

Mikrobiálne spoločenstvá a ich vplyv na liečbu diabetickej nohy

Michal Kajsík¹, Pavol Janega^{1,2}

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK v Bratislave

Chronické, ťažko liečiteľné ulcerácie diabetickej nohy spôsobujú veľkú záťaž pre pacienta aj pre systém zdravotnej starostlivosti. Napriek použitiu mnohých konvenčných a alternatívnych spôsobov liečby nedokážeme spoľahlivo zabrániť infekcii, ktorá často vedie k sepsu, prípadne až k amputácii nohy. Narastajúce množstvo dát získaných štúdiom infikovaných rán pacientov naznačuje, že zloženie mikrobiómu hrá dôležitú úlohu v procese hojenia rany. K najčastejším bakteriálnym rodom identifikovaným v ranách patria *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*. Moderné štúdium mikrobiómu založené na metódach nezávislých od kultivácie organizmov nám však umožnili odhaliť nielen baktérie, ktoré je náročné kultivovať, ale aj gény virulencie, ktoré majú vplyv na hojenie rany. Podľa nových zistení práve zvýšená diverzita bakteriálneho spoločenstva zvyšuje pravdepodobnosť úspešného hojenia rán.

Kľúčové slová: diabetes mellitus, diabetická noha, mikrobióm, sepsa

Microbial communities and their influence on the treatment of diabetic foot

Chronic, difficult-to-treat diabetic foot ulcerations place a massive burden on the patient and the healthcare system. Despite using many conventional and alternative treatments, we cannot reliably prevent the infection that often leads to sepsis or even amputation of the foot. The growing amount of scientific data obtained from the study of infected wounds in patients suggests that microbiome composition plays an essential role in wound healing. The most common bacterial genera identified in wounds include *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Pseudomonas*. However, modern microbiome studies based on methods independent of the cultivation of organisms have enabled us to detect bacteria that are difficult to cultivate and virulence genes that affect wound healing. According to new findings, the increased diversity of the bacterial community increases the likelihood of successful wound healing.

Keywords: Diabetes mellitus, Diabetic foot ulcer, Microbiome, sepsis

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 79 – 82

Úvod

K dlhodobým komplikáciám diabetu mellitu patrí periférna neuropatia s rizikom vzniku vredov na nohách. Tieto ulcerácie označujeme pojmom „syndróm diabetickej nohy“ (SDN)⁽¹⁾. Riziko vzniku diabetickeho vredu na nohe pacientov je 19 – 34 %. Vysoká je však miera recidívy vredov, ktorá dosahuje až 40 % do jedného roka po uzdravení a 65 % do piatich rokov⁽²⁾. Bez poskytnutej včasnej a vhodnej starostlivosti vedie ulcerácia k infekcii, ku gangréne, k amputácii a dokonca až k smrti. Celkovo je amputácia dolných končatín u pacientov s diabetom 15× vyššia ako u pacientov bez cukrovky. Odhaduje sa, že približne 50 – 70 % všetkých amputácií dolných končatín je spôsobených diabetickými vredmi. Na vzniku vredov sa podieľa mnoho faktorov. Medzi najzávažnejšie rizikové faktory patrí periférna neuropatia, ochorenie periférnych ciev a sprievodná bakteriálna infekcia, ktorá komplikuje hojenie vredov⁽³⁾. Podľa epidemiologických údajov je asi 50 % prípadov SDN spôsobených výlučne neuropatiou, ktorá narúša normálne ochranné reflexné mechanizmy, čo má za následok vážnu traumu alebo opakované nepozorované poranenie spôsobujúce otvorené rany. Senzorická neuropatia takisto vedie k vzniku abnormalít v proprioceptii, ktoré spôsobujú chybnú záťaž pri chôdzi, čo podporuje tvorbu kalusu alebo

vredov⁽⁴⁾. Druhou častou príčinou ulcerácií sú ochorenia periférnych ciev (PVD), ktoré sú zodpovedné za 15 % prípadov, zatiaľ čo 35 % prípadov ulcerácie nôh sa vyvíja ako kombinácia neuropatie a angiopatie. Ischemické a neuropatické dystrofické tkanivo je citlivé na infekcie a poranenia. Štrukturálne zmeny veľkých a malých ciev spolu s hyperglykémiou môžu zvýšiť vazokonstrikciu a faktory agregácie krvných doštičiek v cievach. To spôsobuje zníženie prekrvenia chodidiel a nervov, čo môže v konečnom dôsledku viesť ku gangréne a k infekcii. Spúšťačiami faktormi sú však často banálne poranenia pokožky spôsobené obuvou alebo poranenia, ktoré vznikajú pri strihaní nechtov⁽⁵⁾.

Liečba syndrómu diabetickej nohy

Konvenčná liečba diabetickej nohy zahŕňa vyčistenie rany, liečbu infekcie antibiotikami a revascularizačné procedúry. Debridement podporuje rast granulačného tkaniva, znižuje riziko infekcie a eliminuje zápach. Časté komplikácie s hojením však viedli k používaniu prídavných terapií, ako je hyperbarická kyslíková terapia, terapie s negatívnym atmosférickým tlakom v oblasti rany alebo využitie sterilných lariet. Tie nielen eliminujú nekrotické tkanivo, ale vlastnými výlučkami

pomáhajú bojovať s infekciou⁽⁶⁾. Liečba SDN je často komplikovaná sprievodnou infekciou, ktorá sa vyskytuje až v 60 % prípadov⁽⁷⁾. Štúdie opisujúce využitie nových prístupov liečby síce reportovali zníženie počtu ulcerácií so sepsou, nedokázali však infekciu eliminovať úplne⁽⁸⁾. Rany na nohách u pacientov s cukrovkou stratili mnohé obranné mechanizmy intaktnej kože, ktoré tak nepredstavujú zábranu pre invázne mikroorganizmy⁽⁹⁾. Dôvody zvýšeného rizika a závažnosti infekcií u osôb s diabetom nie sú úplne jasné. Zdá sa, že cukrovka má multifaktoriálne účinky na rôzne časti imunitného systému, najmä na bunky, ktoré sprostredkujú vrodenú imunitu. Táto imunitná odpoveď pozostáva predovšetkým z lokálnych vazoaktívnych a prozápalových cytokínov, komplementového systému a buniek schopných fagocytózy, t. j. polymorfonukleárných buniek (PMN) a monocytov. Lokálne vazoaktívne cytokíny spôsobujú vazodilatáciu cez reakciu oxidu dusnatého. Pri hyperglykémii však môže dôjsť k dysregulácii tejto reakcie, čo môže, naopak, viesť k vazokonstrikcii, ktorá následne spôsobuje hypoxiu a zhoršený prívod fagocytov. Takisto sa ukázalo, že u osôb s diabetom majú PMN a monocyty viaceré poruchy vrátane chemotaxie, aderenzie, fagocytózy a intracelulárneho zabíjania⁽¹⁰⁾.

Metódy charakterizácie mikrobiómu pri ulceráciách

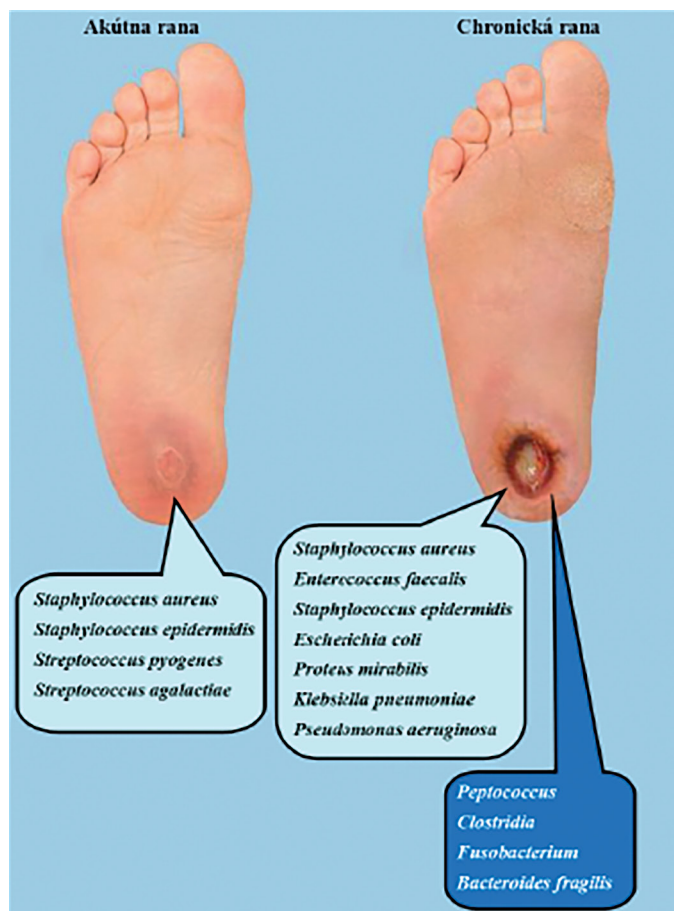
Ulcerácie sú kolonizované spektrom rôznych baktérií, ktorých vplyv na postup infekcie nepoznáme. Klasické metódy založené na kultivácii sú orientované na tie mikroorganizmy, ktorým sa darí rásť v laboratórnych podmienkach a nedostatočne reprezentujú plesňové, kvasinkové a ostatné bakteriálne spoločenstvá⁽¹¹⁾. Z toho dôvodu sa začali využívať metódy nezávislé od kultivácie. Tie sú založené na vysokoparalelnom sekvenovaní a následnej bioinformatickej analýze. Väčšina vedeckých skupín využíva amplikónové sekvenovanie 16S rRNA regiónu, 28S rRNA, prípadne ITS sekvencií, ktoré predstavujú konzervatívne sekvencie obsiahnuté vo všetkých prokaryotických alebo eukaryotických organizmoch. Napriek nesporným výhodám nám metóda ponúka len slabé taxonomické rozlíšenie na úrovni rodov a v niektorých prípadoch aj druhov. Najviac štúdií využíva sekvenovanie 16S rRNA regiónu, ktorý pozostáva z 9 hypervariabilných úsekov (V1-V9), medzi ktorými sa nachádzajú konzervované sekvencie vhodné pre dizajn amplifikačných primerov⁽¹²⁾. Vzhľadom na efektivitu metódy sa neanalyzuje celá oblasť génu 16S rRNA, ale iba jednotlivé úseky. Najčastejšie sa využíva úsek V4, prípadne úseky V1 až V3. Využitie len jednotlivých úsekov však spôsobuje niektoré nedostatky v presnom zaradení do taxonomických jednotiek, napríklad rozlíšenie jednotlivých druhov čeľade *Enterobacteriaceae* alebo druhov rodu *Staphylococcus*. Vážnym nedostatkom sekvenovania regiónu V4 z pohľadu stanovenia mikrobiómu kože je značná nepresnosť pri detekcii komenzálov *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*⁽¹³⁾. Pre lepšie chápanie vplyvu mikrobiómu na hojenie je však potrebné uviesť bakteriálne zloženie na úrovni kmeňa. Zároveň z amplikónového sekvenovania nezískame žiadne informácie o ostatnom genetickom vybavení mikroorganizmov a jeho vplyve na progres infekcie^(13,14). Alternatívou je použitie celogenómového shotgun sekvenovania, ktoré je síce náročnejšie na čas aj zdroje, ale poskytuje viac potrebných informácií o taxonómii mikroorganizmov aj ich rezistencii proti antibiotikám⁽¹³⁾. Na

druhej strane, aj keď sú tieto techniky oveľa citlivejšie ako kultivácia, kvalita extrakcie DNA sa líši v závislosti od druhu, a tak môže stále niesť určitú chybovosť v určení kvantity. Nerozlišujú ani medzi živými a mŕtvymi baktériami a vyžadujú si nákladné vybavenie⁽¹⁵⁾.

Zloženie mikrobiómu syndrómu diabetickej nohy

V zdravom stave kožné komenzálne mikróby koexistujú so svojimi ľudskými hosťiteľmi a pomáhajú predchádzať kolonizácii kože potenciálne patogénnymi mikróbami. Štúdie však preukázali klinicky relevantné rozdiely v kožnom mikrobióme pokožky nohy medzi nediabetickými a diabetickými jedincami, ktoré pravdepodobne prispievajú k vyššej miere kožných infekčných chorôb u diabetických pacientov⁽¹⁶⁾. Dlhodobá štúdia mikrobiómu SDN sledovala zloženie mikrobiálneho spoločenstva ulcerácie v porovnaní s pacientovou zdravou nohou aj s kontrolnou skupinou zdravých jedincov. Mikrobióm rany a nepoškodenej kože diabetického pacienta sa líšili. Bola takisto pozorovaná znížená diverzita mikroorganizmov medzi pacientmi s diabetom a zdravými jedincami. Napriek zníženej diverzite bolo identifikovaných 69 taxonomických jednotiek (OTUs) špecifických pre kožný mikrobióm pacientov s diabetom⁽¹⁷⁾. V staršej štúdií však pozorovali, naopak, vyššiu diverzitu bakteriálnych druhov na koži pacientov s diabetom⁽²⁷⁾. Takto významné rozdiely naznačujú vplyv geografického a environmentálneho prostredia, trvania a štádia progresie ochorenia. Okrem toho hospitalizácia pacienta a zvolená antibiotická liečba môžu zmeniť profil citlivosti, ale aj zastúpenie bakteriálnych patogénov. Niekoľko vedeckých tímov sa snažilo identifikovať jednotlivých pôvodcov komplikácií. Pomocou klasických kultivačných metód a typizácie pomocou testov ABI20 sa podarilo identifikovať bakteriálne druhy v skorých aj neskorých ranách. Pri akútne infikovaných ranách patria medzi bežne izolované patogény predovšetkým *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a β -hemolytické streptokoky *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*. Naproti tomu chronické rany boli častejšie polymikrobiálne so zmesou aeróbných a anaeróbných baktérií. V chronických vredoch boli najčastejšie izolovanými aeróbnymi grampozitívnymi baktériami *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus epidermidis*. Z aeróbných gramnegatívnych baktérií sa vyskytovali predovšetkým *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Hlbšie chronické vredy osídľovali prevažne anaeróbne baktérie *Peptococcus*, *Clostridia*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, pričom najrozšírenejším bakteriálnym patogénom prítomným v infikovaných vredoch bol *Bacteroides fragilis*⁽¹⁸⁾ (**obrázok 1**). Komplexnejší náhľad do zloženia mikrobiómu poskytujú techniky založené na vysokoparalelnom sekvenovaní. Väčšina dostupných štúdií stanovovala zloženie mikrobiálneho spoločenstva pomocou amplikónového sekvenovania 16S rRNA. Wolcott a kolektív (19) zistili masívnu prítomnosť druhov z rodov *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* a *Fingoldia*. Gardner a kol.⁽¹¹⁾ rozdelili diabetické vredy na tri typy v závislosti od dominantných taxónov v ranách, ktorými boli *Staphylococcus*, *Streptococcus* alebo zmes anaeróbných baktérií a proteobaktérií. Podobné výsledky boli zistené v neskoršej štúdií, kde v dvoch skupinách rán dominoval buď *Staphylococcus*, alebo *Streptococ-*

Obrázok 1. Rozdiel v zložení mikrobiálneho spoločenstva akútneho a chronického diabetického vredu. Upravené podľa Abulrazak a kol.⁽¹⁸⁾



cus a rody *Corynebacterium* a *Fingoldia*⁽²⁰⁾. Tie isté rody boli pozorované vo väčšine rán, zatiaľ čo rody *Serratia* a *Proteus* boli špecifické pre jednotlivcov. V štúdií McDonald a kol.⁽²¹⁾ stanovili vplyv identifikovaných baktérií na hojenie. Nehojace sa rany obsahujú prevažne baktérie zo skupín *Bacteroidales*, *Streptococcaceae* a fakultatívne anaeróby, najmä druhy rodu *Enterobacter*. Naopak, rany, ktoré sa hojili rýchlo, často obsahovali druhy z *Actinomycetales* a *Staphylococcaceae*. Zaujímavé sú aj zmeny v zložení biofilmu v ranách v závislosti od času a liečby. Stanovenie mikrobiómu nových vredov v porovnaní s opakujúcimi sa viedlo k zisteniu, že stafylokok bol bežný pri nových vredoch, ale nie pri chronických ranách⁽²²⁾. Rozdiely vo výsledkoch napovedajú veľkú variabilitu mikrobiómov diabetických vredov, pričom nie je zjavná žiadna typická mikroflóra vyskytujúca sa u všetkých pacientov.

Vplyv interakcie medzi mikroorganizmami na hojenie ulcerácie

Vzhľadom na polymikrobiálnu povahu SDN je vplyv na vývoj rany jednotlivých bakteriálnych druhov závislý od partnerských baktérií. Napríklad patogénne účinky anaeróbov sa zvyšujú v prítomnosti aeróbov, pretože spotrebúvajú kys-

lík, a následná hypoxia v hĺbke tkaniva uľahčuje rast anaeróbov. Takéto symbiotické vzťahy sú definované ako kooperatívna interakcia dvoch alebo viacerých druhov, čo môže viesť k zvýšeniu virulencie vedúcej k oneskoreniu uzdravenia⁽²³⁾. Ďalším príkladom je spoločný výskyt *Pseudomonas aeruginosa* a *S. aureus* ako dvoch najčastejších príčin chronických rán. Ich spoločné infekcie sú virulentnejšie než jednotlivé infekcie a vykazujú aj zvýšenú rezistenciu proti antibiotickej liečbe⁽²⁴⁾. Existujú však aj pozitívne vplyvy interakcií. Príkladom je, že kompetitívna interakcia medzi nepatogénneho komezála *Helcococcus kunzii* prítomného v ranách výrazne znižuje virulenciu *S. aureus* bez priamej modifikácie obrannej odpovede hostiteľa⁽²⁵⁾. Celogenómové sekvenovanie mikrobiómu umožnilo identifikovať nielen taxonomické zloženie, ale aj jednotlivé gény obsiahnuté v genómoch mikroorganizmov. Dôkladnou bioinformatickou analýzou možno filtrovať gény zodpovedné za virulenciu baktérií. Kalan a kolektív⁽¹⁴⁾ použitím tejto metódy potvrdili častý výskyt rezistencie proti antibiotikám v ranách s pomalým hojením. Dokázali tiež identifikovať a celogenómovo sekvenovať kmeň *S. aureus*, ktorý sa vyskytoval v ranách pacientov s pomalým hojením. Tento kmeň obsahoval niekoľko génov zabezpečujúcich rezistenciu proti rôznym antibiotikám. V inej štúdií Sloan a kolektív (26) identifikovali rezistencie proti tetracyklínu a makrolidom v kmeňoch *Streptococcus anginosus* a *Prevotella*. Tetracyklín ani makrolidy nepatria k aktuálne používaným antibiotikám na liečbu diabetickej nohy, no používajú sa v prípade pacientov s alergiou na penicilín. Rezistencia proti antibiotikám však nie je jediným faktorom virulencie asociovaným s komplikovanými infekciami rán. K častým faktorom patrí aj produkcia biofilmov, ktoré zvyšujú odolnosť baktérií proti antibiotikám, komplikujú čistenie rán, prípadne umožňujú anaeróbnym baktériám efektívnejšie rásť. Anotáciou génov v minulosti identifikovali agrABCD operón kódujúci metabolickú dráhu asociovanú s produkciou biofilmu⁽¹⁴⁾.

Záver

Mikrobióm infikovanej diabetickej nohy predstavuje komplikované a komplexné spoločenstvo mikroorganizmov. Mnohé vedecké skupiny sa pokúšali identifikovať konkrétne bakteriálne druhy spôsobujúce komplikácie, no ich výsledky sa často nezhodujú. Najčastejšie sa vyskytujúcimi organizmami sú *S. aureus*, *Streptococcus* alebo *Bacteroides*. Rôznorodosť výstupov nasvedčuje, že pôvodcov infekcií je niekoľko a ich výskyt je závislý od mnohých faktorov. Existuje čoraz viac dôkazov, že pôvod infekcie je polymikrobiálny, pričom vzájomné interakcie môžu priebeh hojenia zhoršovať alebo, naopak, zlepšovať ihibíciou rastu patogénov vplyvom nepatogénnych komezálov. Je preto dôležité smerovať výskum na odhaľovanie týchto interakcií a ich vplyvu na hojenie rán.

Podakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-17-0526.

LITERATÚRA

1. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A. Diabetic foot syndrome: Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes. *World J Orthop.* 2015;6(1):62-76.
2. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med.* 2017;376(24):2367-2375.
3. Monteiro-Soares M, Boyko EJ, Ribeiro J, Ribeiro I, Dinis-Ribeiro M. Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2012;28(7):574-600.
4. Tresierra-Ayala MÁ, García Rojas A. Association between peripheral arterial disease and diabetic foot ulcers in patients with diabetes mellitus type 2. *Medicina Universitaria.* 2017;19(76):123-126.
5. Hazari A, Arun Maiya G. Diabetic Foot Complications: Foot Deformities, Peripheral Vascular Disease, Claudication, Foot Ulcers, and Amputation. *Clinical Biomechanics and its Implications on Diabetic Foot.* Published online 2020:49-58.
6. Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist J, et al. Specific guidelines on wound and wound-bed management. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2008;24(S1):S188-S189.
7. Zubair M, Ahmad J. Potential risk factors and outcomes of infection with multidrug resistance among diabetic patients having ulcers: 7 years study. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(1):414-418.
8. Shi E, Shofler D. Maggot debridement therapy: a systematic review. *Br J Community Nurs.* 2014;Suppl Wound Care:S6-S13.
9. Noor S, Khan RU, Ahmad J. Understanding Diabetic Foot Infection and its Management. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2017;11(2):149-156.
10. Peters EJG, Lipsky BA. Diagnosis and Management of Infection in the Diabetic Foot. *The Foot in Diabetes.* Published online 2020:265-286.
11. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, Segre JA, Grice EA. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes.* 2013;62(3):923-930.
12. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):330-339.
13. Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS, et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol.* 2016;136(5):947-956.
14. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, et al. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host Microbe.* 2019;25(5):641-655.e5.
15. Lavigne J-P, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lipsky BA. New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Adv Wound Care.* 2015;4(1):38-49.
16. Liu C, Ponsoero AJ, Armstrong DG, Lipsky BA, Hurwitz BL. The dynamic wound microbiome. *BMC Med.* 2020;18(1):1-12.
17. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J, et al. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ.* 2017;5:e3543.
18. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications.* 2005;19(3):138-141.
19. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):163-174.
20. Loesche M, Gardner SE, Kalan L, et al. Temporal Stability in Chronic Wound Microbiota Is Associated With Poor Healing. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):237-244.
21. MacDonald A, Brodell JD, Daiss JL, Schwarz EM, Oh I. Evidence of differential microbiomes in healing versus non-healing diabetic foot ulcers prior to and following foot salvage therapy. *Journal of Orthopaedic Research.* 2019;37(7):1596-1603.
22. Smith K, Collier A, Townsend EM, et al. One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiol.* 2016;16:54.
23. Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, et al. An In Vivo Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27317.
24. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One.* 2013;8(2):e56846.
25. Essebe CN, Visvikis O, Fines-Guyon M, et al. Decrease of *Staphylococcus aureus* virulence by *Helicobacterium kunzii* in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2017;7.
26. Sloan TJ, Turton JC, Tyson J, et al. Examining diabetic heel ulcers through an ecological lens: microbial community dynamics associated with healing and infection. *J Med Microbiol.* 2019;68(2):230-240.
27. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, et al. Molecular and culture-based assessment of the microbial diversity of diabetic chronic foot wounds and contralateral skin sites. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2263-2271.

Mgr. Michal Kajsík, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra

e-mail: michal.kajsik@medirexgroupacademy.sk