infekcijos sukėlėjų rasta atitinkamai 50 (51,02 proc.) ir 11 (47,83 proc.) gramneigiamųjų bakterijų. BD nustatyta 16 (16,33 proc.) *Staphylococcus aureus*, iš jų 2 meticilinui atsparūs, 2 atvejais – anaerobai. BA *Staphylococcus aureus* ir anaerobų nenustatyta.

5.2.8.1 lentelė. Infekcijos sukėlėjų pasiskirstymas mikrobiologiniuose pasėliuose kaulo biopstatų pjūvio vietoje ir pažeistoje distalinėje zonoje

Kintamasis	Distalinė perkutininė kaulo biosija	Kaulo biopsija pjūvio vietoje	Sutapę infekcijos sukėlėjai distalinėje perkutininėje kaulo biosijoje ir kaulo biopsijoje pjūvio vietoje
Teigiamų kaulo biopstatų pasėlių skaičius	54	12	5
Identifikuotų sukėlėjų skaičius	98	23	7
Atskirų infekcijos sukėlėjų skaičius (proc.)			
Stafilokokai (visi)	27 (27,55)	3 (13,04)	1 (14,29)
– <i>Staphylococcus aureus</i> (visi)	16 (16,33)		
– Meticilinui atsparus <i>Staphylococcus aureus</i>	2 (2,04)		
– Plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai	11 (11,22)	3 (13,04)	1 (14,29)
Enterokokai	15 (15,31)	6 (26,09)	2 (28,57)
Streptokokai	2 (2,04)	1 (4,3)	
Kitos gramteigiamosios bakterijos	2 (2,04)	2 (8,7)	
– <i>Bacillus cereus</i>	1 (1,02)		
– <i>Corynebacterium species</i>	1 (1,02)	2 (8,7)	
Gramneigiamosios bakterijos	50 (51,02)	11 (47,83)	4 (57,14)
– <i>Morganella morganii</i>	7 (7,14)	3 (13,04)	1 (14,29)
– <i>Klebsiella species</i>	5 (5,1)	1 (4,3)	1 (14,29)
– <i>Proteus species</i>	16 (16,33)	3 (13,04)	1 (14,29)
– <i>Acinetobacter species</i>	4 (4,08)		
– <i>Citrobacter species</i>	5 (5,1)		
– <i>Serratia marcescens</i>	2 (2,04)	1 (4,3)	
– <i>Pseudomonas species</i>	5 (5,1)	2 (8,7)	1 (14,29)
– <i>Enterobacter species</i>	1 (1,02)		
– <i>Escherichia coli</i>	5 (5,1)	1 (4,3)	
Anaerobai	2 (2,04)		
– <i>Bacteroides species</i>	1 (1,02)		
– <i>Eubacterium limosum</i>	1 (1,02)		

BD histologinių ir mikrobiologinių tyrimų rezultatai visiškai sutapo 62/88 (70,45 proc.) atvejais (5.2.8.2 lentelė).

5.2.8.2 lentelė. BD histologinių ir mikrobiologinių tyrimų rezultatai

Tyrimas		Mikrobiologinis tyrimas		
		Teigiamas	Neigiamas	Iš viso
Histologinis tyrimas	Teigiamas	26	5	31
	Neigiamas	21	36	57
	Iš viso	47	41	88

5.2.9. Kaulo biopstatuose identifikuotų infekcijos sukėlėjų palyginimas su pasėlių iš žaizdos rezultatais

Pagal ligos istoriją duomenis 15-ai pacientų iš 112-os prieš amputaciją buvo paimti pasėliai ir 11-ai nustatyti infekcijos sukėlėjai iš pažeistos kojos vietos žaizdos. Infekcijos sukėlėjai, nustatyti PKB metu, 33,33 proc. atvejų sutapo su infekcijos sukėlėjais, identifikuotais pasėliuose iš žaizdos (5.2.9.1 lentelė). Visais šiais atvejais prieš amputaciją ir BA buvo jau paskirtas empirinis antibakterinis gydymas.

5.2.9.1 lentelė. Perkutaninės kaulo biopsijos pažeistoje zonoje ir pasėlių iš žaizdos metu identifikuotų infekcijos sukėlėjų palyginimas

Paciento Nr.	Perkutaninė kaulo biopsija amputacijos metu (BD)	Pasėlis iš žaizdos, atlikimo laikas iki amputacijos, dienos	Radiologiniai osteomielito požymiai	Paskutiniai vartoti antibiotikai prieš amputaciją
1	2	3	4	5
1.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	pasėlis iš žaizdos – infekcijos sukėlėjai neišaugo / 3 d.	Osteomielito požymių nėra (osteomielitas anamnezėje, atlikta mažoji kojos amputacija)	Pirmos kartos cefalosporinai, Metronidazolis
2.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> / 21 d.	Osteomielitas	Antros kartos cefalosporinai, Metronidazolis
3.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , B grupės beta hemolizinis streptokokas / 5 d.	Osteomielitas	Antros kartos cefalosporinai, Metronidazolis
4.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	<i>Enterobacter</i> spp. / 3 d.	Osteomielitas	Pirmos kartos cefalosporinai
5.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> / 5 d.	Osteomielitas	Ertapenemas

5.2.9.1 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5
6.	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> / 7 d.; <i>Enterococcus faecalis</i> / 2 d.	Nėra radiologinio tyrimo aprašymo, kliniškai ryškūs artrito požymiai	Trečios kartos cefalosporinai, Metronidazolis
7.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> / 1 d.	Radiologinis tyrimas neatliktas	Pirmos kartos cefalosporinai, Metronidazolis
8.	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> / kelios dienos	Radiologinis tyrimas neatliktas	Standacilinas
9.	<i>Morganella morganii</i>	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	Radiologinis tyrimas neatliktas	Ilgą laiką antibiotikai nevartoti
10.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i>	Nėra radiologinio tyrimo aprašymo	Pirmos kartos cefalosporinai
11.	<i>Proteus vulgaris</i>	Infekcijos sukėlėjai neišaugo / 4 d.	Osteomielitas	Antros kartos cefalosporinai, Metronidazolis
12.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	Osteomielitas	Trečios kartos cefalosporinai
13.	Infekcijos sukėlėjai neišaugo	B grupės beta hemolizinis streptokokas, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> / 7 d.	Negalima atmesti beprasidedančios destruktijos	Pirmos kartos cefalosporinai,
14.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> / 3 d.	Radiologinis tyrimas neatliktas	Ciprofloksacinas
15.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 0 d.	Abiejų šlaunikaulių svetimkūniai po osteosintezės	Trečios kartos cefalosporinai, Metronidazolis

6. TYRIMŲ REZULTATŲ PAGRINDIMAS, JŲ PATIKIMUMAS IR SANTYKIS SU KITŲ TYRĖJŲ DUOMENIMIS

Šiuo tyrimu nustatėme, kad, mikrobiologiškai išanalizavus AGDA pjūvio vietos kaulo biopstatą, infekcijos sukėlėjai identifikuojami 42–16 proc. atvejų, nors amputacija atliekama sveikų audinių zonoje ir toli nuo infekcijos židinio. Nepriklausomai nuo to, ar pacientas serga CD, ar ne, infekcinis procesas gali tyliai išplisti išilgai kaulo ir pasiekti kojos amputacijos vietą bei turėti reikšmės bigės gijimui. Tai svarbu žinoti parenkant diagnostikos ir gydymo metodus tiek pėdos, tiek vėliau ir bigės srityje.

Mūsų duomenimis, tai pirmasis tyrimas (tiek retrospektyvusis, tiek perspektyvusis multicentrinis kohortinis), nagrinėjantis pėdos infekcinio proceso galimą išplitimą į amputacijos vietą ir įtaką bigės gijimui, vertinant kaulo biopsijų rezultatus. Kitų panašių tyrimų literatūroje nerasta arba nagrinėjami tik paviršiniai mikrobiologiniai pasėliai.

Retrospektyvųjį tyrimą Prancūzijoje (Kaulų ir sąnarių infekcijų referencijos centre) palyginus su perspektyviuoju kohortiniu tyrimu Kauno ligoninėse, nustatyta kur kas daugiau infekcijos sukėlėjų pjūvio vietoje (42,1 proc.) bei daugiau tokių pačių rasta ir pažeistoje dalyje (69,6 proc.) – galbūt dėl dažniau atliekamų tausojančių operacijų, mažesnio skaičiaus įtrauktų pacientų su kraujagyslių patologija bei su tuo susijusiu didesniu kiekiu amputacijų žemiau kelio. Matome, kad į perspektyvųjį kohortinį tyrimą įtraukus pacientus su atlikta BP (t. y. pasirinkus mažiau radikalią amputacijos galimybę), infekcijos sukėlėjų, identifikuotų amputacijos pjūvio vietoje ir sutampančių su distalinės pažeistos zonos sukėlėjais, skaičius gerokai padidėja (atitinkamai nuo 10,7 proc. iki 16,1 proc. ir nuo 41,67 proc. iki 57,1 proc.). Atsižvelgus į kaulo biopsijos rezultatus, daugeliu atvejų numanoma blauzdos amputacija nebūtų radikali ir reikėtų antibakterinio gydymo. Įtrauktų pacientų su BP rezultatai yra dar papildomas argumentas infekcijos plitimui iš pėdos į amputacijos vietą patvirtinti. Taigi, galvojant apie tausojančias operacijas ir antibakterinį gydymą (šiuo metu jas stengiamasi atlikti kuo dažniau), patikimų mikrobiologinių pasėlių svarba dar labiau padidėja tiek diagnozuojant ligą, tiek pasirenkant antibakterinio gydymo taktiką. Kaulo biopstatų mikrobiologinis pasėlis yra neabejotinai svarbus, kai tenka diagnozuoti tiek pėdos, tiek bigės kaulo infekciją, nustatyti tikrus sukėlėjus ir jų jautrumą antibiotikams bei pasirinkti gydymo taktiką [7, 23].

Perspektyviojo tyrimo metu analizuoti veiksniai, galintys daryti įtaką BA rezultatams (amputacijos lygis žemiau kelio, amputacijos priežastis – nekontroliuojama infekcija, amputacijos anamnezėje, kūno masės indeksas,

rentgenogramoje rasti osteomielito požymiai, nustatyti infekcijos sukėlėjai prieš amputaciją), skiriasi nuo retrospektyviojo tyrimo (trumpesnė antibakterinio gydymo vartojimo trukmė prieš amputaciją, ilgesnis pacientų apsisprendimo dėl amputacijos laikas) irgi, matyt, dėl tų pačių priežasčių (dažnesnių tausojančių amputacijų, dažnesnių atvejų su infekcija ir retesnių su kraujagyslių patologija retrospektyviojoje studijoje). Pacientai, kuriems nustatyta teigiama kaulo biopsija, dažniau buvo iš LSMU ligoninės Kauno klinikos negu iš kitų Kauno ligoninių galimai dėl to, kad ten pasitaikė kur kas daugiau atvejų su osteomielitu ar infekcinėmis komplikacijomis.

Nustatytas PNS kiekis kaulo biopsijose atitinka literatūros duomenis ir išlieka panašus tiek perspektyviojo, tiek retrospektyviojo tyrimo rodikliuose, nors retrospektyvusis tyrimas buvo atliktas Kaulų ir sąnarių infekcijų referencijos centre patyrusio ortopedo traumatologo ir kontaminacijos rizika buvo maža. Kiti abiejuose tyrimuose identifikuoti infekcijos sukėlėjai taip pat statistškai patikimai nesiskiria. Diferencijuojant tikrus sukėlėjus nuo kontaminacijos, išlieka pakartotinių teigiamų pasėlių (tos pačios rūšies infekcijos sukėlėjų, kurie pasižymi tuo pačiu jautrumu antibiotikams, identifikavimo) svarba.

Išsagrinęs teigiamo kaulo biopato mikrobiologinio pasėlio BA įtaką bigės gijimui bei išanalizavus galimus iškraipiančius veiksnius, nustatyta, kad BA rezultatai neturi įtakos, skiriant pakartotinį antibakterinį gydymą moterims, pacientams be PAL ar <55 metų.

Kaip ir retrospektyvioji studija, taip ir perspektyvusis tyrimas parodė, kad kaulo biopsijos mikrobiologinių pasėlių rezultatams neturėjo įtakos CD ir laiko tarpas be antibiotikų prieš procedūrą. Tiek retrospektyviojo, tiek perspektyviojo tyrimo metu buvo stebėtas laiko tarpas be antibiotikų maždaug pusei atvejų. Literatūroje rastuose duomenyse apie tokios įtakos nebuvimą įtrauktas per trumpas laiko tarpas be antibiotikų arba procedūros, kurios analizuojamos kol kas dar tik debatų lygiu (kaulo fragmento biopsija per žaizdą), arba atvejai, susiję su spondilodiscitu, o ne su pėdos kaulų osteomielitu [41, 42, 73]. Mūsų tyrime šiuos rezultatus galėjo paveikti aplinkybė, kad prieš intervenciją tik vienas pacientas vartojo fluorochinolonų grupės antibiotikus ir nei vienas nevartojo rifampicino, klindamicino, kurie ilgai išlieka kaule ir gali turėti reikšmės rezultatams.

PKB duomenimis, sukėlėjų pasiskirstymas atitinka literatūros duomenis diagnozuojant diabetinės pėdos kaulų osteomielitą. Nors pasėlių iš žaizdų ir PKB rezultatų atitikimas (33,33 proc.) yra panašus kaip literatūroje pateiktuose duomenyse ir yra per mažas, kad pasėlius iš žaizdos būtų galima naudoti klinikinėje praktikoje, mūsų tyrimo rezultatais tvirtai remtis negalime, nes abu tyrimai buvo atlikti ne tuo pačiu metu (dažniausiai juos skiria kelios dienos) ir prieš PKB (kurios buvo atliekamos amputacijų metu) jau

buvo paskirtas empirinis antibakterinis gydymas pagal pasėlių iš žaizdos rezultatus. Išanalizavus kitų autorių duomenis, pasėlių iš žaizdos vertė kaulų infekcijų diagnostikai išlieka menka.

Mums atliekant tyrimą buvo įdomu ir svarbu įvertinti, ar, identifikavus infekcijos sukėlėjus kaulo biopsijos mikrobiologiniu tyrimu, randami infekcinio proceso pakitimai kitų tyrimų metu (histologinio, radiologinio). Histologinio tyrimo metu BA pakitimai rasti tik keliais kaulo biopsijos atvejais, kai jie buvo teigiamai įvertinti pagal mikrobiologinį pasėlį (3/12, 25 proc.); retrospektyviosios studijos metu šis tyrimas nebuvo vertintas. Radiologiniai tyrimai (ypač magnetinio rezonanso) perspektyviojo tyrimo metu nebuvo atliekami, o atliekant retrospektyvų tyrimą, daugeliui pacientų rutiniškai atliktas magnetinio rezonanso tyrimas, bet pakitimų amputacijos pjūvio vietoje nerasta. Todėl manome, kad bakterijos į amputacijos vietą atkeliauja ir gali būti nustatomos anksčiau, kol dar nematomi pakitimai radiologinio ar histologinio tyrimo metu, ir pirmenybė turėtų būti skiriama kaulo biopsijos mikrobiologiniam tyrimui amputacijos pjūvio vietoje. Distalinėje pažeidimo zonoje histologinių tyrimų reikšmė išlieka.

Pasitelkę molekulinis biologinius tyrimus nustatėme, kad apie vienodą sukėlėjų padermę klinikinėje praktikoje galima spręsti iš pakartotinai identifikuotų infekcijos sukėlėjų, kurie yra tos pačios rūšies ir pasižymi tuo pačiu atsparumu antibiotikams. Mokslinėje literatūroje laikoma, kad tos pačios rūšies sukėlėjai, pasižymintys tuo pačiu atsparumu antibiotikams, atitinka tą pačią padermę 93,3 proc. [84].

Studija turėjo keletą trūkumų. Tyrimai, atlikti Kauno ligoninėse ir Prancūzijos kaulų ir sąnarių referencijos centre skyrėsi ir imtimi (atitinkamai daugiau kraujagyslių patologijos ir infekcinių komplikacijų), ir tyrimo dizainu (atitinkamai perspektyvusis multicentrinis kohortinis ir retrospektyvusis multicentrinis kohortinis), be to, kai kurie tyrimai nebuvo įvertinti (atitinkamai magnetinis rezonansas ir histologinis, molekuliniai biologiniai tyrimai, kaulo biopsija tarp pjūvio vietos ir pažeistos zonos), todėl juos lyginti nėra labai tikslinga. Tačiau mūsų perspektyviojo kohortinio multicentrinio tyrimo tikslas buvo pratęsti tyrimą, patvirtinti hipotezę, todėl pasirinktas šis studijos dizainas bei papildomi tyrimai (dėl to perspektyviajame tyrime neliko retrospektyviojo trūkumų – mažos imties, retrospektyvaus dizaino, neįvertinto histologinio tyrimo). Kitas trūkumas yra tas, kad dėl organizacinių dalykų, besikeičiančių chirurgų, daug įtrauktų ligoninių ir klinikų, kai kurių skubių operacijų ir būtinos biopsijos amputacijos metu, nepavyko dalyvauti ir paimti kaulo biopsijų visų AGDA metu per perspektyviojo kohortinio tyrimo laikotarpį, nes kartais tiesiog nebuvo galimybių sužinoti, kad vyksta amputacija. Įvertinus LSMU Endokrinologijos klinikos kolektyvo surinktus duomenis, į mūsų tyrimą galėjo būti įtraukta mažiau

negu pusė pacientų, kuriems per tiriamąjį laikotarpį buvo atliktos AGDA. Ir vis dėlto mūsų tyrimo imtis yra pakankama, norint įrodyti nustatytų sukėlėjų BA įtaką ligos išėjimui po operacijos, ir pacientai į studiją įtraukti visi iš eilės sutikę dalyvauti ir apie kuriuos buvo sužinota (informavo chirurgai, kitas personalas, stebėti operacijų planai, dalyvauta penkiامينutėse, skambinta chirurgams prieš jiems išeinant į operacinę, parengtos trumpos atmintinės su nuorodomis ryšiui palaikyti, supažindinta su atliekamu tyrimu), todėl pacientų atrankos nebuvo. Prie tyrimo trūkumų galima priskirti ir aplinkybę, kad kaulo biopsija numanomoje mažiau radikali amputacijos vietoje (BP) buvo atlikta ne visiems ligoniams, kuriems galūnė buvo amputuota aukščiau kelio. Todėl kai kurių pacientų tyrimo protokolas šiek tiek skyrėsi. Tai iš dalies lėmė papildomi finansiniai resursai. Tačiau mūsų BP tyrimo tikslas buvo papildomas argumentas infekcinio proceso plitimui įrodyti, todėl BP buvo atliekama amputacijų aukščiau kelio metu diabetikams ir/ar akivaizdaus osteomielito atvejais (kai infekcinių komplikacijų rizika didžiausia).

Nepaisant šių trūkumų, mūsų tyrimas yra vertingas tiek kaulų infekcijų patogenezės bei jų plitimo patikslinimui (bakterijos pakyla iš pėdos, o ne per kraują, iš gretimo infekcijos židinio ar nuo odos), tiek praktine prasme. Tyrimas įrodo, kad svarbu tinkama pėdos kaulo infekcijos diagnostika (įvertinti patikimus mikrobiologinius pasėlius; esant kaulo infekcijai, ap-svarstyti PKB galimybę; penetruojančius į kaulą ir ilgai jame išsilaikančius antibiotikus vartojančiam pacientui prieš kaulo biopsiją 2 sav. neskirti antibiotikų) ir gydymas (antibakterinis gydymas, penetruojantis į kaulą, veikiantis biofilmą, pakankamai ilgas – ne mažiau kaip 4–6 sav.). Per ampu-tacijas, atliekamas dėl infekcinių komplikacijų, ypač mažiau radikalias, kaulo biopsija pjūvio vietoje turi didelę reikšmę siekiant nustatyti patikimus infekcijos sukėlėjus, jų atsparumą antibiotikams ir koreguojant empirinį antibakterinį gydymą bigės infekcijos atvejais. Išlieka tausojančių operacijų ir antibakterinio gydymo pagal patikimus mikrobiologinius pasėlius svarba.

IŠVADOS

1. Nors apatinių galūnių didžiosios amputacijos atliekamos toli nuo infekcijos židinio, kaulo biopate iš pjūvio vietos 16,1–42,1 proc. atvejų rasti infekcijos sukėlėjai. Daugumoje atvejų mikroorganizmai aptikti amputacijų pjūvio vietos kaulo biopate nesant pakitimų histologiniame tyrime. Amputacijos atsisakymas, trumpesnis gydymas antibiotikais prieš amputaciją, infekcinės komplikacijos, mažiau radikalios amputacijos pasirinkimas, amputacija anamnezėje sąlygojo infekcinį procesą amputacijos pjūvio vietoje.
2. Nustatyta, kad infekcijos sukėlėjai 57,1–69,6 proc. atvejų plinta išilgai kaulo iš pėdos iki amputacijos vietos. Infekcijos sukėlėjų plitimą įrodo 77,8 proc. atvejų nustatytas jų tapatumas pėdoje ir zonoje tarp pėdos ir amputacijos vietos.
3. Infekcijos sukėlėjai amputacijos vietoje ilgina bigės gijimą 6,9 karto (95 proc. PI 2,4–19,9), didina pakartotinės operacijos riziką 6,4 (95 proc. PI 2,4–17,3) ir pakartotinio antibakterinio gydymo riziką 7,8 kartus (95 proc. PI 3,2–18,5).

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Įtariant diabetinės pėdos kaulų osteomielitą, tiksliausias etiologinės diagnostikos metodas išlieka PKB. Atsižvelgiant į tai, kad tyrimas yra invazinis, sudėtingas atlikti pirštų srityje, PKB rekomenduojama šiais atvejais:
 - a) Neaiški osteomielito diagnozė pagal klinikinius ir radiologinius požymius, norima tikslios diagnozės, apsisprendžiant dėl ankstyvo chirurginio, ilgo antibakterinio gydymo arba kai prie įtartinio kaulo planuojamos metalo konstrukcijos;
 - b) Neigiami (arba neaiškūs, įtariamas didelis atsparumas antibiotikams) minkštųjų audinių, kraujo mikrobiologinio tyrimo rezultatai;
 - c) Nėra efekto (progresuoja kaulo pažeidimas, išlieka padidėję uždegiminiai rodikliai) gydant empiriniu antibakteriniu gydymu arba antibakteriniu gydymu pagal pasėlių rezultatus (turėtų būti apsvastyta kaulo rezekcija);
 - d) Planuojama skirti antibiotikus, ypač efektyvius sergant osteomielitu, tačiau esant didelei rizikai išsivystyti mikroorganizmų atsparumui jiems (rifampicinas, fluorochinolonai, fuzidino r. ar klindamicinas).
2. Jeigu amputuotoje kojoje, pjūvio zonoje, randami osteomielito požymiai ar infekcijos sukėlėjai, būtų galima skirti ar koreguoti antibakterinį gydymą ir jo trukmę, atsižvelgiant į rastų per kaulo biopsiją infekcijos sukėlėjų jautrumą antibiotikams ir osteomielito požymius, ir tai galėtų pagerinti bigės gijimą ir sumažinti infekcijos epizodų pasikartojimą ateityje.
3. Kadangi bakterijos randamos anksčiau, kol dar amputacijos pjūvio vietoje nepasireiškia kaulo pakitimai, matomi radiologinio ar histologinio tyrimo metu, rekomenduojama teikti pirmenybę kaulo bioptato mikrobiologiniam tyrimui, tačiau įtariant pėdos osteomielitą išlieka kombinuoto mikrobiologinio ir histologinio kaulo bioptato tyrimo svarba.
4. Kadangi nustatytas galimas pėdos infekcijos išplitimas iki amputacijos vietos, svarbu gydyti pėdos infekciją, o kai yra pažeistas kaulas (lėtinio osteomielito, potrauminio osteito atveju), parinktas antibakterinis gydymas turi veikti biofilmą, penetruoti į kaulą (ypač rifampicinas, fluorochinolonai, klindamicinas, fuzidino r., daptomicinas) ir turi būti skiriamas ilgą laiką (ne mažiau kaip 4–6 savaites), neskiriant monoterapijos,

spřesti dël pędos diagnostinės PKB, kad bŭtų tiksliai nustatyti infekcijos sukęlęjai (žr. indikacijas ir atlikimo techniką aukščiau).

5. Numatyta amputacija neatidęliojama, pacientų apsisprendimui galętų padęti psichologinė pagalba, bendravimas su pacientais, kuriems jau pritaikyti kojų protezai.
6. Kaulo biopsiją amputacijos pjŭvio vietoje bŭtų tikslinga atlikti pacientams, sergantiems osteomielitu, kai galŭnę amputuojama dël infekcinių komplikacijų, ypač mažiau radikalių (blauzdos) amputacijų atvejais.

DISERTACIJAI RENGTI NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aulivola B, Hile CN, Hamdan AD, Sheahan MG, Veraldi JR, Skillman JJ, et al. Major lower extremity amputation outcome of a modern series. *Arch Surg* 2004;139:395–9.
2. Harris AM, Althausen PL, Kellam J, Bosse MJ, Castillo R. Complications following limb-threatening lower extremity trauma. *J Orthop Trauma* 2009;23(1):1–6.
3. de Godoy JM, Ribeiro JV, Caracanhas LA, de Godoy MF. Hospital infection after major amputations. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010;19:15.
4. Moller BN, Solund K, Hansen SL. Wound infection after lower extremity amputation because of ischemia. *Arch Orthop Trauma Surg* 1985;104(4):262–4.
5. Vaznašienė D, Beltrand E, Laiskonis AP, Yazdanpanah Y, Migaud H, Senneville E. Major amputation of lower extremity: prognostic value of positive bone biopsy cultures. *OTSR* 2013;99(1):88–93.
6. Triponis V, Triponienė D, Vaisnyte B, Scerbinskas S. Neuroischeminės pėdos infekcija ir revaskuliarizacijos galimybės. *Lietuvos chirurgija* 2003;1(1):79–83.
7. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 IDSA clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2012;54:132–73.
8. Lipsky BA, Aragon-Sanchez J, Diggle M, Embil J, Kono S, Lavery L, et al. IWGDF Guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. Available at: <http://iwgdf.org/guidelines/guidance-on-infection/>.
9. Garšvienė R, Pantelejeva O. Galūnių protezavimas po amputacijos Lietuvos gydytojų žurnalas 2012;10.
10. Nather A, Bee CS, Huak CY, Chew JL, Lin CB, Neo S, et al. Epidemiology of diabetic foot problems and predictive factors for limb loss. *J Diabetes Complications*. 2008; 22(2):77-82.
11. Pickwell K, Siersma V, Kars M, Apelqvist J, Bakker K, Edmonds M, et al. Predictors of lower-extremity amputation in patients with an infected diabetic foot ulcer. *Diabetes Care* 2015;38(5):852-7.
12. Lipsky BA, Weigelt JA, Sun X, Johannes RS, Derby KG, Tabak YP. Developing and Validating a Risk Score for Lower-Extremity Amputation in Patients Hospitalized for a Diabetic Foot Infection. *Diabetes Care* 2011;34(8):1695–700.
13. Valinčiūtė A, Balsytė E, Budrikaitė I, Vaznašienė D, Šulcaitė R. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai sergantiems cukriniu diabetu. Available at: <http://smd.lt/dokumentai/teziu-knygos/...2014>.
14. Rogožinskaja V, Vaznašienė D. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai pacientams su periferinių arterijų liga nesergantiems cukriniu diabetu, žaizdų ir antibakterinio gydymo įtaka. Available at: <http://smd.lt/dokumentai/teziu-knygos/...2015>.
15. Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Mohler MJ, Wendel CS, Lipsky BA. Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29(6): 1288–93.
16. Armstrong DG, Lavery LA, Harkless LB. Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care* 1998;21(5):855-9.
17. Mills Sr JL, Conte MS, Armstrong DG, Pomposelli FB, Schanzer A, Sidawy AN, et al. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification

- System: Risk stratification based on Wound, Ischemia, and foot Infection. *Journal of Vascular Surgery* 2014;1(59):220–34.
18. Lavery LA, Armstrong DG, Murdoch DP, Peters EJ, Lipsky BA. Validation of the Infectious Diseases Society of America's diabetic foot infection classification system. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 562–5.
 19. Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, Jude E, Piaggese A, Bakker K, et al. High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. *Diabetologia* 2007; 50:18–25.
 20. Prompers L, Schaper N, Apelqvist J, Edmonds M, Jude E, Mauricio D. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. *Diabetologia* 2008;51:747–55.
 21. Berridge DC, Slack RCB, Hopkinson BR, Makin GS. A bacteriological survey of amputation wound Sepsis. *J Hosp Infect* 1989;13:167–72.
 22. Akinyoola AL, Ojo OD, Oginni LM. Microbiology of amputation wound infection in a Nigerian setting. *J Wound Care*. 2008;17(5):202, 204–6.
 23. Dutronc H, Gobet A, Dauchy FA, Klotz R, Cazanave C, Garcia G, et al. Stump infections after major lower-limb amputation: a 10-year retrospective study. *Med Mal Infect*. 2013;43(11–12):456–60.
 24. Lipsky BA, Peters EJG, Senneville E, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28(Suppl. 1):163–78.
 25. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;36:369–77.
 26. Uçkay I, Jugun K, Gamulin A, Wagener J, Hoffmeyer P, Lew D. Chronic Osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep* 2012;14:566–75.
 27. Lipsky BA, Berendt AR, Embil J, De Lalla F. Diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20 Suppl 1:S56–64.
 28. Weaver PC, Chattopadhyay B, Angel J. An investigation into the spread of bacterial infection in lower limb amputations. *Br J Surg* 1973;60:723–9.
 29. Ayliffe GAJ, Lowbury EJJ. Sources of gas gangrene in hospital. *Br Med J* 1969;2(2653):333–7.
 30. Parker MT. Postoperative clostridial infections in Britain. *Br Med J* 1969;3:671–6.
 31. Senneville E, Melliez H, Beltrand E, Legout L, Valette M, Cazaubiel M, et al. Culture of Percutaneous Bone Biopsy Specimens for Diagnosis of Diabetic Foot Osteomyelitis: Concordance with Ulcer Swab Cultures. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42:57–62.
 32. Kessler L, Piemont Y, Ortega F et al. Comparison of microbiological results of needle puncture vs. superficial swab in infected diabetic foot ulcer with osteomyelitis. *Diabet Med* 2006;23(1):99–102.
 33. Marrie TJ, Costerton JW. Mode of growth of bacterial pathogens in chronic polymicrobial human osteomyelitis. *Journal of clinical microbiology* 1985;924–933.
 34. Perry JL, Ballou DR, Salyer JL. Inhibitory properties of a swab transport device. *J Clin Microbiol* 1997;35:3367–3368.
 35. Elamurugan TP, Jagdish S, Kate V, Chandra Parija S. Role of bone biopsy specimen culture in the management of diabetic foot osteomyelitis. *Int J Surg* 2011;9(3):214–6.
 36. Slater RA, Lazarovitch T, Boldur I, et al. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone. *Diabet Med* 2004;21:705–9.

37. Senneville E, Lombart A, Beltrand E, Valette M, Legout L, Cazaubiel M, et al. Outcome of diabetic foot osteomyelitis treated nonsurgically: a retrospective cohort study. *Diabetes Care* 2008;31: 637-42.
38. Senneville E, Gaworowska D, Topolinski H, Devemy F, Nguyen S, Singer B, et al. Outcome of patients with diabetes with negative percutaneous bone biopsy performed for suspicion of osteomyelitis of the foot. *Diabet Med*. 2012;29(1):56-61.
39. Khatri G, Wagner DK, Sohnle PG. Effect of bone biopsy in guiding antimicrobial therapy for osteomyelitis complicating open wounds. *Am J Med Sci*. 2001;321(6): 367-71.
40. Senneville E, Morant H, Descamps D, Dekeyser S, Beltrand E, Singer B, et al. Needle Puncture and Transcutaneous Bone Biopsy Cultures Are Inconsistent in Patients with Diabetes and Suspected Osteomyelitis of the Foot. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:888-93.
41. Wu JS, Gorbachova T, Morrison WB, Haims AH. Imaging-guided bone biopsy for osteomyelitis: are there factors associated with positive or negative cultures? *AJR Am J Roentgenol*. 2007;188(6):1529-34.
42. Lesens O, Desbiez F, Vidal M, Robin F, Descamps S, Beytout J, et al. Culture of per-wound bone specimens: a simplified approach for the medical management of diabetic foot osteomyelitis. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(2):285-91.
43. Mackowiak PA, Jones SR, Smith JW. Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA* 1978;239(26):2772-5.
44. Perry CR, Pearson RL, Miller GA. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73: 745-9.
45. Patzakis MJ, Wilkins J, Kumar J, Holtom P, Greenbaum B, Ressler R. Comparison of the results of bacterial cultures from multiple sites in chronic osteomyelitis of long bones. A prospective study. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:664-6.
46. Mousa HA. Evaluation of sinus-tract cultures in chronic bone infection. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79: 567-9.
47. Zuluaga AF, Galvis W, Jaimes F, Vesga O. Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study. *BMC Infect Dis* 2002;2: 8-16.
48. Agarwal S, Zahid M, Sherwani MK, Abbas M, Huda N, Khan AQ. Comparison of the results of sinus tract culture and sequestrum culture in chronic osteomyelitis. *Acta Orthop Belg* 2005; 71:209-12.
49. Onuminya JE. A prospective evaluation of the diagnostic value of sinus specimen cultures in chronic osteomyelitis. *Trop Doct* 2006;36: 38-39.
50. Ulug M, Ayaz C, Celen MK, Geyik MF, Hosoglu S, Necmioglu S. Are sinus-track cultures reliable for identifying the causative agent in chronic osteomyelitis? *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(11):1565-70.
51. Akinyoola AL, Adegbehingbe OO, Aboderin AO. Therapeutic decision in chronic osteomyelitis: sinus track culture versus intraoperative bone culture. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(4):449-53.
52. Ertugrul MB, Baktiroglu S, Salman S, Unal S, Aksoy M, Berberoglu K, et al. Pathogens isolated from deep soft tissue and bone in patients with diabetic foot infections. *Am Podiatr Med Assoc* 2008;98(4):290-5.

53. Bernard L, Uçkay I, Vuagnat A, Assal M, Stern R, Rohner P, et al. Two consecutive deep sinus tract cultures predict the pathogen of osteomyelitis. *International Journal of Infectious Diseases* 2010;5(14):390–3.
54. Bernard L, Assal M, Garzoni C, Uçkay I. Predicting the pathogen of diabetic toe osteomyelitis by two consecutive ulcer cultures with bone contact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(2):279–81.
55. Mickey D. Bone biopsy and cultures: Recommendations in Suspected Osteomyelitis. Available at: http://www.podiatryinstitute.com/pdfs/Update_1995/1995_55.pdf.
56. Richard JL, Lavigne JP, Got I, Hartemann A, Malgrange D, Tsirtsikolou D, et al. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: Results of the French OPIDIA study. *Diabetes Metab*. 2011;37(3):208–15.
57. Diamantopoulos EJ, Haritos D, Yfandi G, Grigoriadou M, Margariti G, Paniara O, et al. Management and outcome of severe diabetic foot infections. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106(4):346–52.
58. Duda SH, Johst U, Krahmer K, Pereira P, König C, Schäfer J, et al. Technique and results of CT-guided percutaneous bone biopsy. *Orthopade* 2001;30(8):545–50.
59. Aslangul E, M'bemba J, Caillat-Vigneron N, Coignard S, Larger E, Boitard C, et al. Diagnosing diabetic foot osteomyelitis in patients without signs of soft tissue infection by coupling hybrid 67Ga SPECT/CT with bedside percutaneous bone puncture. *Diabetes Care* 2013;36: 2203–10.
60. Pressney I, Saifuddin A. Percutaneous image-guided needle biopsy of clavicle lesions: a retrospective study of diagnostic yield with description of safe biopsy routes in 55 cases. *Skeletal Radiol* 2015;44:497–503.
61. Eric Senneville. Apport de la biopsie osseuse transcutanée dans le traitement de l'osteite du pied diabétique. Human health and pathology. Université du Droit et de la Santé Lille II, 2011. French. <NNT : 2011LIL2S008>. <tel-00674593> Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00674593/document>.
62. Richard JL, Lavigne JP, Got I, Heurtier A, Malgrange D, Tsirtsikolou D, et al. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: Results of the French OPIDIA study. *Diabetes Metab* 2011;37(3):208–15.
63. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis* 1997;25(6):1318–26.
64. Chantelau E, Wolf A, Ozdemir S, Hachmoller A, Ramp U. Bone Histomorphology May Be Unremarkable in Diabetes Mellitus *Medizinische Klinik* 2007;102:429–33.
65. Berendt AR, Peters EJ, Bakker K, Embil JM, Eneroth M, Hinchliffe RJ, et al. Diabetic foot osteomyelitis: a progress report on diagnosis and a systematic review of treatment. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:S145–61.
66. Weiner RD, Viselli SJ, Fulkert KA, Accetta P. Histology versus Microbiology for Accuracy in Identification of Osteomyelitis in the Diabetic Foot. *J Foot Ankle Surg* 2011;50(2):197–200.
67. Lavery LA, Armstrong DG, Peters EJ, Lipsky BA. Probe-to-bone test for diagnosing diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Care* 2007;30:270–4.
68. White LM, Schweitzer ME, Deely DM, Gannon F. Study of osteomyelitis: utility of combined histologic and microbiologic evaluation of percutaneous biopsy samples. *Radiology* 1995;197(3):840–2.
69. Meyr AJ, Singh S, Zhang X, Khilko N, Mukherjee A, Sheridan MJ, et al. Statistical reliability of bone biopsy for the diagnosis of diabetic foot osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg* 2011; 50:663–7.

70. Aragon-Sanchez FJ, Cabrera-Galvan JJ, Quintana-Marrero Y, Hernandez-Herrero MJ, Lazaro-Martinez JL, Garcia-Morales E, et al. Outcomes of surgical treatment of diabetic foot osteomyelitis: a series of 185 patients with histopathological confirmation of bone involvement. *Diabetologia* 2008;51:1962-70.
71. Cecilia-Matilla A, Lazaro-Martinez JL, Aragon-Sanchez J. Statistical reliability of bone biopsy for the diagnosis of diabetic foot osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg* 2013;52:692.
72. Witso E, Persen L, Loseth K, Bergh K. Adsorption and release of antibiotics from morselized cancellous bone: in vitro studies of 8 antibiotics. *Acta Orthop Scand* 1999; 70:298–304.
73. Marschall J, Bhavan KP, Olsen MA, Fraser VJ, Wright NM, Warren DK. The impact of prebiopsy antibiotics on pathogen recovery in hematogenous vertebral osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 2011;52:867–72.
74. Chew FS, Kline MJ. Diagnostic yield of CT-guided percutaneous aspiration procedures in suspected spontaneous infectious diskitis. *Radiology* 2001;218(1):211-4.
75. Rankine JJ, Barron DA, Robinson P, Millner PA, Dickson RA. Therapeutic impact of percutaneous spinal biopsy in spinal infection. *Postgrad Med J* 2004;80:607–9.
76. Borowski AM, Crow WN, Hadjipavlou AG, Chaljub G, Mader J, Cesani F, et al. Interventional radiology case conference: the University of Texas Medical Branch. Percutaneous management of pyogenic spondylodiskitis. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170:1587–92.
77. Zuluaga AF, Galvis W, Saldarriaga JG, Agudelo M, Salazar BE, Vesga O. Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Arch Intern Med* 2006; 166(1):95-100.
78. Turkington C, Ashby B. *The Encyclopedia of Infectious Diseases* 2007.
79. Calderini C, Cioni F, Haddoub S, Maccanelli F, Magotti MG, Tardio S. Therapeutic approach to "diabetic foot" complications. *Acta Biomed* 2014;85(3):189-204.
80. Aragon-Sanchez J, Lázaro-Martínez JL, Hernández-Herrero MJ, Quintana-Marrero Y, Cabrera-Galván JJ. Clinical significance of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* from bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diabet Foot Ankle* 2010;1: 10.3402/dfa.v1i0.5418.
81. Lavery LA, Sariaya M, Ashry H, Harkless LB. Microbiology of osteomyelitis in diabetic foot infections. *J Foot Ankle Surg* 1995;34:61–4.
82. Newman LG, Waller J, Palestro CJ, Schwartz M, Klein MJ, Hermann G, et al. Unsuspected osteomyelitis in diabetic foot ulcers. Diagnosis and monitoring by leukocyte scanning with indium in 111 oxyquinoline. *JAMA* 1991;266:1246–51.
83. Tornero E, García-Oltra E, García-Ramiro S, Martínez-Pastor JC, Bosch J, Climent C, et al. Prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Int J Artif Organs* 2012;35(10):884-92.
84. Abdul Rahman Z, Hamzah SH, Hassan SA, Osman S, Md Noor SS. The significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a low resource setting. *J Infect Dev Ctries* 2013;7(6):448–52.
85. Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating culture samples representing coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods. *J Clin Microbiol* 2009;47(10):3255-60.
86. Ikegaya S, Iwasaki H, Ueda T. Clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from blood culture samples of patients with hematological disorders; true bacteremia or contamination. *Rinsho Ketsueki* 2010;51(6):398-401.

87. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 2004;42:5614–9.
88. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect* 2007;9:460–5.
89. M. Titécat, C. Loïez, E. Senneville, H. Migaud, R. Courcol, F. Wallet. From Contamination To Virulence In *Staphylococcus Epidermidis* Strains Genetic Markers Involved In Prosthetic Joint Infections. ICAAC 2013.
90. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009;394(3):731–42.
91. Call DR. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiol* 2005;31(2):91–9.
92. Richard JL, Lavigne JP, Sotto A. Diabetes and foot infection: more than double trouble. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012 Feb;28 Suppl 1:46–53.
93. Sotto A, Lina G, Richard JL, Combescure C, Bourg G, Vidal L, et al. Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot ulcers: a new paradigm. *Diabetes Care* 2008;31(12):2318–24.
94. Sotto A, Richard JL, Messad N, Molinari N, Jourdan N, Schuldiner S, et al. Distinguishing colonization from infection with *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers with miniaturized oligonucleotide arrays: a French multicenter study. *Diabetes Care* 2012;35(3):617–23.
95. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2009;9(1):32–47.
96. Redkar R, Kalns J, Butler W, Krock L, McCleskey F, Salmen A, et al. Identification of bacteria from a non-healing diabetic foot wound by 16 S rDNA sequencing. *Mol Cell Probes* 2000;14(3):163–9.
97. Fernandez-Cruz A, Marín M, Castelo L, Usubillaga R, Martín-Rabadan P, Bouza E. *Legionella micdadei*, a new cause of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9):3409–10.
98. Gressier M, Mbayo D, Deramond H, Grados F, Eb F, Canarelli B. First case of human spondylodiscitis due to *Shewanella* algae. *Int J Infect Dis*. 2010;14 Suppl 3:e261–4.
99. Aragón-Sánchez J. Evidences and controversies about recurrence of diabetic foot osteomyelitis: a personal view and an illustrated guide for understanding. *Int J Low Extrem Wounds* 2012;11(2):88–106.
100. Kronig I, Vaudaux P, Suva D, Lew D, Uckay I. Acute and chronic osteomyelitis. *Clinical infectious diseases* edited by Schlossberg D. 2015. Second edition:453.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai:

1. Vaznašienė D, Sulcaitė R, Vitkauskienė A, Špucis A, Reingardas A, Kymantas V, et al. Section's osseous slice biopsy during major amputation of lower extremity: preliminary results of prospective cohort study. BMC Infectious Diseases 2015;15(1):247.
2. Vaznašienė D. et al. Major amputation of lower extremity: prognostic value of positive bone biopsy cultures. Orthop Traumatol Surg Res 2013; 99(1):88-93.

Kitos publikacijos, susiję su disertacijos tema:

1. Vaznašienė D, Šulcaitė R, Mickienė A, Jomantienė D, Špucis A, Senneville E. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsija: pirmieji perspektyvaus kohortinio tyrimo rezultatai Kauno ligoninėse. VII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“. Konferencijos pranešimų tezės. 2014.
2. Asta Valinčiūtė, Eglė Balsytė, Inga Budrikaitė, Danguolė Vaznašienė, Rita Šulcaitė. Perkutaninės kaulo biopsijos reikšmė osteomielito etiologinėje diagnostikoje cukriniu diabetu sergantiems pacientams Kauno ligoninėse. 66-oji kasmetinė Jaunųjų tyrėjų ir mokslininkų konferencija. Konferencijos pranešimų tezės. 2014.
3. Asta Valinčiūtė, Eglė Balsytė, Inga Budrikaitė, Danguolė Vaznašienė, Rita Šulcaitė. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai sergantiems cukriniu diabetu. 66-oji kasmetinė Jaunųjų tyrėjų ir mokslininkų konferencija. Konferencijos pranešimų tezės. 2014.
4. Vaznašienė D et al. Positive bone biopsy culture – spread of the infectious process to the site of a major limb amputation. Tarptautinė EBJIS (Europos kaulų ir sąnarių infekcijų organizacijos) konferencija 2014 rugsėjo 11–13 d. Utrecht (Olandija). Konferencijos pranešimų tezės.
5. Vaznašienė D, Šulcaitė R, Jomantienė D, Špucis A, Mickienė A, Senneville E. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsija: perspektyvus kohortinis tyrimas Kauno ligoninėse. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas-sveikatai“. Konferencijos pranešimų tezės. 2015.
6. Viktorija Rogožinskaja, Danguolė Vaznašienė. Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai pacientams su periferinių arterijų liga nesergantiems cukriniu diabetu, žaizdų ir antibakterinio gydymo

įtaka. 67-oji kasmetinė Jaunųjų tyrėjų ir mokslininkų konferencija. Konferencijos pranešimų tezės. 2015.

7. Važnaisienė D et al. Positive bone biopsy culture – spread of the infectious process to the site of a major limb amputation, risk factors and prognostic value. Tarptautinė EBJIS (Europos kaulų ir sąnarių infekcijų organizacijos) konferencija 2015 rugsėjo 10–12 d. Estoril (Portugalija). Konferencijos pranešimų tezės.

Lietuvos ir tarptautinės konferencijos, kuriose pristatyti darbo rezultatai:

1. Tarptautinė EBJIS (Europos kaulų ir sąnarių infekcijų organizacijos) konferencija 2014 rugsėjo 11–13 d. Utrecht (Olandija) žodinio pranešimo „Positive bone biopsy culture – spread of the infectious process to the site of a major limb amputation“ pristatymas.
2. Tarptautinė EBJIS (Europos kaulų ir sąnarių infekcijų organizacijos) konferencija 2015 rugsėjo 10–12d. Estoril (Portugalija) stendinio pranešimo „Positive bone biopsy culture: spread of the infectious process to the site of limb amputation, risk factors and prognostic value“ pristatymas.
3. Tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija „Ar egzistuoja infekcinių ligų grėsmė šiuolaikinėje visuomenėje“ Pasvalyje 2014 rugsėjo 26 d., pranešimo „Infekcijos išplitimo galimybė į apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietą“ pristatymas.
4. Konferencija „Infekcinių ligų aktualijos“ Kaune 2014 lapkričio 21 d., pranešimo „Mokslinių tyrimų rezultatai gydytojui praktikui“ pristatymas.
5. VII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ Kaune 2014, pranešimo „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsija: pirmieji perspektyvaus kohortinio tyrimo rezultatai Kauno ligoninėse“ pristatymas, **prizinė II vieta**
6. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas-sveikatai“ Kaune 2015, pranešimo „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų pjūvio vietos kaulo biopsija: perspektyvusis kohortinis tyrimas Kauno ligoninėse“ pristatymas.
7. 66-oji kasmetinė Jaunųjų tyrėjų ir mokslininkų konferencija Kaune 2014, mokslinių darbų vadovė:
 - „Perkutaninės kaulo biopsijos reikšmė osteomielito etiologinėje diagnostikoje cukriniu diabetu sergantiems pacientams Kauno ligoninėse“;
 - „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai sergantiems cukriniu diabetu“.

8. 67-oji kasmetinė Jaunųjų tyrėjų ir mokslininkų konferencija Kaune 2015, mokslinio darbo vadovė:
 - „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksniai pacientams su periferinių arterijų liga nesergantiems cukriniu diabetu, žaizdų ir antibakterinio gydymo įtaka“.
9. Kasmetinė endokrinologų konferencija „Diabetinė pėda“ Klaipėdoje 2015 lapkričio 20–21 d., pranešimo „Nuo pėdos infekcijos iki kojos infekcijos“ pristatymas.



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



ORIGINAL ARTICLE

Major amputation of lower extremity: Prognostic value of positive bone biopsy cultures

D. Vaznaissiene^{a,*}, E. Beltrand^b, A.P. Laiskonis^a, Y. Yazdanpanah^c,
H. Migaud^d, E. Senneville^b

^a Clinic of Infectious Diseases, Lithuanian University of Health Sciences, 120, Baltijos street, 47116 Kaunas, Lithuania

^b University Hospital of Tourcoing, 155, President-Coty street, 59200 Tourcoing, France

^c Bichat Claude-Bernard Hospital, 46, Henri-Huchard street, 75018 Paris, France

^d CHU Lille, Hospital Roger-Salengro, Émile-Laine street, 59037 Lille, France

Accepted: 11 September 2012

KEYWORDS

Section's osseous
slice biopsy;
Major amputation of
lower extremity;
Infection;
Prognostic role

Summary

Background: To assess the correlation between culture results of section's osseous slice biopsy (SOB) and the distal infected site responsible for the amputation performed concomitantly during major amputation of lower extremity. The influence of a positive culture of SOB on the patients' outcome was also evaluated.

Materials and methods: We conducted a retrospective study of medical charts of patients who underwent SOB during major amputation of lower extremity at our institution from 2000 to 2009.

Results: Fifty-seven patients (42 males/15 females, mean age 52.16 years) who undergone major limb amputation (47 below knee and ten above knee) were included. The initial medical conditions of the investigated patients were: trauma ($n=32$), infection ($n=13$), trophic disorders ($n=10$) and tumor ($n=2$). The major cause of amputation was an uncontrolled infection, accounting for 64.9% of the cases (37/57) (foot=5, ankle=8, leg=24), the remaining 20 patients had trophic disorders of lower limb. Twenty-one (36.8%) from 57 biopsies were sterile, 12 (21.1%) doubtful and 24 (42.1%) positive. Thirty-one (54.4%) patients had an antibiotic-free interval before limb amputation. Independently of the bacterial species, 69.6% of the microorganisms identified from SOB were found in the distal infected site. Patients with positive SOB had a significantly longer interval between the decision to amputate the patient and the surgical procedure (200.2 vs. 70.1 days; $P<0.03$) and a shorter total duration of antibiotic therapy before amputation than patients with negative SOB (3.68 vs. 6.08 months; $P<0.03$). The delay for complete healing was significantly higher in patients with a positive SOB compared with those with a negative SOB (3.57 vs. 2.48 months; $P<0.03$).

* Corresponding author.

E-mail address: danguale.simanaityte@gmail.com (D. Vaznaissiene).

Conclusion: Our results suggest that the infection may extend from the distal site to the level of amputation in a large proportion of cases and that the delay with which the amputation is performed after the decision has been taken may play a role in this event.

Level of evidence: Study level IV: retrospective observational study.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

The incidence of major amputation of the limb is growing gradually worldwide. The annual number of major lower limb amputation in France was 7871 in 2010 [1]. Possible wound-healing complications associated with lower limb amputation stumps include infection, tissue necrosis, pain, problems associated with the surrounding skin, bone erosion, haematoma, stump oedema and dehiscence [2]. Section's osseous slice biopsy (SOB) is rarely performed in routine practice because of the expenses, the possible adverse events and the belief that a section of amputation distant from the site leading to the amputation and, therefore, is unlikely to be involved by the infectious process. Studies comparing the results of SOB with those of the site leading to the amputation are lacking. Prognostic factors of stump healing are not well defined. Data on the probability of the extension of the infectious process affecting the distal site responsible for the amputation are scarce. At our institution, we usually perform bone biopsy in patients with amputation following the protocol we reported previously [3]. We therefore decided to assess the role of bone biopsy cultures in those patients by comparing the microbiologic findings of the section's osseous slice and the distal site and the prognostic value of these results on the stump wound healing and the patients' outcome.

Patients and methods

Population

The patients included in the present study had undergone a major amputation of lower limb with a SOB at the National Referent Center for complex osteo-articular infections of the North-West inter-region of France from 2000 to 2009. Data was analyzed retrospectively, including age, sex, details about diabetes, presence of peripheral vascular disease, osteoarthritis, level of infection, context of trauma, level of amputation, immunosuppression, bedridden invalid, comorbidity, pathology duration and details, reason of the amputation, delay from decision of required major limb amputation to realization of the surgical procedure, history of previous amputation, total duration of antibiotic therapy before amputation, duration of the antibiotic-free interval before amputation, vascular status, inflammatory markers, renal function, and antibiotic use before and after hospitalization. The presence of a peripheral vascular disease was assessed on the absence of dorsal-pedal and posterior-tibial pulses and/or previously diagnosed peripheral vascular disease and/or pathological results of transcutaneous

oxygen pressure, Doppler UltraSound, angioscan, magnetic resonance angiography, arteriography. Comorbidities were evaluated according to the presence of cardiac, renal or hepatic insufficiency. Stump outcome was assessed on the delay of complete healing, equipment, reintervention and need of antibiotics.

Surgery

Amputations above or below the knee are called "major", "minor" amputations are those involving partial removal of a foot, including toe or forefoot resections. In most instances, surgeons performing a lower limb amputation will use the primary closure technique, in which the edges of the wound are closely approximated, thus eliminating dead space and involving minimal formation of granulation tissue. There may be a drain in situ, which will be removed on the first or second postoperative day. The drain is often not sutured in place to allow its removal without disturbing bandages or dressings [2].

Specimen collection and microbiological assessment

During the amputation, the orthopaedic surgeon performed SOB and a biopsy of the distal infected site responsible for the amputation in the surgical room by using two distinct sets of surgical tools. Two bone fragments were obtained for each biopsy; one was inoculated into Rosenow's broth (Biorad), and the other was placed in a standard transport system (Porta-germ; Biomerieux). Both fragments were rapidly brought to the microbiology laboratory, where aerobic and anaerobic cultures were maintained for 5 days and 2 weeks, respectively. A positive bone biopsy was defined as the presence of at least one bacteria not belonging to the skin flora or at least two bacteria belonging to the skin flora (e.g. coagulase-negative staphylococci, *Corynebacterium* spp. or *Propionibacterium acnes*).

Statistical analyses

Fisher's exact test and Student's test were used to compare the microbiological results. The statistical significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Fifty-seven SOB were performed during major lower limb amputation (ten above the knee and 47 below the knee) between 2000 and 2009. The mean age of the

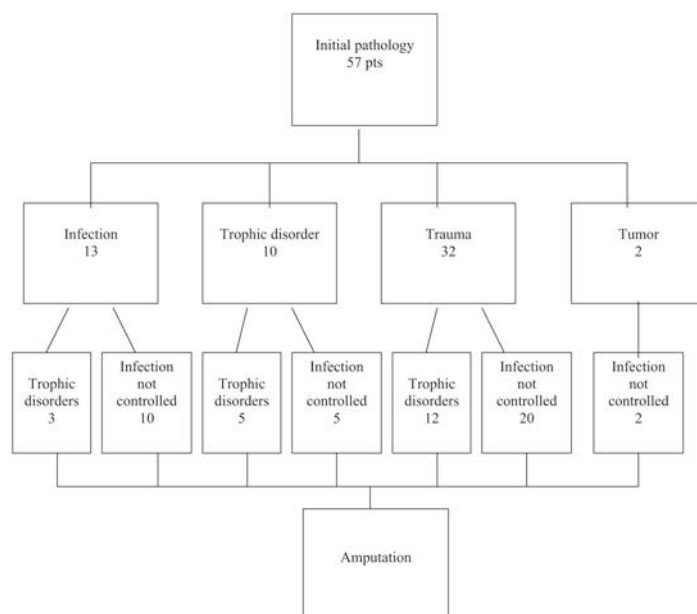


Figure 1 Initial pathology and cause leading to amputation.

patients included in the study (42 men and 15 women) was $52.16 \text{ years} \pm 2.25$ ($S = 16.99$). The initial medical conditions of the investigated patients were: trauma ($n = 32$), infection ($n = 13$), trophic disorder ($n = 10$) and tumor ($n = 2$). The main cause of amputation was an uncontrolled infection in 37 (64.9%) cases (foot = 5, ankle = 8, leg = 24) (Fig. 1).

For the other 20 patients, indication of amputation was trophic disorders. The underlying conditions were diabetic foot infection in 14 cases (24.6%), osteoarthritis in 24 (42.1%), trauma in 38 (66.67%), immunosuppression in seven (12.28%), peripheral arterial disease in 23 (40.35%), bedridden invalid in one (1.75%). Twenty-four (42.1%) bacterial culture results from SOB specimens were positive, 12 (21.1%) doubtful and 21 (36.8%) sterile. Before amputation, 31 (54.4%) patient had not received any antibiotics, including 22 of them (38.6%) with an antibiotic-free interval of 15 days or more. Thirty-two (56.14%) patients had biopsy of the distal site during amputation. Overall, the concordance between the culture results of SOB and the distal site was 48.15%, without significant difference between bacterial species (Table 1). Microorganisms identified in SOB were also cultured from the distal site in 69.57% of the cases.

Patients with a positive culture of SOB had a longer interval from the moment the decision to amputate was taken and the time of the surgical procedure (200.2 vs. 70.1 days; $P < 0.03$) and a shorter (3.68 vs. 6.08 months; $P < 0.03$) total duration of antibiotic therapy before amputation than patients with a negative SOB (Table 2). A longer

interval from decision to and carrying out of amputation was generally associated with patient's refusal.

The time to complete stump healing was significantly longer in the group of patients with a positive culture compared to those with a negative one (3.57 vs. 2.48 months; $P < 0.03$) (Table 3).

Patients with a positive or doubtful biopsy required more antibiotics at discharge from the hospital ($P < 0.001$) and their total disease duration was significantly longer in comparison to those with negative biopsy (61.45 vs. 23 days, respectively; $P = 0.001$). They also received more fluoroquinolones ($P = 0.04$) and anti-MRSA antibiotics for the treatment of osteomyelitis ($P = 0.03$) (Table 4).

Discussion

The present study has some limitations as this is a retrospective study with a small size population and histopathology examination was not used for confirming the diagnosis of osteomyelitis.

In a recent study of 959 consecutive major lower extremity amputations performed in 788 patients, including 704 below-knee amputations (73.4%) and 255 above-knee amputations (26.6%), an infection of the stump wound was reported in 5.5% of cases [4]. In a population of patients with severe lower extremity trauma who were amputated, the most commonly complication was wound infection (34.2%)

Table 1 Proportion of microorganisms isolated from osseous slice biopsy (SOB) and the site leading to the amputation obtained concomitantly from 32 patients with major amputation.

Microorganisms	Total	SOB only	Bone biopsy of the site leading to the amputation only	SOB and the site leading to the amputation	Correlation ^a %
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	1	2	3	50
Coagulase-negative staphylococci	17	3	3	11	64.71
Other gram-positive bacteria ^b	11	3	4	4	36.36
Gram-negative bacilli	17	4	5	8	47.06
Anaerobes ^c	3	2	1	0	0
Overall	54	12	14	26	48.15

^a Percentage of bone biopsy of the site leading to the amputation and SOB specimens obtained from a given patient that yielded the same pathogen.

^b Includes group B streptococci, enterococci, and corynebacteria.

^c Includes *Veillonella* species, *Fusobacterium* species, *Bacteroides* species, and *Peptostreptococcus* species.

Table 2 Parameters associated with the positivity of osseous slice biopsy (SOB).

	Sterile biopsy (n = 21)	Positive biopsy (n = 24)	P
Delay from decision of required major limb amputation to realization of the surgical procedure (days)	70.15	200.25	0.03
Total duration of antibiotic therapy before amputation (months)	6.08	3.68	0.03
Age	51.38	51.29	1
Peripheral vascular disease	9	7	0.37
Diabetic foot infection	7	4	0.3
Comorbidity	10	6	0.13
Immunosuppression	1	4	0.35
Foot	5	3	0.44
Ankle	5	6	1
Leg	10	15	0.38
Trauma	14	17	1
Duration of the pathology (days)	2124.81	2075.21	1
History of previous amputation	9	4	0.1
Antibiotic-free period (days)	27.9	22.19	0.8
Below-knee amputation	12	14	1
Above-knee amputation	4	5	1

[5]. Moller et al. studied the incidence of postoperative wound infection in major amputations [6]. He recorded the organisms isolated in preoperatively infected gangrene and in postoperatively infected wounds of 61 patients undergoing lower limb amputations due to ischemia, including 34% of coexisting diabetes mellitus [6]. Postoperative infections occurred in nearly two-thirds of the 19 cases of infected

gangrene, compared to less than one-third of cases of non-infected, and the presence of diabetes mellitus did not significantly influence the infection rate [6]. Postoperative wound infection following lower limb amputation due to ischemia is the main reason for reamputation, especially in patients with infected gangrene [6]. Some authors have stated that patients in whom swabs had been taken

Table 3 Outcomes of 57 patients with leg amputation.

	Sterile biopsy (n = 21)	Positive biopsy (n = 24)	P
Not healing	1	3	0.61
Delay for complete healing (months)	2.48	3.57	0.03
Equipment	19	17	0.14
Reintervention	5	7	0.75
Need of antibiotics	5	9	0.36

Table 4 Antibiotic therapy after amputation.

	Positive and doubtful biopsy (n = 36)	Negative biopsy (n = 21)	P
Antibiotic therapy prescribed at discharge from the hospital	29 (80.56%)	5 (23.81%)	< 0.001
Intravenous administration (days)	11.12	7.81	0.34
Total duration (days)	61.45	23	0.001
Rifampicine association	7 (19.44%)	1 (4.76%)	0.24
Fluoroquinolones	10 (27.78%)	1 (4.76%)	0.04
Anti-methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ^a	13 (36.11%)	2 (9.52%)	0.03
Others ^b	8 (22.22%)	2 (9.52%)	0.3

^a Glycopeptides, linezolid, fusidic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracyclines.

^b B-lactams, clindamycin, pristinamycin.

preoperatively and had yielded significant numbers of pathogens, were significantly more likely to develop a post-operative wound infection and had an amputation sepsis rate of 57% compared with 33% of those with a negative preoperative culture [7]. A surgical wound following amputation for ischemia may occur either as a direct result of entry of endogenous bacteria [8] or from the patient's skin at the time of surgery [9], or from their pre-existing gangrene [10]. These results have, however, been established from data of superficial sample culture results. The results of the present retrospective study suggest that the culture of the SOB is often positive even if the level of limb amputation is distant from the initial site responsible for the amputation. This study compared the culture results of SOB with those of the initial distal site of infection. We hypothesize that the infectious process affecting the distal site may extend to the level of amputation and that the duration of the interval between the decision of amputating the patient and the carrying out of the amputation may play a role in this setting. Reason of long delay was generally possible refusal of patient. This is probably the fear of invalidity, little information about the opportunity to walk with the prosthesis, the belief that healed without amputation. In other study patient's refusal to accept amputation resulted in a delay in amputation in 48.51% patients [11]. Psychological assistance and communication with the amputated could help in these settings.

The most important factor ensuring a successful amputation is the correct choice of amputation site based on the assessment of limb perfusion and functional requirements [2]. Complications of stump wound healing are of concern because they impact the patient's ability to walk with a prosthetic limb [2]. Wound-healing difficulties prolong rehabilitation and reduce the quality of life [2]. One study on lower limb amputation found that the most common stump-related complications were wound infection and poor healing (70%), poorly fashioned stumps (20%) and pain (10%) [2]. Important factors in healing and outcome of amputation include the patient's nutritional status, age, tobacco use, tissue perfusion, infection, the presence of potentially infected graft material and the presence of co-existing diseases such as renal failure, diabetes and anemia [2]. Our study revealed that a positive culture of the section's SOB is a risk factor for delayed stump healing.

In the present study, patients with positive SOB had a shorter total antibiotic therapy before amputation than had patients with negative SOB.

In addition, patients with positive SOB required a prolonged antibiotic therapy for osteomyelitis prescribed at discharge from hospital, including anti-MRSA agents in several cases. Antibiotics with good penetration into bone (fluoroquinolones, rifampicin, clindamycin, fusidic acid, metronidazole, linezolid) were used in combination according to the bacteria susceptibility profile for a duration of at least 6 weeks.

Bone biopsy of the distal infected site is important before amputation. While most diabetic foot infections are relatively superficial at presentation, microorganisms can spread contiguously to subcutaneous tissues, including fascia, tendons, muscle, joints and bone [12]. The anatomy of the foot, which is divided into several rigid but intercommunicating compartments, fosters proximal spread of infection [12]. Soft tissue or sinus tract cultures are not sufficiently accurate in predicting bone pathogens. Ideally, it would be best to process a bone specimen for both culture and histopathology [12]. To clarify the spread of infection would be interesting to perform a biopsy between distal site and section's osseous slice.

As the antibiotic treatment of bone infection is long, it is recommended to tailor the choice of the antimicrobials on the basis of reliable identification of the pathogens involved in the bone infection [13,14].

Conclusions

Our results suggest that the infection may extend from the distal site to the level of amputation in a large proportion of cases and that the delay with which the amputation is performed after the decision has been taken may play a role in this event.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Source of funding: none.

Acknowledgements

Laurence Legout, Michèle Caillaux, Thibault D'escrivain, Caroline Loiez, Hervé Dezeque, Carlos Maynou, Bernadette Rosèle, Aukse Mickiene.

References

- [1] Haute Autorité de santé. Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé. 2011. Available from URL: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-09/promenade-13_septembre.2011.3987.avis.pdf
- [2] Harker J. Wound healing complications associated with lower limb amputation. *World Wide Wounds*, September 2006. Available from URL: <http://www.worldwidewounds.com>
- [3] Senneville E, Morant H, Descamps D, Dekeyser S, Beltrand E, et al. Needle puncture and transcutaneous bone biopsy cultures are inconsistent in patients with diabetes and suspected osteomyelitis of the foot. *Clin Infect Dis* 2009;48(7):888–93.
- [4] Aulivola B, Hile CN, Hamdan AD, Sheahan MG, Veraldi JR, Skillman JJ, et al. Major lower extremity amputation outcome of a modern series. *Arch Surg* 2004;139:395–9.
- [5] Harris AM, Althausen PL, Kellam J, Bosse MJ, Castillo R. Complications following limb-threatening lower extremity trauma. *J Orthop Trauma* 2009;23(1):1–6.
- [6] Moller BN, Solund K, Hansen SL. Wound infection after lower extremity amputation because of ischemia. *Arch Orthop Trauma Surg* 1985;104(4):262–4.
- [7] Berridge DC, Slack RCB, Hopkinson BR, Makin GS. A bacteriological survey of amputation wound Sepsis. *J Hosp Infect* 1989;13:167–72.
- [8] Weaver PC, Chattopadhyay B, Angel J. An investigation into the spread of bacterial infection in lower limb amputations. *Br J Surg* 1973;60:723–9, doi:10.1002/bjs.1800600918.
- [9] Ayliffe GAJ, Lowbury EJJ. Sources of gas gangrene in hospital. *Br Med J* 1969;2(2653):333–7.
- [10] Parker MT. Postoperative clostridial infections in Britain. *Br Med J* 1969;3:671–6.
- [11] Ogunlade SO, Alonge TO, Omololu AB, Gana JY, Salawu SA. Major limb amputation in Ibadan. *Afr J Med Med Sci* 2002;31:333–6.
- [12] Lipsky BA, Peters EJJ, Senneville E, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28(Suppl. 1):163–78.
- [13] Zuluaga AF, Galvis W, Jaimes F, Vespa O. Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study. *BMC Infect Dis* 2002;16:2–8.
- [14] Zuluaga AF, Galvis W, Saldarriaga JG, Agudelo M, Salazar BE, Vespa O. Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Arch Intern Med* 2006;166:95–100.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Section's osseous slice biopsy during major amputation of lower extremity: preliminary results of prospective cohort study

Danguolė Vaznašienė^{1*}, Rita Sulcaite², Astra Vitkauskienė³, Arturas Spucis⁴, Anatolijus Reingardas⁴, Vytautas Kymantas⁵, Kestutis Balanaska⁶, Rolandas Sleivys⁶, Linas Velicka⁷, Juozas Belickas⁸, Kristina Rysevaite-Kyguoliene⁹, Dainius H. Pauza⁹, Aukse Mickiene¹ and Eric Senneville¹⁰

Abstract

Background: The purpose of this cohort study was to assess the incidence of positive cultures in section's osseous slice biopsy (SOB) taken at the level of major limb amputation. In case of positive cultures we sought whether the microorganisms present in SOB could take origin from the primary infection site necessitating the amputation. The impact of diabetes on culture results was also investigated.

Methods: This prospective cohort study, which aimed to confirm the results of the pilot study, analysed patients who underwent major limb amputation between 2012 and 2013 in three Lithuanian hospitals. SOB at the amputation site (surgical bone biopsies) and percutaneous bone biopsies of the distal site were performed simultaneously during limb amputation. Tissue cultures were analysed by microbiologists, and species along with antibiograms were reported. Histopathological assessment and bacterial typing were also evaluated. A positive culture was defined as the identification of at least 1 bacteria not belonging to the skin flora, at least 2 bacteria belonging to the skin flora with the same antibiotic susceptibility profiles or the same bacteria belonging to the skin flora in two different sites. Fisher's exact test and Student's test were used to compare the populations and the microbiological results. The statistical significance level was set at $P < 0.05$.

Results: Sixty-nine patients (35 males/34 females), mean age 68.7 ($S = 13.6$) years, including 21 (30.4 %) with diabetes underwent the major limb amputation. Forty-five amputations (65.2 %) were done above the knee. In total, 207 SOB and 207 percutaneous distal site biopsies were studied. SOB cultures were positive in 11 (15.9 %) cases. In 5 (45.5 %) cases the same microorganisms were identified in both SOB and distal biopsy cultures. No association between culture results and presence of diabetes was identified.

Conclusions: Our results suggest that, independently of the diabetes status, foot infection may silently spread along the bone and can achieve the site of major limb amputation. Additional investigations aiming to confirm this hypothesis and to evaluate a prognostic value are in progress.

Keywords: Bone biopsy, Major amputation, Osteoarticular infections

* Correspondence: danguole.simanaityte@gmail.com

¹Department of Infectious Diseases, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Vaznašienė et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Section's osseous slice biopsy (SOB) is rarely performed in routine amputations, partially due to additional cost and the threat of increased risk of adverse events. However, the belief that the proximal amputation site distant from the site necessitating the limb amputation is unlikely to be involved in the infectious process, is still frequent and this may explain why SOB is regularly omitted from the amputation site selection process. Data about the probability of the extension of the infectious process affecting the distal site responsible for the amputation, prognostic value are lacking and findings present have only been established by taking superficial microbiology cultures.

We hypothesized that infection from the distal site may spread along the bone and be present at the amputation site. Therefore, a positive SOB culture could be a risk factor for delayed stump healing. Our team has previously participated in a retrospective pilot study in France, which compared the culture results of SOB with those of bone biopsy at the initial distal infection site [1]. The results of this study suggested that SOB cultures are often positive even if the level of limb amputation is distant from the infection source responsible for the amputation, and that a positive culture of the SOB is a risk factor for delayed stump healing. However, the study was limited by retrospective design, small population size and failure to use histopathological assessment for the diagnosis of osteomyelitis. To confirm the findings from this previous study we decided to conduct a prospective cohort study in institutions where SOB or percutaneous bone biopsies are not routinely performed during the amputation.

Methods

This is a 1 year follow-up cohort study. Stump wound healing, postoperative antibiotic therapy will be assessed at the secondary end point of the study.

In this preliminary study we report the incidence of positive cultures in section's osseous slice biopsy (SOB) taken at the level of major limb amputation and compare the microbiology of positive cultures with percutaneous bone biopsy cultures performed at distal infected site. We also analyze the relationship between diabetes and microbiological culture results.

Population

In this multicenter prospective cohort study we included adult patients who underwent a major amputation of lower limb in the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Kaunas Clinical Hospital and Republican Hospital of Kaunas between 2012 and 2013. The only exclusion criterion was the refusal to participate in the study. Patients had a complete medical

history taken, full examination and tests performed. The following data were collected: age, sex, diabetes status and glycemic control, presence of peripheral vascular disease, osteoarthritis, level of infection, context of trauma, level of amputation, immunosuppression, bedridden disability, comorbidity, duration and history of the pathology, reason of the amputation, time from the decision to amputate to surgical procedure, history of previous amputations, total duration of antibiotic therapy before the amputation, antibiotic-free interval before amputation, inflammatory markers (C-reactive protein), renal function (creatinine, estimated glomerular filtration rate), and antibiotic use before and after hospitalization.

Peripheral vascular disease was assumed to be present if 1) dorsal-pedal and posterior-tibial pulses were absent and/or 2) pathological results were evident on Doppler UltraSound, peripheral arteriography and/or 3) there was a previously made diagnosis of peripheral vascular disease by vascular surgeon by using the methods mentioned above. Comorbidity status was evaluated on the presence of cardiac, renal or hepatic insufficiency. Patients were considered to have had an antibiotic-free interval, if they had not received any systemic antibiotic for at least 2 weeks before the amputation. An informed consent form had to be completed by every patient who met the inclusion criteria. The study protocol was approved by Lithuanian Ethics Committee (Number BE-2-23, 2012 May 14).

Specimen collection

Concomitant SOB and percutaneous bone biopsy of the distal site were performed during limb amputation. A new surgical setup and new instruments were used, to try and decrease the likelihood of cross-contamination during surgery. Percutaneous bone biopsy was performed in the surgical room using an 11-gauge biopsy needle inserted through a 5–10-mm skin incision at least 20 mm from the ulcer periphery, to avoid contamination by the colonizing flora, following the methodology described in the literature [2]. During the amputation, in the surgical room we performed SOB at the level of major limb amputation from the amputated limb part using Liston bone cutting forceps and removing the bone fragments (cortical bone and bone marrow for each biopsy). Three bone fragments were obtained for both SOBs and percutaneous distal biopsies, two of which underwent the microbiological assessment, the rest bone fragment - histopathological assessment.

Microbiological assessment

Specimens were immediately placed into Amies transport medium (Brescia, Italy), brought to the microbiology laboratory within 1 h after sampling. The samples

were inoculated directly into 5 % sheep blood agar (BBL, USA), chocolate agar (BBL, USA), Mac Conkey agar plates (Oxoid, UK), Schaedler agar (BBL, USA) and thioglycollate broth. Sheep blood and chocolate agar plates were incubated at 35 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂ and Mac Conkey agar plates – at 35 °C for 18–24 h. If culture was negative at the first observation, sheep blood and chocolate agar plates were re-examined after a second 24 h incubation. Thioglycollate broth was incubated at 35 °C temperature for 5 days. Schaedler agar was incubated at 35 °C in an anaerobic workstation Bug Box (UK) for 2 weeks. Maldi-TOF-MS (BRUKER) mass spectrometry was used for microorganism identification. Analysis of the number of colony-forming units per culture was performed by means of a counting frame for bone biopsy cultures. A positive culture was defined as the identification of at least 1 bacteria not belonging to the skin flora, at least 2 bacteria belonging to the skin flora (CoNS (coagulase negative staphylococci), *Corynebacterium spp*) with the same antibiotic susceptibility profiles or the same bacteria belonging to the skin flora in two different sites. A doubtful culture was defined as the identification of one bacteria belonging to the skin flora in one site. The dominant pathogen required at least a three times higher growth in bone cultures than other microorganisms. All positive cultures were frozen at –60 °C for further research. The isolated pathogens from SOB and distal site biopsy, which happened to be the same species were compared using genotyping (pulsed field gel electrophoresis) to confirm the same strain.

Histopathological assessment

Bone fragment was fixed in 4 % paraformaldehyde, decalcified in 10 % HCl and embedded in paraffin for histological analysis. 3-μm thick sections were made, stained with hematoxylin-eosin.

Histopathological findings for the signs of infection were evaluated. Histopathological findings in bone specimens were defined as acute osteomyelitis when necrosis, destroyed bone and infiltrations of polymorphonuclear granulocytes at cortical sites and inside the bone marrow were present. Congestion or thrombosis of medullary or periosteal small vessels was also a frequent finding. It was defined as chronic osteomyelitis when there was destroyed bone and infiltrations of lymphocytes, histiocytes and/or plasmatic cells at cortical sites and inside the bone marrow. All cases of osteomyelitis exhibited areas of fibrosis in variable forms and medullar oedema.

Statistical analyses

Fisher's exact test and Student's test were used to compare the populations and microbiological results,

all the variables had normal distribution. The statistical significance level was set at $P < 0.05$.

Results

From 2012 to 2013, 69 patients (35 males/34 females, age 68.7 (S = 13.6)) underwent major limb amputation at Kaunas hospitals. Among all these 69 patients, 45 (65.2 %) had above the knee amputation and 21 (30.4 %) were known to have diabetes (Table 1). 207 SOB's at amputation level and 207 distal percutaneous biopsies were

Table 1 Population and the results of bone biopsies

	Variable	Prospective cohort study (n = 69)
Population	Mean age	68.7 (S = 13.6)
	Male	35 (50.7 %)
	Amputation above the knee	45 (65.2 %)
	Of them due to peripheral vascular disease	40/45 (88.9 %)
	Diabetics	21 (30.4 %)
	Diabetic foot	14 (20.3 %)
	Trophic disorders	52 (75.4 %)
	Trauma	24 (34.8 %)
	Antibiotic-free interval before limb amputation	39 (56.5 %)
	SOB	
SOB	Sterile SOB	52 (75.4 %)
	Positive SOB	11 (15.9 %)
	Doubtful SOB	6 (8.7 %)
	Positive + doubtful SOB	17 (24.6 %)
	No. of isolates	27
	No. of isolates, by pathogen	
	<i>S. aureus</i>	0
	Coagulase-negative staphylococci (in all)	9 (33.3 %)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
	Other gram- positive bacteria	8 (29.6 %)
	Gram-negative bacilli	10 (37 %)
	Anaerobes	0
	Methicillin resistant staphylococci	3/9
	SOB and percutaneous bone biopsy of the distal site	
	Microorganisms identified from SOB were found in the distal infected site	45.5 %
SOB and percutaneous bone biopsy of the distal site	<i>S. aureus</i>	0
	Coagulase- negative staphylococci	1/9
	Other gram- positive bacteria	2/7
	Gram-negative bacilli	3/10
	Anaerobes	0
SOB and percutaneous bone biopsy of the distal site	Methicillin resistant staphylococci	0/3

taken, and 138 of each underwent the microbiological assessment, 69 of each – histopathological assessment. In 17 cases (24.6 %) the microorganisms were identified in SOB. SOB cultures were evaluated as positive in 11 (15.9 %) cases (Fig. 1). 83.3 % *Enterococcus* isolates were sensitive to vancomycin. Susceptibility of Gram-negative organisms to ciprofloxacin was 87.5 %. The rate of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and ceftazidime was 50 % for each. In 2 cases the signs of infection were found in histopathological assessment of SOB.

In 5 (45.5 %) cases the same microorganisms (same species, antibiogram, genotype) were identified in SOB and distal site bone biopsy cultures (Fig. 2). No species were found to be particularly predominant (Table 2).

SOB cultures were positive in 5 (23.8 %) patients suffering from diabetes and in 6 (12.5 %) patients without diabetes ($p = 0.29$). Microorganisms identified in SOB were also cultured from the distal site in 1 (20 %) diabetic and 4 (66.7 %) non-diabetics ($p = 0.24$) (Table 3).

Discussion

Studies comparing the microbiological cultures of SOB and the cultures from the site necessitating amputation are lacking. Previously reviewed reports on how infectious processes influence the amputation outcome have, however, been established using the superficial samples

[1]. Taking superficial samples for the diagnosis of osteomyelitis of diabetic foot, which is a widespread practice, is of limited or at least uncertain diagnostic value [2, 3]. In case of non-diabetic bone infection (including stump infections) the swab bacterial cultures are often misleading, and bone biopsy remains the optimal management as well [4, 5]. Bone biopsy is particularly valuable in providing reliable data on infecting organisms and their antimicrobial susceptibility [6].

In the retrospective pilot study carried out in France, the positive SOB cultures were more common than in our present study ($p = 0.01$). SOB cultures were positive in 42.1 % of the pilot study patients, while the microorganism at amputation and distal sites coincided in 69.6 % of the cases [1]. These discrepancies may be partially explained by a more radical surgery performed in Lithuania, as suggested by a greater percentage of the above-the-knee amputations as well as by a higher proportion of patients with peripheral vascular disease in our cohort. Antibiotic-free interval was observed in about a half of the cases in both cohorts. In the pilot study conducted at the National Reference Center as having complex osteo-articular infections, patients underwent routine SOB during major lower extremity amputation. In agreement with the results of the pilot study, we did not identify any difference between

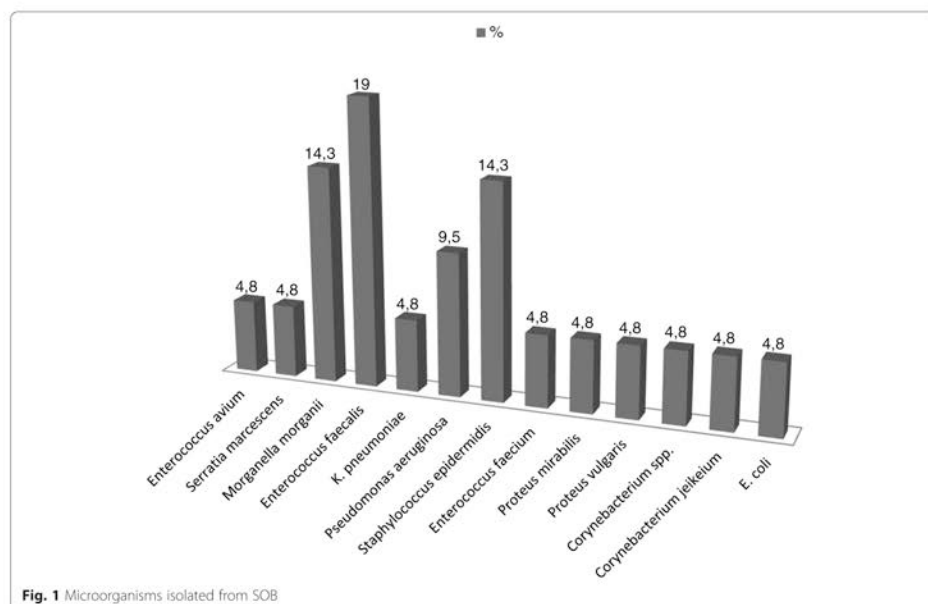
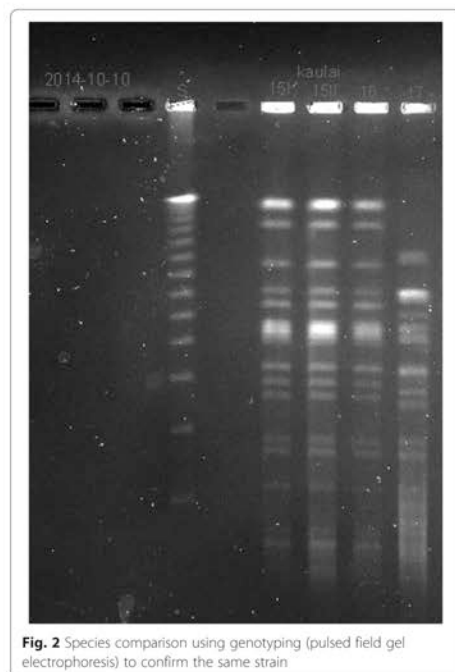


Fig. 1 Microorganisms isolated from SOB



microbiological cultures obtained from diabetic and non-diabetic patients [1]. To the best of our knowledge, there are no similar studies reported in the literature.

In previous studies, the rate CoNS isolation from bone tissue varied between 10 % and 50 %, and was considered in most cases as true infections [2, 7, 8]. Lavery et al. [7] recorded that the intraoperative bone cultures used by their team were less prone to contamination than the percutaneous technique, and accounted for the lower CoNS incidence than in Newman series (11 % vs 50 %) [8]. In our study a chance of contamination

Table 2 Species of matching microorganisms isolated from both SOB and percutaneous distal infected bone biopsy cultures

Microorganism	Number of patients
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1

Table 3 Comparison of the bone biopsy results in diabetics and non-diabetics

	Diabetics (n = 21)	Non-diabetics (n = 48)	P
Positive SOB	5 (23.8 %)	6 (12.5 %)	0.29
Microorganisms identified from SOB were found in the distal infected site	1/5 (20 %)	4/6 (66.7 %)	0.24

remains high in spite of surgical bone biopsy (SOB). Three out of nine CoNS were evaluated as positive in SOB. Eight out of nine CoNS were not identified at the distal biopsy. Interestingly, one study found a higher rate of CoNS in the percutaneous bone biopsy samples than in the swab samples (25.6 % vs. 4.6 %; $p < 0.001$) [2]. This finding may support the idea that CoNS are the causative pathogens in these cases. However, the validity of this finding is unclear, because histological confirmation of osteomyelitis was not done [2]. Nevertheless, Aragon-Sanchez et al. presented a series of cases in which *S. epidermidis* was isolated from the bone biopsy and the histopathological studies, confirming diagnosis of osteomyelitis, but no anaerobic cultures were performed [9]. In the present study, the CoNS were the most common microorganisms grown from SOB (33.3 %), which corresponds to the literature data. In terms of CoNS abundance, the results of our previous pilot study did not differ from the present study, although in the pilot study all bone biopsies were performed by an experienced orthopedic surgeon, and the possibility of contamination was small. The other identified microorganisms did not differ significantly in both present and pilot studies.

Differentiating the true coagulase-negative staphylococcal infection from contamination has an important impact on therapeutic implications. In this situation, clinical, radiological findings, as well as histological signs of infection may be useful. In our study only in 2 cases the signs of infection were found in histopathological assessment of SOB. We think that the microorganisms spread and were found in SOB earlier until the changes are visible in histopathological or radiological analysis. Repeated positive cultures, isolation of identical species with comparable antibiotic susceptibility profile were considered as strong arguments in favour of a true infection in recent study [10]. In this study genotyping techniques demonstrated that CoNS exhibiting comparable antibiotic susceptibility patterns had a 93.3 % probability to belong to the same strain [10]. In our study in all cases isolated pathogens from SOB and distal site biopsy, which happened to be the same species and antibiogram were compared using genotyping and confirmed the same strain. In Bernard et al. study with quantitative cultures, coagulase negative staphylococci were considered as commensals, since their quantification was inferior to other concomitant

and more classical pathogens of osteomyelitis [11]. Of note, genetic markers of virulence are unlikely to differentiate invasive and commensal strains [12–14].

To confirm our hypothesis that culture results of the slice site are reliable and bacteria ascend from the foot instead of from skin, blood, or other nearby source of infection and affect the amputation outcome, further investigations and analysis are in progress.

Conclusions

Our results suggest that, independently of the diabetes status, foot infection may silently spread along the bone and can achieve the site of major limb amputation. Additional investigations aiming to confirm this hypothesis and to evaluate a prognostic value are in progress.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DV participated in the design of the study, in the interpretation of data, in the preparation of specimens for histological analysis, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript. RS participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. AV carried out the microbiological assessment and helped to draft the manuscript. AS participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. AR participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. VK participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. KB participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. RS participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. LV participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. JB participated in acquisition of data, revised critically the manuscript. KKK participated in preparation of specimens for histological analysis and helped to draft the manuscript. DHP participated in preparation of specimens for histological analysis, it coordination, revised critically the manuscript. AM participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. ES conceived of the study, and participated in its coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Gintarė Sirkutė, Daiva Jomantiene, Loretta Civišienė, Eric Beltrand, Arūnas Cepkauskas, Paulius Macevičius, Science Foundation of Lithuanian University of Health Sciences

Author details

¹Department of Infectious Diseases, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ²Institute of Endocrinology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ³Department of Laboratory Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ⁴Department of Surgical Infection, Republican Hospital of Kaunas, Kaunas, Lithuania. ⁵Department of Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ⁶Department of Surgery, Kaunas Clinical Hospital, Kaunas, Lithuania. ⁷Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ⁸Department of Orthopedics and Traumatology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ⁹Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ¹⁰Infectious Diseases Department, Dron Hospital, Tourcoing, France.

Received: 24 October 2014 Accepted: 22 June 2015

Published online: 30 June 2015

References

- Vaznašienė D, Beltrand E, Laškonis AP, Yazdanpanah Y, Migaud H, Senneville E. Major amputation of lower extremity: prognostic value of positive bone biopsy cultures. *OTSR*. 2013;59(1):88–93.

- Senneville E, Melliez H, Beltrand E, Legout L, Valette M, Cazaubiel M, et al. Culture of percutaneous bone biopsy specimens for diagnostic of diabetic foot osteomyelitis: concordance with ulcer swab cultures. *Clin Infect Dis*. 2006;42:57–62.
- Zuluaga AF, Galvis W, Saldarriaga JG, Agudelo M, Salazar BE, Vesga O. Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2006;166:95–100.
- Dutronic H, Gobet A, Dauchy FA, Klotz R, Cazanave C, Garcia G, et al. Stump infections after major lower-limb amputation: a 10-year retrospective study. *Med Mal Infect*. 2013;43(11–12):456–60.
- Flückiger U, Zimmerli W. Diagnosis and follow-up management of postoperative bacterial osteitis. *Orthopade*. 2004;33(4):416–23.
- Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *CID*. 2012;54(12):132–73.
- Lavery LA, Sarlaya M, Ashby H, Harkless LB. Microbiology of osteomyelitis in diabetic foot infections. *J Foot Ankle Surg*. 1995;34:61–4.
- Newman LG, Waller J, Palestro CJ, Schwartz M, Klein MJ, Hermann G, et al. Unsuspected osteomyelitis in diabetic foot ulcers. Diagnosis and monitoring by leukocyte scanning with indium 111 oxiquinoline. *JAMA*. 1991;266:1246–51.
- Aragon-Sanchez J, Lázaro-Martínez JL, Hernández-Herrero MJ, Quintana-Marrero Y, Cabrera-Galván JJ. Clinical significance of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* from bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diabet Foot Ankle*. 2010; 1: doi:10.3402/dfa.v1i0.5418.
- Abdul Rahman Z, Hamzah SH, Hassan SA, Osman S, Md Noor SS. The significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a low resource setting. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7(6):448–52.
- Bernard L, Assal M, Garzoni C, Uckay I. Predicting the pathogen of diabetic toe osteomyelitis by two consecutive ulcer cultures with bone contact. *J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:279–81.
- Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstskotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5614–9.
- Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S, Nair SP. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect*. 2007;9:460–5.
- Trécat M, Loez C, Senneville E, Migaud H, Courcol R, Wallet F. From Contamination To Virulence In *Staphylococcus Epidermidis* Strains Genetic Markers Involved In Prosthetic Joint Infections. 53th ICAAC, Denver, United States, category D, 150, 1136.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



SUMMARY

1. INTRODUCTION

Section's osseous slice biopsy (BA) is rarely performed in routine major amputations of lower extremities, partially due to additional cost and the threat of an increased risk of adverse events. However, the belief that the proximal amputation site distant from the site necessitating limb amputation is unlikely to be involved in the infectious process is still frequent, which may explain why BA is regularly omitted from the amputation site selection process. Data about the probability of the infectious process extension affecting the distal site responsible for amputation and prognostic value are lacking; the findings present have only been established by taking superficial microbiology cultures [5]. We hypothesized that infection from the distal site might spread along the bone and be present at the major amputation site. Therefore, a positive BA culture could be a risk factor for delayed stump healing.

2. AIM AND OBJECTIVES

2.1. The aim of the study

To assess the spread of foot infection and its impact on the outcomes of major amputations of lower extremities.

2.2. Objectives of the study

1. To assess the prevalence of a positive bone biopsy culture performed at the level of major limb amputation, compare with histopathological findings and to evaluate the factors influencing the spread of infection;
2. To compare BA culture results with the results of the culture of percutaneous bone biopsy of the distal site (BD), and to evaluate the results of bone biopsy performed at the site of presumed below-the-knee operation (BP) between BA and BD;
3. To assess the value of a positive BA culture on stump healing and equipment, and the need of re-intervention and antibiotics.

2.3. Scientific novelty

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the possible ascending spread of an infectious process to the amputation site and its impact on the stump outcome in terms of bone biopsy results.

2.4. Practical value

In the recent years, chronic osteomyelitis has been managed by less radical surgery and antibiotic therapy based on reliable culture results. Taking superficial samples for the diagnosis of osteomyelitis of a diabetic foot, which is a widespread practice, is of limited or at least uncertain diagnostic value [31, 77]. In case of a non-diabetic bone infection (including stump infections), swab bacterial cultures are often misleading, and bone biopsy remains the optimal management option as well [23]. Bone biopsy is particularly valuable in providing reliable data on infecting organisms and their antimicrobial susceptibility [7].

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Population

In a multicentre retrospective cohort study, we included adult patients (≥ 18 years) who underwent a major amputation of a lower limb in the University Hospital of Tourcoing and University Hospital of Lille between 2000 and 2009. A total of 57 patients were included (of which 42 (73.68%) were men and 15 (26.32%) were women) with the mean age of 52.16 years (SD=16.99).

In a multicentre prospective cohort study, we included adult patients (≥ 18 years) who underwent a major amputation of a lower limb in the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Kaunas Clinical Hospital and Republican Hospital of Kaunas between 2012 and 2014. The only exclusion criterion was the refusal to participate in the study. All patients signed a consent form. One patient refused to follow-up. A total of 112 patients were included (of which 60 (53.6%) were men and 52 (46.4%) were women) with the mean age of 71.3 (SD=13.8) years. In order to perform the study, permissions were obtained from Kaunas Regional Research Ethics Committee (No. BE-2-23) and the State Data Protection Inspectorate (No. 2R-6247 (2.6-1.), see Appendix).

In the retrospective study, the data were taken from medical charts and were analysed retrospectively. In the prospective study, the patients had a complete medical history taken, full examination and tests performed. The following data were collected: age, sex, height, weight, diabetes status and glycaemic control, presence of peripheral vascular disease, osteoarthritis, level of infection, context of trauma, level of amputation, immunosuppression, bedridden disability, comorbidity, duration and history of the pathology, reason of amputation, time from the decision to amputate to the surgical procedure, history of previous amputations, total duration of antibiotic therapy before amputation, antibiotic-free interval before amputation, inflammatory markers (C-reactive protein, leukocytes), renal function (creatinine, estimated glomerular filtration rate), and antibiotic use before and after hospitalisation. Peripheral vascular disease was assumed to be present if 1) dorsal-pedal and posterior-tibial pulses were absent, and/or 2) pathological results were evident on Doppler UltraSound or peripheral arteriography, and/or 3) there was a previously made diagnosis of peripheral vascular disease by a vascular surgeon using the methods mentioned above. The comorbidity status was evaluated on the presence of cardiac, renal or hepatic insufficiency. The patients were considered to have had an antibiotic-free interval, if they had not received any systemic antibiotic for at least 2 weeks before amputation. An informed consent form had to be completed by every patient who met the inclusion criteria.

The patients were followed-up for 1 year. Stump outcomes were assessed on the delay of complete healing, equipment, need of re-intervention and antibiotics.

3.2. Specimen collection

Concomitant BA and BD were performed during limb amputation. A new surgical set-up and new instruments were used to try and reduce the likelihood of cross-contamination during surgery. BD was performed in the surgical room using an 11-gauge 10 cm biopsy needle inserted through a 5–10 mm skin incision at least 20 mm from the ulcer periphery, to avoid contamination by the colonising flora, following the methodology described in the literature [31]. During amputation, in the surgical room, we performed BA at the level of major limb amputation from the amputated limb part using Liston bone cutting forceps and removing the bone fragments (cortical bone and bone marrow for each biopsy). Three bone fragments were obtained for both BA and BD, 2 of which underwent microbiological assessment, and the rest bone fragment – histopathological assessment. Taking

into account that radical surgery is usually performed at our institutions, and to search for possible ascendant spread of infection, in the prospective study during amputation above the knee, bone biopsy was also performed in the site of presumed below-the-knee operation (BP) (for diabetics and/or cases of evident osteomyelitis) with distinct tools (Figure 3.2.1).

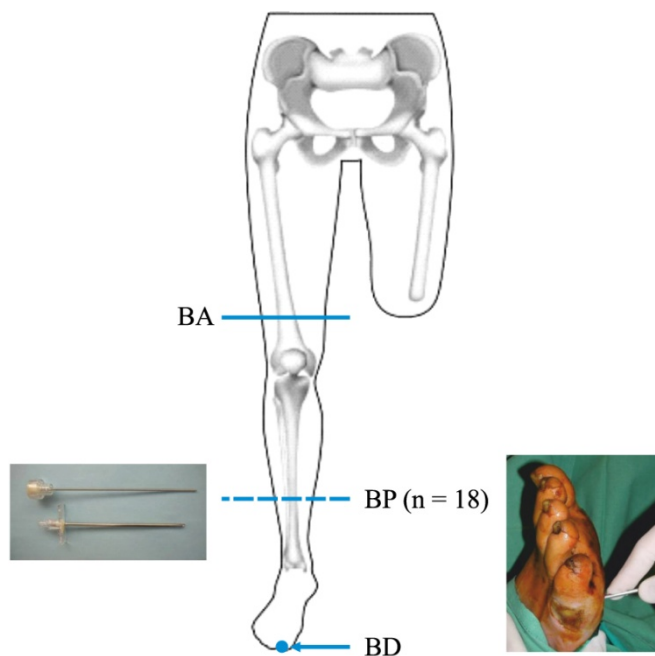


Figure 3.2.1. *The sites of bone biopsies*

Photos: E. Beltrand, Sce d'Orthopédie CH Tourcoing

3.3. Microbiological assessment

The media used in the prospective study matched the media of the retrospective study. The specimens were immediately placed into Amies transport medium (Brescia, Italy), brought to the microbiology laboratory within 1 h after sampling. The samples were inoculated directly into 5% sheep blood agar (BBL, USA), chocolate agar (BBL, USA), Mac Conkey agar plates (Oxoid, UK), Schaedler agar (BBL, USA) and thioglycollate broth. Sheep blood and chocolate agar plates were incubated at 35 °C in an atmosphere containing 5% CO₂ and Mac Conkey agar plates – at 35 °C for 18–24 h. If a culture was negative at the first observation, sheep blood and chocolate agar plates were re-examined after the second 24-h incubation. Thioglycollate broth was incubated at 35 °C for 5 days. Schaedler agar was

incubated at 35 °C in an anaerobic workstation Bug Box (UK) for 2 weeks. Maldi-TOF-MS (BRUKER) mass spectrometry was used for microorganism identification. Analysis of the number of colony-forming units per culture was performed by means of a counting frame for bone biopsy cultures. A positive culture was defined as the identification of at least 1 species of bacteria not belonging to the skin flora or at least 2 bacteria belonging to the skin flora (CoNS (coagulase negative staphylococci), *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium acnes*) with the same antibiotic susceptibility profiles. A doubtful culture was defined as the identification of 1 species of bacteria belonging to the skin flora. The dominant pathogen required at least 3 times higher growth in bone cultures than other microorganisms. All positive cultures were frozen at -60 °C for further research. The isolated pathogens from BA and distal site biopsy, which happened to be the same species, were compared using genotyping (pulsed field gel electrophoresis, Maldi TOF-MS) to confirm the same strain.

3.4. Histopathological assessment

Bone fragment was fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in 10% HCl and embedded in paraffin for histological analysis. Then, 3-µm thick sections were made and stained with hematoxylin-eosin. Histopathological findings for the signs of infection were evaluated. Histopathological findings in bone specimens were defined as acute osteomyelitis when necrosis, destroyed bone and infiltrations of polymorphonuclear granulocytes at cortical sites and inside the bone marrow were present. Congestion or thrombosis of medullary or periosteal small vessels was also a frequent finding. It was defined as chronic osteomyelitis when there was destroyed bone and infiltrations of lymphocytes, histiocytes and/or plasmatic cells at cortical sites and inside the bone marrow. All the cases of osteomyelitis exhibited areas of fibrosis in variable forms and medullar oedema. In the retrospective study, histopathology examination was not used to confirm the diagnosis of osteomyelitis.

3.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistical software (SPSS v.20.0). Normally distributed continuous variables were presented as the mean and SD and compared using the Student t test. The statistical significance of differences between the other groups was analysed using the Mann-Whitney U test for non-parametric continuous variables, and

categorical variables were compared using the chi-square test and Fisher's exact test. Relative risk (RR) was calculated with a 95% confidence interval (CI). A P value <0.05 was considered statistically significant.

4. MAIN RESULTS

4.1. Results of the retrospective study

In total, 57 BA were performed during major lower limb amputations (10 above the knee and 47 below the knee) between 2000 and 2009. The mean age of the patients included in the study (42 men and 15 women) was 52.16 years (SD = 16.99). The main cause of amputation was uncontrolled infection in 37 (64.9%) cases (foot = 5, ankle = 8, leg = 24). For the other 20 patients, the indication of amputation was trophic disorders. The underlying conditions were diabetic foot infection in 14 cases (24.6%). Twenty-four (42.1%) bacterial culture results from BA specimens were positive, 12 (21.1%) doubtful and 21 (36.8%) sterile. Before amputation, 31 patients (54.4%) had not received any antibiotics, including 22 (38.6%) with an antibiotic-free interval of 15 days or more. Microorganisms identified in BA were also cultured from the distal site in 69.57% of the cases. The patients with a positive culture of BA had a longer interval from the moment the decision to amputate was made and the time of the surgical procedure (200.2 vs. 70.1 days; $P < 0.03$) and a shorter (3.68 vs. 6.08 months; $P < 0.03$) total duration of antibiotic therapy before amputation than patients with a negative BA. The time to complete stump healing was significantly longer in the group of the patients with a positive culture compared with those with a negative one (3.57 vs. 2.48 months; $P < 0.03$).

4.2. Population of the prospective study

From 2012 to 2014, 112 patients (60 men and 52 women, mean age 71.3 (SD = 13.8)) underwent major limb amputation at Kaunas hospitals. Among all these 112 patients, 81 (72.3%) had above-the-knee amputation and 37 (33%) were known to have diabetes. In total, 726 bone biopsies were taken. The main cause of amputation was uncontrolled infection in 18 (16.1%) cases. Before amputation, 59 (52.7%) patients had an antibiotic-free interval of 15 days or more.

4.3. Prevalence of positive bone biopsy culture performed at the level of major limb amputation and factors influencing biopsy results

In 24 cases (21.4%), the microorganisms were identified in BA. BA cultures were evaluated as positive in 12 cases (10.7%) (Figure 4.3.1). To differentiate the true coagulase-negative staphylococcal infection from contamination, repeated positive cultures, isolation of identical species with a comparable antibiotic susceptibility profile, quantitative analysis, histopathological assessment and genotyping techniques were used. The majority (83.3%) of *Enterococcus* isolates were sensitive to vancomycin. Susceptibility of gram-negative organisms to ciprofloxacin was 87.5%. The rate of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and ceftazidime was 50% for each. In 3 cases, the signs of infection were found in histopathological assessment of BA.

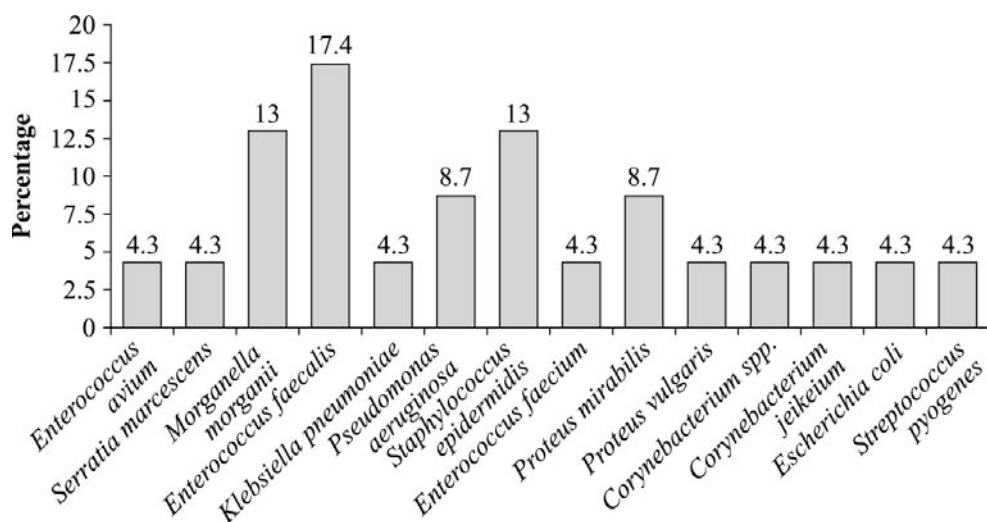


Figure 4.3.1. Microorganisms isolated from BA

In comparison with the patients with a negative BA, the patients with a positive culture of BA were more frequently treated at the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos (6 (50%) vs. 6 (6.8%); $P<0.001$), more frequently had a history of previous amputations (8 (66.7%) vs. 29 (33%); $P=0.023$), had a higher body mass index (29.26 vs. 21.2; $P=0.038$), and more frequently underwent amputation below the knee (7(58.3%) vs. 21 (23.9%); $P=0.013$). The main cause of amputation was uncontrolled infection (6 (50%) vs. 10 (11.4%); $P=0.008$), the signs of infection were determined upon radiological examination (3 (25%) vs. 8

(9.1%); $P=0.005$), and microorganisms were identified before amputation (6 (50%) vs. 5 (5.7%); $P<0.0001$). An antibiotic-free interval and the diabetic status did not influence bone biopsy results.

4.4. Matching microorganisms isolated from both BA and percutaneous distal infected bone biopsy cultures

In 5/12 (41.67%) of the cases, the same microorganisms (same species, antibiogram, genotype) were identified from BA and BD cultures: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*; in one case, 3 bacteria were identified (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus epidermidis*).

4.5. Results of bone biopsies performed between BA and BD

During 18 above-the-knee amputations, bone biopsies were performed at the planned site of amputation below the knee (Table 4.5.1).

Table 4.5.1. Microorganisms isolated from BP, BD and BA

No of patient	BD	BP	BA
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterobacter</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i>
2.	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Negative
3.	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
4.	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> , Plazmos nekoaguliuo- jantis stafilokokas, <i>Acinetobacter</i> spp, <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative
6.	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i>	Negative
7.	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
8.	Negative	<i>Morganella morganii</i>	Doubful*
9.	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative**	Doubful*

Table 4.5.1. Continued

No of patient	BD	BP	BA
10.	<i>Streptococcus anginosus</i>	Negative**	Negative
11.	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Negative**	Negative
12.	6 Negative	6 Negative	5 Negative, 1 doubtful*
13.	<i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Negative

Abbreviations: *Doubtful – coagulase negative staphylococcus in 1 specimen <1KFV/g; **Osteomyelitis or suspicion of osteomyelitis, amputation below the knee could be as radical surgery.

Taking into account all the positive BP cases in the prospective study, BA were positive in 16.1%, and the same microorganisms were identified at the distal site in 57.1% of the cases (Table 4.5.2).

Table 4.5.2. Positive bone biopsy culture results in terms of all positive BP cases

	Retro- spective study	Prospect- ive study	BP only	Taking into account all positive BP cases in the prospective study
Positive bone biopsy culture at the level of major limb amputation	42.1%	10.7%	50%	16.1%
The same microorganisms identified at the distal site	69.6%	41.76%	77.8%	57.1%

4.6. The value of positive BA cultures on stump healing.

At the follow-up period, positive BA culture results increased the risk of prolonged complete stump healing by 6.86 times (RR=6.86; 95% CI (2.36–19.91), p=0.04), the risk of re-amputation by 6.4 times (RR=6.4; 95% CI (2.37–17.26), p=0.038) and the risk of the need of antibiotics by 7.75 times (RR=7.75; 95% CI (3.24–18.52), p=0.002). Positive BA was associated with the need of antibiotics (however, only in the patients with

peripheral vascular disease, male sex or age ≥ 55 years). No difference in stump healing in diabetic and non-diabetic patients was observed.

4.7. Comparison of BD culture results with the results of the ulcer swab cultures

Based on medical charts, before amputation, 15 patients underwent ulcer swab cultures from the distal site. Matching microorganisms isolated from BD and ulcer swab cultures were present in 33.33% of the cases with positive culture results. In all these cases before amputation, the patients had been on antibiotic therapy.

CONCLUSIONS

1. Our results suggest that, regardless of the diabetes status, foot infection may silently spread along the bone and may reach the site of major limb amputation in 16.1–42.1% of the cases even if the level of limb amputation is distant from the infection source responsible for amputation. The signs of infection were found in the histopathological assessment of BA later than in the microbiological assessment of BA. Positive BA was associated with amputation below the knee, history of previous amputations, infectious complications, a longer interval from the moment the decision to amputate was made and the time of the surgical procedure and a shorter total duration of antibiotic therapy before amputation.
2. In 57.1–69.6% of the cases, the same microorganisms (same species, antibiogram, genotype) were identified from BA and BD cultures. In most cases (77.8%), presumed below-the-knee amputation required antibiotic therapy according to the results of bone biopsy.
3. The microorganisms identified from BA play a role in stump healing. Positive BA culture results increase the risk of prolonged complete stump healing by 6.86 times (95% CI (2.36–19.91)), the risk of re-amputation by 6.4 times (95% CI (2.37–17.26)) and the risk of the need of antibiotics by 7.75 times (95% CI (3.24–18.52)).

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

BA is useful during major limb amputation due to infectious complications, in particular in less radical (below the knee) amputations. Antibiotic therapy could be corrected on the basis of the BA culture results.

PRIEDAI

Tyrimo anketa ir leidimai

1. ID

--	--	--	--
2. Lytis: vyras – 1, moteris – 2

--
3. Gimimo data (metai, mėnuo, diena)

--	--	--	--	--	--	--	--
4. Amžius (metai)

--	--	--
5. Ligoninė: LSMU ligoninė Kauno klinikos – 1,
Kauno klinikinė ligoninė – 2, Respublikinė Kauno
ligoninė – 3

--
6. Kaulo biopsijos data (metai, mėnuo, diena)

--	--	--	--	--	--	--	--
7. Patologijos pradžia:
infekcija – 1, trauma – 2, trofikos sutrikimai – 3

--
8. Osteoartritas: ne – 0, taip – 1

--
9. Pažeidimo vieta – pėda: ne – 0, taip – 1

--
10. Pažeidimo vieta – blauzda: ne – 0, taip – 1

--
11. Pažeidimo vieta – visa koja: ne – 0, taip – 1

--
12. Buvusi anamnezėje kojos trauma: ne – 0, taip – 1

--
13. Diagnozuota diabetinė pėda: ne – 0, taip – 1

--
14. Cukrinis diabetas: ne – 0, taip – 1

--
15. Amputacijos lygis: žemiau kelio – 1, aukščiau kelio – 2

--
16. Imunosupresija: ne – 0, taip – 1

--
17. Arterijų patologija: ne – 0, taip – 1

--
18. Gulintis, slaugomas ligonis: ne – 0, taip – 1

--
19. Gretutinė patologija (inkstų, širdies ar kepenų
nepakankamumas): ne – 0, taip – 1

--

20. Patologijos pradžia (metai, mėnuo, diena)
21. Patologijos trukmė iki amputacijos (dienos)
22. Priežastis amputacijai: nefunkcionuojanti koja – 1, nekontroliuojama infekcija – 2, trofikos sutrikimai – 3, nekontroliuojamas skausmas – 4, didelė išemija – 5
23. Pasiūlytos amputacijos data (metai, mėnuo, diena)
24. Laikas nuo pasiūlymo iki amputacijos (dienos)
25. Anamnezėje buvę amputacijos: ne – 0, taip – 1
26. Suminė antibiotikoterapijos trukmė prieš amputaciją (dienos)
27. Ar vartoti antibiotikai prieš pat amputaciją? ne – 0, taip – 1
28. Jei ne, tai kiek laiko nevartoti antibiotikai iki operacijos? (dienos)
29. Paskutinė antibiotikoterapija prieš amputaciją (*įrašyti*) _____
30. Ar anamnezėje atlikta angioplastika? ne – 0, taip – 1
31. Ar patikrinta kraujagyslių būklė prieš amputaciją? ne – 0, taip – 1
32. Jei taip, koks atliktas kraujagyslių tyrimas? (*įrašyti*) _____
33. Ūgis (cm)
34. Svoris (kg)
35. Kulkšnies – žasto indeksas
36. Leukocitai ($\times 10^{12}$ L)
37. Hemoglobinas (g/L)
38. Trombocitai ($\times 10^9$ L)
39. CRB (mg/l)

40. Kreatininas (mkmol/l)
41. Urea (mmol/l)
42. Glikemija (mmol/l)
43. Albuminas (g/l)
44. Glomerulų filtracijos greitis (ml/min.)
45. Glikuotas hemoglobinas (proc.)
46. Ar atlikta rentgenograma prieš amputaciją? ☐
ne – 0, taip – 1, jei taip, *įrašyti* pagrindinius pakitimus _____
47. Ar atlikta kompiuterinė tomograma prieš amputaciją? ☐
ne – 0, taip – 1, jei taip, *įrašyti* pagrindinius pakitimus _____
48. Ar atlikta scintigrafija prieš amputaciją? ☐
ne – 0, taip – 1, jei taip, *įrašyti* pagrindinius pakitimus _____
49. Ar atliktas magnetinis rezonansas prieš amputaciją? ☐
ne – 0, taip – 1, jei taip, *įrašyti* pagrindinius pakitimus _____
50. Ar radiologiniai tyrimai stebėti dinamikoje? ☐
ne – 0, taip – 1, jei taip, *įrašyti* pagrindinius pakitimus _____
51. Kaulo bioptato tyrimas pėdos srityje: nėra osteomielito požymių – 0, yra osteomielito požymiai – 1 ☐
52. Kaulo bioptato tyrimas amputacijos pjūvio vietoje: nėra osteomielito požymių – 0, yra osteomielito požymiai – 1 ☐
53. Mikrobiologinių mėginių kiekis ☐
54. Ar rasti sukėlėjai pėdos srityje? ne – 0, taip – 1 ☐
55. Jei taip, kokie ir kokioj terpėj? (*įrašyti*) _____
56. Ar rasti sukėlėjai amputacijos pjūvio vietoje? ☐
ne – 0, taip – 1
57. Jei taip, kokie ir kokioj terpėj? (*įrašyti*) _____
58. Rastų sukėlėjų antibiotikograma (*įrašyti* į 1 lentelę)
59. Ar atlikta kaulo biopsija prieš amputaciją? ☐
ne – 0, taip – 1

60. Kiti rasti sukėlėjai pėdos kaulo biopsijos ir pasėlių su tamponu metu, atliktų prieš amputaciją (*įrašyti*) _____

61. Bakterijų tipavimas (jeigu atliktas) _____

62. Kokie skirti antibiotikai po operacijos i/v? (*įrašyti, jei skirti*) _____

63. Kada skirti antibiotikai po operacijos? (metai, mėnuo, diena)

--	--	--	--	--	--	--	--
64. Antibiotikų dozė (*įrašyti*) _____
65. Gydomo trukmė (dienos)

--	--	--	--	--
66. Kokie skirti antibiotikai išleidžiant? (*įrašyti*) _____

67. Praėjus metams po amputacijos ar pritaikytas protezas? ne – 0, taip – 1 ☐
68. Ar užgijusi bigė? ne – 0, taip – 1 ☐
69. Pjūvio užgijimo trukmė po amputacijos (dienos)

--	--	--	--	--
70. Ar atlikta pakartotinė operacija? ne – 0, taip – 1 ☐
71. Jei taip, kada atlikta pakartotinė operacija? (metai, mėnuo, diena)

--	--	--	--	--	--	--	--
72. Ar skirti pakartotinai antibiotikai dėl bigės? ne – 0, taip – 1 ☐
73. Jei taip, tai kada skirti antibiotikai? (metai, mėnuo, diena)

--	--	--	--	--	--	--	--
74. Jeigu ligonis miręs, ar priežastis buvo susijusi su galūnės patologija? ne – 0, taip – 1 ☐
75. Kita svarbi informacija _____

20 lentelė. Iš kaulo biopstatų išskirtų sukėlėjų jautrumas antibiotikams
(j – jautru, mj – mažai jautru, a – atsparu)

[illegible]



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

LSMUL KK Eivenių g. 2, 50009 Kaunas, tel. +370 37 326243, e-mail: n.aurelija@yahoo.com

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2012-05-14 Nr. BE-2-23

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksnių ir teigiamos kaulo kultūros prognostinės reikšmės nustatymas sergantiems ir nesergantiems cukriniu diabetu“

Protokolo Nr.:	1
Data:	2011-12-15
Versija:	1
Pagrindinis tyrėjas:	Gyd. dr. R. Šulcaitė
Biomedicininio tyrimo vieta:	LSMUL Kauno klinikos
Ištaigos pavadinimas:	Endokrinologijos klinika, Chirurgijos klinika, Širdies, krūtinės ir kraujagyslių klinika, Anatomijos institutas, Laboratorinės medicinos klinika
Adresas:	Eivenių g. 2, LT- 50009, Kaunas Mickevičiaus g. 9, LT -44307, Kaunas Kauno klinikinė ligoninė LSMU Infekcinių ligų klinika, Chirurgijos profilio skyriai Josvainių g. 2, LT- 47144, Kaunas Respublikinė Kauno ligoninė Chirurgijos klinika Hipodromo g. 13, LT- 45130, Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio 2012 m. gegužės 7 d. (protokolo Nr. 59/2012) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininio Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Doc. Irena Marchertienė	anestezilogija	taip
2.	Doc. Romaldas Mačiulaitis	klinikinė farmakologija	taip
3.	Prof. Nijolė Dalia Bakšienė	pediatrija	taip
4.	Prof. Irayda Jakušvaitė	filosofija	taip
5.	Dr. Eimantas Peičius	filosofija	taip
6.	Laima Vasiliauskaitė	psichoterapija	ne
7.	Gintaras Česnauskas	chirurgija	ne
8.	Zelmas Šapiro	terapija	ne
9.	Jurgita Laurinaitytė	bioteisė	ne

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaujamas Etikos principais nustatytais biomedicininio tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkė

Irena Marchertienė



Irena Marchertienė



VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

Lietuvos sveikatos mokslų universitetui
A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas
(reg. laišku ir el. p. danguole.simanaityte@gmail.com)

Pagr. tyrėjai dr. R. Šulcaitei

SPRENDIMAS DĖL LEIDIMO LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETUI ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO VEIKSMUS

2014 m. gruodžio 5 d. Nr. 2R- *6244* (2.6-1.)
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, išnagrinėjusi 2014-09-30 Pranešimą dėl išankstinės patikros Nr. DVT2-1491 (toliau – Pranešimas) (Inspekcijoje gauta 2014-10-07, reg. Nr. 1R-5696(2.6.), 2014-11-28 raštu Nr. DVT2-2096 (Inspekcijoje gauta 2014-12-03, reg. Nr. 1R-7254(2.6.) pateiktus patikslinimus,

n u s t a t ė,

kad Pranešime ir jo patikslinimuose nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus, bei numatytos tinkamos organizacinės ir techninės duomenų saugumo priemonės.

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2006 m. vasario 2 d. įsakymu Nr. 1T-6 patvirtintų Išankstinės patikros atlikimo taisyklių 11 ir 18.1 punktais,

n u s p r e n d ž i a

Lietuvos sveikatos mokslų universitetui išduoti leidimą atlikti Pranešime nurodytų asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „Apatinių galūnių didžiųjų amputacijų rizikos veiksnių ir teigiamos kaulo kultūros prognostinės reikšmės nustatymas sergantiems ir nesergantiems cukriniu diabetu.“ tikslu veiksmus.

Direktorius



Algirdas Kunčina

dr. Algirdas Kunčina

V. Gedeikė, tel. (8 5) 219 7271, el. p. valerija.gedeike@ada.lt
A. Gučienė, tel. (8 5) 219 7264, el. p. ausra.guciene@ada.lt


euras.lt

Biudžetinė įstaiga
A. Juozapavičiaus g. 6
LT-09310 Vilnius

Tel. (8 5) 279 1445
Faks. (8 5) 261 9494
El. n. ada@ada.lt

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 188607912

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Danguolė Važnaisienė
Address: Baltijos 120, Department of Infectious Diseases of Lithuanian University of Health Sciences, LT-47116 Kaunas, Lithuania
E-mail: danguole.simanaityte@gmail.com, danguole.vaznaisiene@lsmuni.lt

Medical education:

2005 MD diploma, Kaunas University of Medicine, Lithuania (MA Nr. 0000199)
2005–2006 Second Clinical Hospital of Kaunas, medical internship (IP Nr.000372)
2006 Professional qualification of medical doctor (Nr. MPL-08439)
2006–2010 Residency of Infectious Diseases at the Department of Infectious Diseases of Lithuanian University of Health Sciences (RP Nr. 000791)
2010 Professional qualification of Infectious Diseases doctor (Nr. MPL-15924)
2011–2015 PhD studies at the Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Department of Infectious Diseases

Current position:

Infectious Diseases Physician at the Department of Infectious Diseases, Kaunas Clinical Hospital, since August 2010
Lecturer at the Department of Infectious Diseases of Lithuanian University of Health Sciences, since February 2016

Fellowships:

March 2008 – September 2008 University of Versailles, Department of Infectious Diseases, Paris, France
March 2009 – February 2010 Lille University, Department of Infectious Diseases, Bone and Joint Infections Reference, Tourcoing, France
May 2011 Salzburg Infectious Diseases seminars, Austria

Membership of professional societies:

Lithuanian Society of Infectious Diseases
European Bone and Joint Infection Society (country delegate)

Knowledge of languages:

French, English, Russian, Italian, Esperanto

Family status: married, two children

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju

LSMU Infekcinių ligų klinikos vadovei, šio darbo mokslinei vadovei profesorei Auksei Mickienei už skirtą brangų laiką, idėjas, pastabas, puikų vadovavimą bei kantrybę.

LSMU Endokrinologijos instituto docentei Ritai Šulcaitei ir kolektyvui, šio darbo moksliniam konsultantui, Prancūzijos Lilio universiteto Infekcinių ligų klinikos vadovui profesoriui Eric Senneville, Turkueno universitetinės ligoninės buvusiam Infekcinių ligų klinikos vadovui profesoriui Yazdan Yazdanpanah ir kolektyvui, Turkueno universitetinės ligoninės Ortopedijos ir traumatologijos klinikos vadovui Eric Beltrand, LSMU Anatomijos instituto vadovui profesoriui Dainiui Haroldui Paužai, neuromorfologijos laboratorijos vedėjai Kristinai Rysevaitei-Kyguolienei ir kolektyvui, LSMU Laboratorinės medicinos klinikos vadovei profesorei Astrai Vitkauskienei, mikrobiologei Daivai Jomantienei ir kolektyvui, Kauno klinikinės ligoninės mikrobiologei Gintarei Sinkutei, LSMU ligoninės Kauno klinikos, Kauno klinikinės ligoninės ir Respublikinės Kauno ligoninės chirurgams, angiochirurgams ir traumatologams bei jų kolektyvams, LSMU fizikos, matematikos ir biofizikos katedros vedėjui profesoriui Viktorui Šaferiui, LSMU profilaktinės medicinos katedros docentei Rimai Kregždytei už Jūsų begalinį geraširdiškumą, man skirtą brangų laiką, nuoširdžią pagalbą, už įkvėpimą, paskatinimą ir vertingus patarimus.

LSMU Mokslo centro darbuotojoms už visapusišką pagalbą. Dėkoju LSMU Mokslo fondui už materialinę paramą darbo priemonėms įsigyti. Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už paskirtą doktoranto stipendiją už akademinį pasiekimą.

Su didele pagarba noriu padėkoti ir pirmiesiems savo mokytojams – profesoriui Alvydui Pranui Laiškoniui ir docentei Vidai Marijai Bareišienei už nuoširdų palaikymą.

Visiems mano artimiesiems, draugams, bendradarbiams, ir mano brangiausiai šeimai už kantrybę, padrąsinančius žodžius, pagalbą, pasitikėjimą ir galimybes...

Taip pat ligoniams, tikėdamasi, kad šis darbas turi ne tik mokslinę, bet ir klinikinę prasmę.