

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002195

负压吸引加碘伏冲洗对于糖尿病足创面生物膜的影响

汤 洋, 简华刚, 余梦婷, 唐秋霞

(重庆医科大学附属第二医院急诊外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨生物膜在糖尿病足(diabetic foot, DF)患者创面愈合时的影响及初步的干预方法。**方法:**选取 2016 年 8 月至 2018 年 8 月住院接受负压吸引加碘伏冲洗治疗且资料完整的 DF 患者, 对于治疗期间清创提取的分泌物标本进行细菌培养。选取部分病例, 取创面基底组织进行革兰染色及阿辛蓝染色在光学显微镜下观察。取同一创面基底组织在透射电子显微镜下观察。所有数据录入 SPSS 24.0 统计软件进行统计分析。**结果:**细菌培养阳性结果的阳性率为 58.3%, 最常见的细菌为金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和表皮葡萄球菌。在光学显微镜和透射电子显微镜下观察到细菌生物膜。通过负压吸引加碘伏冲洗治疗干预后, 住院治疗 30 d 的愈合率为 68.3%。DF 治疗周期中位数为 20 d, 四分位间距(9, 35) d。干预 30 d 后白细胞均值为 $(6.920 \pm 3.149) \times 10^9$ 个/L。**结论:**DF 创面感染时在光镜和透射电镜下证实疑似物质为细菌生物膜。负压吸引加碘伏冲洗治疗可以减少细菌生物膜在创面的生存机会。

【关键词】糖尿病足; 生物膜; 负压吸引治疗; 碘伏冲洗

【中图分类号】R641

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-24

Effect of negative pressure suction and iodophor washing on biofilm in diabetic foot wounds

Tang Yang, Jian Huagang, Yu Mengting, Tang Qiuxia

(Department of Emergency Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of biofilm on wound healing in diabetic foot (DF) patients and preliminary intervention. **Methods:** Patients with DF who were hospitalized from August 2016 to August 2018 and received negative pressure suction and iodophor washing were selected for bacterial culture of secretion specimens isolated from debridement during treatment. Gram staining and alcian blue staining were used to observe the basal tissues of the wound in some cases under optical microscope, and the basal tissues of the same wound were also observed under transmission electron microscopy. All data were entered into SPSS 24.0 software for statistical analysis. **Results:** The results of positive bacterial culture had a positive rate of 58.3%, and *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus epidermidis* were the most common bacteria. Bacterial biofilms were observed under both optical and transmission electron microscopes. After the intervention of negative pressure suction and iodophor washing, the healing rate was 68.3% after 30 days of hospitalization. The median duration of treatment for DF was 20 days (interquartile range: 9–35 d). The mean white blood cell count was $(6.920 \pm 3.149) \times 10^9$ /L after 30 days of intervention. **Conclusion:** The suspected substance was confirmed as bacterial biofilm by optical and transmission electron microscopy in DF wound infection. Negative pressure suction plus iodophor washing can reduce the chance of survival of bacterial biofilm in wounds.

【Key words】diabetic foot; biofilm; negative pressure suction therapy; iodophor washing

糖尿病足(diabetic foot, DF)是糖尿病最严重的并发症之一。由于糖尿病患者在高血糖水平下导致

周围神经病变及末梢微循环障碍, 从而使得细菌定植于创面上形成感染。这种感染往往是多种细菌共同存在的感染, 在临床常规治疗手段下不易控制。研究显示: 感染是 DF 慢性溃疡下肢截肢的独立危险因素^[1-3]。

DF 感染不易控制的重要原因之一是形成的细

作者介绍: 汤 洋, Email: tyjy90hou@sina.com,

研究方向: 创面临床研究。

通信作者: 简华刚, Email: hgjian@sohu.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190603.1534.008.html>

(2019-06-04)

菌生物膜。细菌生物膜为细菌提供了物理保护,使得细菌免受抗菌剂的渗透^[4]。细菌生物膜显著延迟了创面再上皮化,延迟程度取决于该细菌形成生物膜的能力^[5]。细菌生物膜还可以使人体自身免疫系统无法杀伤细菌生物膜及包裹在其内部的细菌。细菌生物膜通过其胞外基质保护细菌免于受到人体自身免疫系统的攻击^[6]。研究表明,免疫杀伤物质(如中性粒细胞)可以穿透细菌生物膜,但并不发挥作用,而是穿透细菌生物膜并沉积在其底部。细菌生物膜还可以释放能够杀伤中性粒细胞的物质,并且协同白细胞介素帮助细菌存活^[7]。

临床常见的 DF 治疗方式包括定期清创、抗感染治疗和常规的创面护理;也有采用干细胞移植、富血小板凝胶的应用、皮瓣移植等治疗方式^[8]。临床上,这些治疗方式对创面生物膜的清创效果并不理想。

近年来,碘伏作为常规的抗菌剂,采用负压吸引冲洗治疗的临床实践被证实有助于清除坏死组织,保持创面的湿平衡,减少细菌负荷,消除细菌生物膜以达到清洁创面的目的^[9-10]。本文引入负压吸引加碘伏冲洗作为干预 DF 创面的手段。近年来,国内外对 DF 的血管及神经病变已有不少研究,但在 DF 发生感染时生物膜作用的临床研究尚少,因此本文还重点研究了临床 DF 生物膜的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2016 年 8 月至 2018 年 8 月,重庆医科大学附属第二医院急诊外科收治的 DF 患者,且符合慢性创面细菌生物膜临床判别标准的患者作为研究对象。共计 60 例,所有患者均签署知情同意书,其中男性患者 38 例、女性患者 22 例,年龄 22~88 岁,平均 (65.77 ± 14.8) 岁。DF 治疗周期 11~145 d,平均 20(9,35) d。

1.2 方法

1.2.1 基本治疗 所有选定的患者在入院后均接受基本治疗。根据入院后监测得到的血糖水平进行口服糖尿病药物或者注射胰岛素,控制血糖并监测血糖水平。对全身感染症状较重的患者给予抗感染治疗。对其他各类基础疾病给予相应的治疗。

1.2.2 临床判别标准 2012 年墨西哥生物膜研讨会发布的临床细菌生物膜的判别标准:苍白水肿的创面基底;脆弱

的肉芽组织;大量的黄色渗液;坏死腐烂组织;创面疼痛;创面有腐臭味道^[11]。

1.2.3 清创取样 患者入院后对其创面予以清创处理。清创前,先用聚维酮碘将创面及周围区域消毒 3 遍,并用生理盐水冲洗 3 遍,清除坏死组织,以去除表面菌群避免杂菌污染。用无菌拭子采集病灶基底部的分泌物,用做细菌培养。用无菌组织剪剪取病灶基底部组织,用中性甲醛及戊二醛固定,行显微镜下染色观察。最后对患者用生理盐水、过氧化氢溶液、聚维酮碘进行反复冲洗,直至创面清洁。

1.2.4 骨髓炎治疗 对于通过足踝部 X 线检查发现有并发骨髓炎的 DF 患者,在采用抗生素抗感染治疗的基础上进行清创术,清除坏死组织,并用专业工具将坏死骨去除。彻底清洁创面后,进行负压创面治疗。待感染控制局部创面清洁后行皮瓣修复术。

1.2.5 负压治疗 清创完毕之后进行 NPWT,于创面内填充泡沫,安置引流管,装置表面予以创面敷料覆盖固定。将引流管接至床旁引流瓶内(该装置连接中心负压吸引器),冲洗管则连接袋装碘伏冲洗,24 h 不间断负压吸引,冲洗液滴速设置为:40 滴/min。每天冲洗液用量为 1 000 mL。每 3~4 d 更换负压装置。每次安装新的负压装置之前,先对创面进行清创。直至创面清洁后,用缝合、植皮、转移皮瓣等方式消灭创面。

1.2.6 细菌培养 将上述采集的标本送检验科行细菌培养,由专业技术人员对标本进行分离、接种和普通培养,培养结果经双人核对后出具正式报告。

1.3 观察指标

记录每个患者基本信息。

1.4 光镜及电镜观察

选取部分患者,在清创期间清洗创面(上文提及方法)去除表面杂菌后,于创面基底部取小块组织。一部分放入中性甲醛固定,行病理切片,半数行革兰染色,半数行阿辛蓝染色,在光学显微镜下观察显微结构;另一部分放入戊二醛固定,行病理切片,并行鞣酸染色后在透射电子显微镜下观察显微结构。

1.5 愈合标准

以患者的创面自然愈合或能够皮片移植、手术缝合等方式闭合作为愈合的标准。

1.6 统计学处理

数据采用统计软件 SPSS 24.0 进行统计分析。患者年龄的数据和白细胞均值为正态计量资料,采用均数加减标准差形式表示;DF 的治疗周期(d)为非正态计量资料,采用中位数(M)和四分位间距(Q_1, Q_3)表示;患者的创面菌株分布情况和干预后(30 d 内)的愈合情况为计数资料,用率和构成比表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 骨髓炎及感染结果

60 例病例均进行了足踝部 X 线片检查以确定是否存在骨髓炎,其中患骨髓炎 39 例,阳性率 65%。60 例病例均在干预期间监测了血常规中的白细胞值,入院时白细胞均值为 $(8.89 \pm 4.20) \times 10^9$ 个/L,干预 6 d 后白细胞均值为 $(7.41 \pm 3.23) \times 10^9$ 个/L,干预 12 d 后白细胞均值为 $(7.65 \pm 2.99) \times 10^9$ 个/L,干预 18 d 后白细胞均值为 $(7.61 \pm 4.14) \times 10^9$ 个/L,干预 24 d 后白细胞均值为 $(7.29 \pm 4.59) \times 10^9$ 个/L,干预 30 d 后白细胞均值为 $(6.920 \pm 3.149) \times 10^9$ 个/L。

2.2 细菌培养结果

60 例病例均进行了创面分泌物取样及细菌学培养鉴定。其中,条件致病菌生长 35 例,细菌培养阳性结果的阳性率为 58.3%。总计分离出 64 例菌株,金黄色葡萄球菌 13 例,粪肠球菌 6 例,表皮葡萄球菌 5 例,革兰阴性菌 23 例(占有分离出细菌的 65.7%)。干预后(30 d 内)愈合率为 68.3%,其余病例均于 150 d 内愈合。使用 NPWT 周期为 11~145 d,平均 20(9,35) d。见图 1。

2.3 病理切片革兰染色结果

从图 2(0 d)、图 3(0 d)中可以看出大量细菌聚集现象(图中白色箭头所指区域为细菌密集区)。从图 2(6 d)、图 3

(6 d)中可以看出部分细菌聚集现象(图中白色箭头所指区域为细菌密集区)。

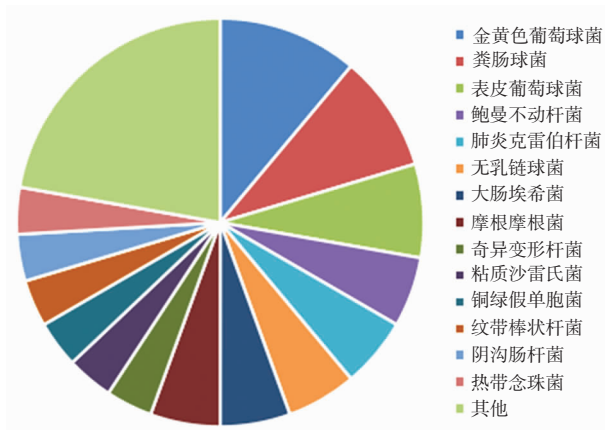


图 1 创面主要细菌分布情况图

2.4 病理切片阿辛蓝染色结果

从图 4(0 d,6 d)、图 5(0 d,6 d)可以看出,深蓝色部分即为蛋白-黏多糖物质(图中白色箭头所指)。

2.5 透射电子显微镜结果

图中可见细菌在组织间被较厚的膜包绕,从图 6(0 d,6 d)、图 7(0 d,6 d,12 d)中可见细菌包膜明显增厚,周围亮区(鞣酸染色的胞外多糖物质)包绕细菌组成细菌生物膜(图中白色箭头所指区域)。从图 7(6 d)中还可看出细菌胞外基质中的蛋白多糖颗粒(图中黄色箭头所指区域)。

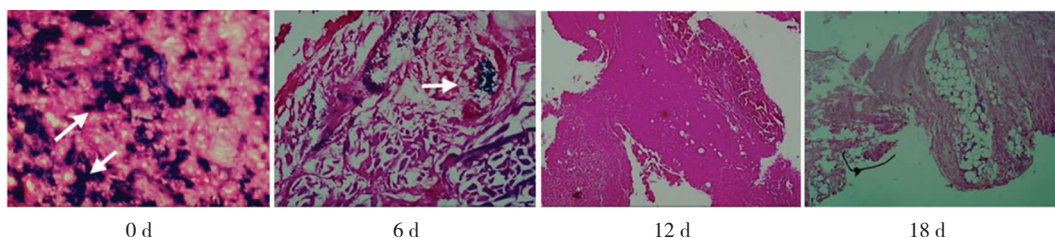


图 2 患者 A 革兰染色病理切片图

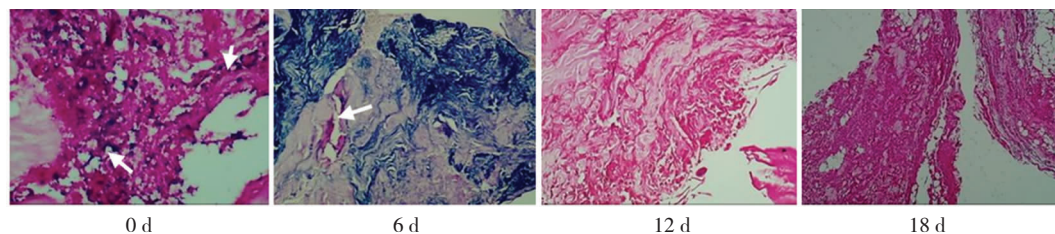


图 3 患者 B 革兰染色病理切片图

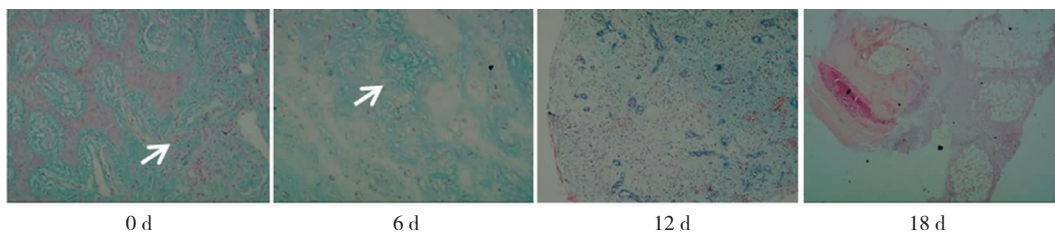


图 4 患者 A 阿辛蓝染色病理切片图

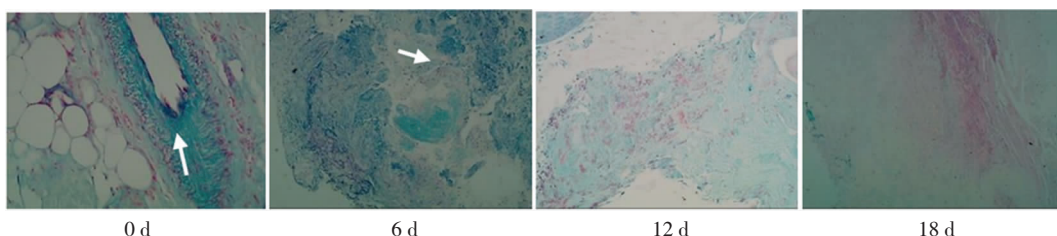


图 5 患者 B 阿辛蓝染色病理切片图

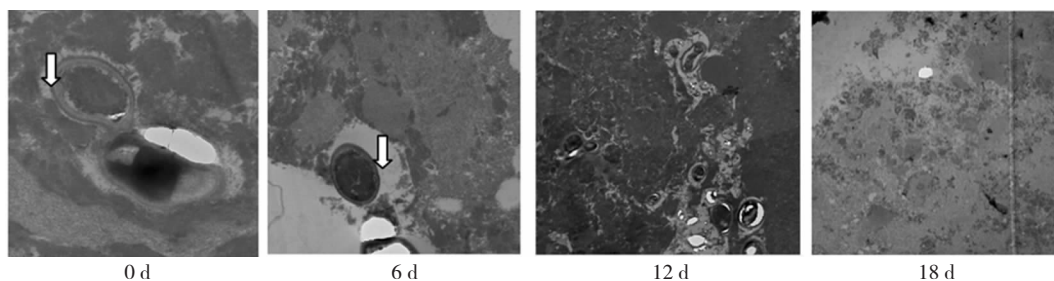


图 6 患者 A 透射电子显微镜图

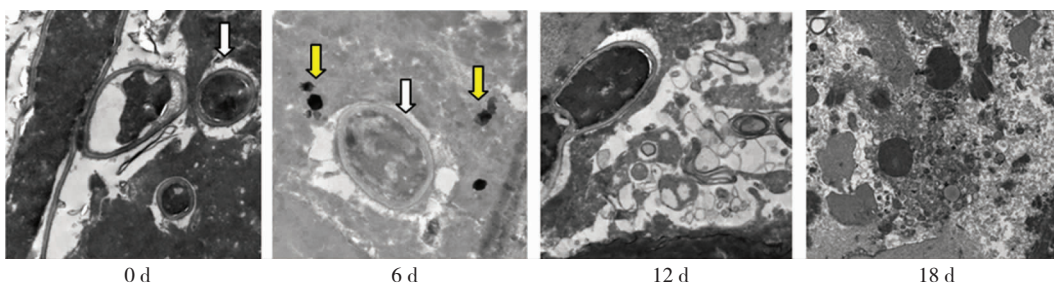


图 7 患者 B 透射电子显微镜图

3 讨论

糖尿病终末期病变之一,就是肢体末梢的循环和神经受损,从而导致 DF 的创面愈合延迟,再加之高糖状态易导致细菌感染从而导致创面愈合延迟或不愈合^[12-13]。在 DF 伤口感染的边缘,角质形成细胞表现出不迁移和不能完全分化^[14]。细菌间的群体感应不仅发生在相同物种的细菌中,而且发生在一起进化的异质微生物群中^[15]。群体感应效应是细菌形成生物膜的重要因素,虽然目前具体机制尚不明确,但相关研究表明,群体感应效应可以影响生物膜结构并提升细菌生物膜耐受抗菌治疗的能力。群体感应效应还可以激活一系列的细菌毒力因子,并且某些群体感应效应缺失的菌株已经被证实不易形成细菌生物膜^[16-18]。

本研究发现:在 DF 患者清创所取得的样本的病理切片,革兰染色后,经显微镜观察发现染色后呈红色的细菌聚集在一起,以至于视野内出现聚集的

细菌堆叠成黑色的现象,这表明本组 DF 患者创面不仅有大量的细菌存在,这些细菌还出现了聚集现象,而细菌聚集的现象正是细菌生物膜形成的基础。

通过对同一创面样本的病理切片后行阿辛蓝染色,经显微镜观察发现视野内大量的染色后呈蓝色的蛋白-黏多糖物质,这种物质则是包绕细菌,使得细菌免于宿主防御攻击及抗生素杀灭的重要物质,也是细菌生物膜的重要组成部分。在透射电子显微镜观察下,细菌有不同厚度的细胞壁,部分细胞壁有表面凸起和尖刺,但没有鞭毛形成。电子染色后显示有多糖物质包绕细菌,在细菌周围也发现了明显的胞外多糖基质(图 7)。有些细菌在胞外基质中可见蛋白多糖颗粒(图 7,6 d)。有些细菌在细菌壁周围可见清晰的光晕,这种光晕是由胞外多糖物质组成的,这种多糖物质如上所述是生物膜组成的基础物质之一。这些在电子显微镜下的观察结果,进一步证实了 DF 患者创面细菌生物膜的存在。

通过对住院期间行 NPWT 加碘伏冲洗治疗的干预措施,对部分 DF 慢性创面的病例进行动态观察

发现,在未治疗时,先发现有细菌存在,继而观察到大量的细菌聚集及大量的包绕细菌组成生物膜的蛋白-黏多糖物质的存在,最终在电子显微镜观察中证实细菌生物膜的存在;在治疗 6 d 后仍可观察到细菌生物膜的存在,但观察到细菌数目及蛋白-黏多糖物质较处理前显著减少;在治疗 12 d 后仍可观察到细菌生物膜的存在,但观察不到细菌及蛋白-黏多糖物质;同时发现患者创面感染情况通过临床标准判断也逐步好转,感染征象逐渐减轻;在治疗 18 d 后患者创面临床判别无感染征象,此时光镜及电镜观察不到细菌生物膜的存在,也观察不到细菌及蛋白-黏多糖物质。

根据对部分病例 NPWT 引加碘伏冲洗治疗的动态观察,发现在干预过程中,随着时间的推移 DF 患者创面感染征象,肉眼观察可见的逐步减轻。与此同时,通过光镜观察患者创面病理切片从可见大量细菌成团聚集、大量可导致细菌生物膜形成的蛋白多糖物质聚集,直到观察不到细菌与导致细菌生物膜形成的蛋白多糖物质。通过电子显微镜观察也从能明显观察到细菌生物膜和组成细菌生物膜的胞外多糖物质,直到观察不到细菌生物膜及胞外多糖物质。至 18 d DF 患者创面临床观察无感染征象,显微镜观察也观察不到细菌及细菌生物膜的存在,自 18 d 后创面基本转为清洁创面,清洁创面正是患者创面得以最终愈合的基础。

综上所述,DF 慢性感染的主要菌种为金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和表皮葡萄球菌等。在光学显微镜下可观察到创面基底组织有细菌聚集现象,有疑似细菌生物膜的物质存在。在透射电子显微下观察证实疑似物质为细菌生物膜。通过负压吸引加碘伏冲洗治疗,保持创面的湿平衡,减少细菌负荷,从而达到清除细菌生物膜的目的。本文是在临床上对 DF 细菌生物膜的初步研究,下一步将继续研究 DF 生物膜形成机理,找出一种更为有效的 DF 治疗方法。

参 考 文 献

[1] Pickwell K, Siersma V, Kars M, et al. Predictors of lower-extremity amputation in patients with an infected diabetic foot ulcer[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(5): 852-857.
[2] Peters EJ, Lipsky BA. Diagnosis and management of infection in the diabetic foot[J]. *Med Clin North Am*, 2013, 97(5): 911-946.

[3] Lavigne JP, Sotto A. Microbial management of diabetic foot osteomyelitis[J]. *Future Microbiol*, 2017, 12: 1243-1246.
[4] Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, et al. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model[J]. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(3): 354-359.
[5] Jeffcoate WJ, Vileikyte L, Boyko EJ, et al. Current challenges and opportunities in the prevention and management of diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(4): 645-652.
[6] Wilkinson HN, McBain AJ, Stephenson C, et al. Comparing the effectiveness of polymer debriding devices using a porcine wound biofilm model[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2016, 5(11): 475-485.
[7] Bhattacharya M, Berends ETM, Chan R, et al. Staphylococcus aureus biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(28): 7416-7421.
[8] Braun LR, Fisk WA, Lev-Tov H, et al. Diabetic foot ulcer: an evidence-based treatment update[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2014, 15(3): 267-281.
[9] Motiei M, Sadan T, Zilony N, et al. Gold nanoparticles for tracking bacteria clearance by regulated irrigation and negative pressure-assisted wound therapy[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13(15): 1835-1945.
[10] Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments[J]. *Adv Ther*, 2017, 34(3): 599-610.
[11] Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65(2): 127-145.
[12] Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and diabetic foot syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): E917.
[13] Andrews KL, Houdek MT, Kiemlele LJ. Wound management of chronic diabetic foot ulcers: from the basics to regenerative medicine[J]. *Prosthet Orthot Int*, 2015, 39(1): 29-39.
[14] Ganesh K, Sinha M, Mathew-Steiner SS, et al. Chronic wound biofilm model[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4(7): 382-388.
[15] Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, et al. Rethinking communication in the immune system: the quorum sensing concept[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(2): 88-97.
[16] Herzog R, Peschek N, Fröhlich KS, et al. Three autoinducer molecules act in concert to control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(6): 3171-3183.
[17] Niederholtmeyer H, Chaggar C, Devaraj NK. Communication and quorum sensing in nonliving mimics of eukaryotic cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5027.
[18] Kalia VC, Patel SKS, Kang YC, et al. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 68-90.

(责任编辑:冉明会)