

Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları[§]

Ş. Barçın ÖZTÜRK, M. Bülent ERTUĞRUL, Esra ÇÖREKLİ

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

ÖZ

Amaç: Yara yatağı bakterilerin üremesi için ideal bir yüzeydir ve mikrobiyal enfeksiyonun yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Bakteriler hemen her türlü yüzeye yapışarak, biyofilm olarak adlandırılan kompleks yapılı topluluklar oluştururlar. Çalışmamızın amacı diyabetik ayak enfeksiyonuna neden olan etkenleri ve biyofilm oluşturma oranlarını saptamaktır.

Gereç ve Yöntem: Enfekte diyabetik ülserlerinden alınan rutin kültür örnekleri, 2013-2015 yılları arasında Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda değerlendirildi. Kültür için örnekler, yumuşak doku debridmanı ve/veya kemik biyopsisi ile toplandı ve standart kültür ve tanımlama yöntemleri kullanılarak etken bakteriler tanımlandı. Biyofilm üretimi kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı.

Bulgular: Toplam 55 hastanın yumuşak ve/veya kemik dokusu örneklerinden 81 etken bakteri izole edildi. En sık izole edilen bakteri *Pseudomonas* spp. (n=16; %19.8) idi. Biyofilm oluşumu 67 izolatta (%82.7) saptandı. Birçok mikroorganizma türünde biyofilm oluşumu görülmele birlikte, özellikle *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* türlerinde daha yaygın olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmalarımız diyabetik ayak enfeksiyonu etkenlerinin biyofilm oluşturmalarını önlemek veya biyofilmli ortadan kaldırmak için tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gereksinimini vurgulaması bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, diyabetik ayak, kronik yara

ABSTRACT

Bacterial Agents in Diabetic Foot Infections and Their Biofilm Formation Rates

Objective: The wound bed is an ideal surface for bacterial growth, and the deleterious effects of microbial infection on wound healing are recognized. Bacteria adhere to almost all types of surfaces, and form complex structures called biofilms. The aim of our study was to determine the bacteria and biofilm formation rates in diabetic foot.

Material and Method: Routine culture samples obtained from infected diabetic ulcers were evaluated in Infection Diseases and Clinical Microbiology laboratory between 2013-2015. We collected specimens for culture by debridement of the soft tissue and / or bone biopsy and effective bacterial agents were identified by using standard culture, and identification methods. The production of biofilm was studied by quantitative microdilution plate method.

Results: We isolated a total of 81 causative bacteria from soft and/or bone tissue samples in 55 patients. The most frequently isolated species was *Pseudomonas* (n=16; 19.8%). Sixty seven (82.7%) of 81 isolates produced biofilm. We found that biofilm was produced by many types of organisms, but it was particularly more common in *Staphylococcus* and *Pseudomonas* species.

Conclusion: We believe that our work is important in that it emphasizes the need to develop therapeutic strategies to eliminate and/or prevent biofilm formation in diabetic foot infection.

Keywords: Biofilm, diabetic foot, chronic wound

GİRİŞ

Ayak ülserleri diabetes mellitusun ciddi komplikasyonlarından olup, hastalarda yaşamları

boyunca %12-25 oranında ayak ülseri gelişme riski vardır⁽¹⁻³⁾. Yara yatağı bakteri çoğalması için ideal bir yüzeydir ve enfeksiyonun yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu

Alındığı tarih: 09.08.2016

Kabul tarihi: 22.03.2017

Yazışma adresi: Ş. Barçın Öztürk, Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

e-posta: barcinoturk@yahoo.com

[§] Bu çalışma Aydın International Symposium of Diabetic Foot (AISDF) (16-18 Ekim 2015, Aydın) sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

gösterilmiştir^(4,5). Bu nedenle, yara enfeksiyonunun gelişmesine katkıda bulunan faktörleri tanımlamak, yara yönetiminde önem taşır⁽⁵⁾.

Bakteriler hemen her yüzeye yapışıp çoğalarak, biyofilm olarak adlandırılan yapısal olarak karmaşık topluluklar oluşturabilirler. Biyofilmdeki bakteriler, kendi oluşturdukları ekstrasellüler matriks ile örtülü çok hücreli agregatlar içinde gelişirler^(6,7). Topluluktaki bakterilerin farklılaşması, maruz kaldıkları koşullara bağlıdır. Biyofilm içinde besin maddeleri, oksijen ya da elektron dengelerindeki değişikliklere yanıt olarak hücrelerin gen ifadeleri değişir^(8,9). Bakteri topluluklarının biyofilm içinde yaşamasının, birçok antibiyotiğe direnç sağlama, konak savunmasından korunma gibi çok sayıda yararı vardır⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Biyofilm, kronik yaralarda veya akut yarada kısmi kalınlık varlığı ile gösterilmiştir^(13,14). Yeni oluşan yaralarda, endojen (konakçı) ve eksojen kaynaklı çeşitli mikroorganizmalar yara yüzeyini kontamine edebilir. Yara yüzeyinin özellikleri, hangi mikroorganizmaların bağlanıp çoğalacağını ve buradaki erken biyofilm bileşenlerini belirlemede yardımcı olur⁽¹⁵⁾. İlginç olarak yaradaki bakteri türünden çok, tür sayısı yara iyileşmesi ile daha çok ilişkilidir. Yara iyileşmesindeki gecikme, dört veya daha fazla bakteri türü varlığında, tür sayısı ile doğru orantılıdır⁽¹⁶⁾. Biyofilm çoğunlukla birden çok tür içeren mikroorganizma topluluklarından oluşur, bu nedenle mikrobiyal virülansın sinerjik etkisi sıklıkla yara komplikasyonları ile sonuçlanır^(17,18).

Diyabetik hastalarda regüle olmayan kan glikozu, birçok bakterinin biyofilm üretimine olanak sağlar. Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının, pseudomonaslar, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ve stafilkokların ekzopolisakarit (EPS) ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde

arttırdığı gösterilmiştir⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Çalışmamızın amacı, diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalarda etken dağılımını ve mikroorganizmaların biyofilm oluşturma oranlarını ortaya koymaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

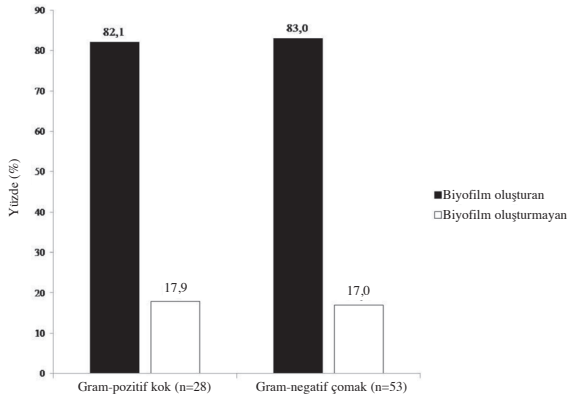
Çalışmada 2013-2015 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen, diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalardan alınan kültür örnekleri değerlendirildi. Kültür için örnekler, yumuşak doku debridmanı ile ve/veya operasyon sırasında kemik dokudan elde edildi. Doku örnekleri %5 koyun kanlı agar (Oxoid) ve McConkey agar (Oxoid) besiyerine ekilerek 37°C'de inkübe edildi. Bakteriler konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımlandı⁽²²⁾.

Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi kullanıldı. Bakteri suşları %0.25 glikoz içeren triptic soy broth (TSB) (Oxoid) sıvı besiyerinde 35.5°C'de bir gece inkübe edildikten sonra, 1/40 oranında %0.25 glikoz içeren TSB sıvı besiyeri ile dilüe edildi. Ardından 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plaklarda her bir kuyucukta 200 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde inoküle edildi. Negatif kontrol kuyucuğu için yalnızca TSB besiyeri kullanıldı. 35.5°C'de 48 saat inkübasyon sonrası kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl %1 kristal viyole eklenerek 15 dakika boyanması için beklendikten sonra içerik boşaltıldı ve iki kez yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viyole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20) ile çözdürüldü⁽²³⁾. 595 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak optik dansitesi ≥ 1 olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edildi⁽²⁴⁾.

BULGULAR

Çalışmamızda 55 hastadan alınan kemik ve yumuşak doku örneklerinden, 81 etken bakteri izole edildi. On hastada (%18.2) polimikrobiyal enfeksiyon saptandı. İzolatların %34.6'sını Gram-pozitif koklar, %65.4'ünü Gram-negatif basiller oluşturmaktadır. Gram pozitif etkenlerin Gram negatif organizmalara oranı 1:1.9 idi. En sık izole edilen tür *Pseudomonas* spp. (n=16; %19.8) idi.

Seksenbir izolattan 67 (%82.7)'si biyofilm oluşturmuştur. İzole edilen türlerin oranı ve üretilen biyofilm yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Gram-pozitif izolatların 23 (%82.1)'ünde ve Gram-negatif izolatların 44 (%83)'ünde biyofilm varlığı gösterildi (Şekil 1).



Şekil 1. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin biyofilm oluşturma oranları.

Tablo 1. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında izole edilen türler ve biyofilm oluşturma oranları.

Mikroorganizma	n (%)*	Biyofilm n (%)**
Gram-pozitif kok	28 (34.5)	23 (82.1)
Koagülaz negatif stafilokok	15 (18.5)	13 (86.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (9.9)	6 (75)
<i>Enterococcus</i> spp.	4 (4.9)	3 (75)
Grup D streptokok	1 (1.2)	1 (100)
Gram-negatif çomak	53 (65.5)	44 (83.0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	16 (19.8)	15 (93.7)
<i>Escherichia coli</i>	14 (17.3)	9 (64.2)
<i>Acinetobacter</i> spp.	10 (12.3)	8 (80)
<i>Klebsiella</i> spp.	5 (6.2)	4 (80)
<i>Proteus</i> spp.	4 (4.9)	4 (100)
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
<i>Serratia</i> spp.	2 (2.5)	2 (100)
Toplam	81*	67 (82.7)**

* Düşey toplama göre; ** Yatay toplama göre

TARTIŞMA

Birçok çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* diyabetik ayak enfeksiyonlarındaki baskın türler olarak bildirilmiştir⁽²⁵⁻²⁷⁾. Çalışmamızda, benzer şekilde *Pseudomonas* spp. en çok izole edilen tür olmuş (n=16; %19.8), bunu koagülaz negatif stafilokoklar (n=15; %18.5) ve *E. coli* (n=14; %17.3) izlemiştir. Sıcak iklime sahip Asya ülkelerindeki çalışmalarla uyumlu olarak, Gram-negatif bakterilerin (özellikle *P. aeruginosa*'nın) Gram-pozitif bakterilere göre daha yaygın olduğunu tespit edilmiştir^(27,28). Diyabetik ayak yaralarında, *Enterobacteriaceae* üyelerinin baskın tür olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir⁽²⁹⁻³¹⁾. Sıcak iklim koşullarına sahip ülkelerde bu durumun, uygun olmayan ayakkabı seçimi, ayakların terlemesi, çorapsız ayakkabı giyilmesi, ayak hijyeninin zayıf olması, dini ritüellerden dolayı ayakların sık sık yıkanması ve yıkandıktan sonra ıslak bırakılması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Hatipoğlu ve ark.⁽³²⁾ Türkiye'deki diyabetik ayak enfeksiyonlarında 20 yıllık mikrobiyolojik profili ortaya koyan çalışmalarında, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri eşit oranda saptamışlardır. Öte yandan aynı yazarların yakın zamanda yaptıkları çok merkezli bir çalışmada⁽³³⁾, çalışmamızla benzer şekilde, Gram-negatif bakterilerin oranı %60 iken, Gram-pozitif bakterilerin oranı %36 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada *S. aureus* izolatlarının oranı da bulgularımıza yakın değerlerde saptanmış olup, Gram-negatif bakterilerde, özellikle de *E. coli*, *Acinetobacter* spp. ve *Proteus* spp. türlerinde artış izlenmiştir.

Acinetobacter türleri, cerrahi alan ve diğer yara enfeksiyonları da dâhil olmak üzere hastane enfeksiyonlarından sorumlu patojenler olarak tanımlanmıştır. Hatipoğlu ve ark.⁽³³⁾ diyabetik ayak enfeksiyonlarında *Acinetobacter* türlerini %2.84 olarak bildirirken, Ramakant ve ark.⁽²⁷⁾

Hindistan'da bu oranı %3.7 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise, *Acinetobacter* spp. oranı daha yüksek (%12.3) olarak saptanmıştır. Benzer şekilde, Gadepalli ve ark.⁽³⁴⁾ *Acinetobacter* spp. oranlarını %9.3, Karmaker ve ark.⁽³⁵⁾ ise %10 olarak bildirmiştir. Bulgularımız hastanemizdeki *Acinetobacter* türlerinin etken olduğu hastane enfeksiyonları ile uyumlu bulunmuştur. Çünkü hastanemizde 2013-2015 yılları arasında hastane kökenli cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında *Acinetobacter* spp. oranı %14.2 olarak saptanmıştır (yayınlanmamış veri).

Çalışmamızda en sık izole edilen ikinci tür koagülaz negatif stafilocoklar (%18.5) idi. Koagülaz negatif stafilocoklar cilt florasyndan kaynaklanan kontaminan bakteriler olarak düşünülse de, tüm örneklerin derin doku örnekleri olması ve sıklıkla ameliyat odası koşullarında alınması nedeniyle ürediklerinde etken olarak kabul edilmişlerdir. Urbancic-Roven ve ark.⁽³⁶⁾, diyabetik ayak enfeksiyonlarında koagülaz negatif stafilocok oranlarını %20.3 olarak bildirmiştir. Akhi ve ark.⁽³⁷⁾ tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada İran Tebriz'de diyabetik ayak enfeksiyonlarında bakteri izolatlarının %17'sinin koagülaz negatif stafilocok olduğu gösterilmiştir.

Kronik yarada bakterilerin varlığı, tek başına biyofilm oluşumunun göstergesi değildir. Bununla birlikte, kronik yaralarda bulunan mikroorganizmaların çoğunun, özellikle de *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* gibi türlerin, yüksek düzeyde biyofilm ürettikleri bilinmektedir⁽⁴¹⁾. Mottola ve ark.⁽⁴²⁾ 48 saatlik inkübasyon sonrası *Pseudomonas* türlerinde güçlü (%85.7) veya orta (%14.3) düzeyde biyofilm oluşumunu göstermişlerdir. *Staphylococcus* türlerinde ise suşların % 84.4'ünün 72 saatin sonunda orta düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Podbielska ve ark.⁽⁴³⁾ diyabetik ayak enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının % 69'unun ve *S. epidermidis* suşlarının %75'inin biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda, biyofilm oluşumunun en fazla olduğu izolatların *Pseudomonas* bakterileri (%93.7) ve koagülaz negatif stafilocoklar (%86.6) olduğu görülmüştür.

Diyabetik ayak ülserlerinden izole edilen bakterilerin araştırıldığı birçok çalışmada biyofilm oluşumu 24 saatte değerlendirilmiştir. Ancak inkübasyon süresinin biyofilm oluşumunu etkilediği, çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir^(42,44). Mottola ve ark.⁽⁴²⁾ stafilocoklar, enterokoklar, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.'de biyofilm oluşumunun inkübasyon süresi ile arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, *Corynebacterium* türlerinde gözlenen orta düzeyde biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyondan sonra artarken, 72 saatin sonunda azalmıştır. Bununla birlikte, *Pseudomonas* türlerinde orta ve yüksek düzeyde biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyondan sonra artmış ve 72 saatin sonunda sabit kalmıştır. Çalışmamızda, biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmalar ışığında, 48 saat sonrasındaki değerlendirmelerin daha uygun olacağı düşüncesindeyiz.

Hasta verilerinin ve özellikle de risk faktörlerinin bulunmamasının bu çalışmanın temel kısıtlılıklarıdır. Buna karşılık, diyabetik ayak ülserlerinde biyofilm varlığını gösteren az sayıda çalışma vardır. Çalışmamız diyabetik ayak enfeksiyonlarında biyofilm oluşum oranlarının çok yüksek olduğunu göstermiştir. Bu konuda daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu açıktır. Kronik yaralardaki biyofilm yönetimi kronik yara tedavisinin en etkili basamağını oluşturur. Çalışmalarımız, diyabetik ayak enfeksiyon etkenlerinin biyofilm oluşturmasını önlemek veya biyofilmi ortadan kaldırmak için terapötik stratejilerin geliştirilmesi gereksinimini vurgulaması bakımından da önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G.** Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005; 366:1725-35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67699-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67699-4)
2. **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. <https://doi.org/10.1002/dmrr.441>
3. **Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA.** Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 2005; 293:217-28. <https://doi.org/10.1001/jama.293.2.217>
4. **Falanga V.** The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32:88-94. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.020>
5. **James GA, Swogger E, Wolcott R, et al.** Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16:37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
6. **Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13:20-6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
7. **Hall-Stoodley L, Stoodley P.** Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11:1034-43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>
8. **Spormann AM.** Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:17-36. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_2
9. **Stewart PS, Franklin MJ.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:199-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
10. **Mah TF, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-9. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
11. **Matz C, Kjelleberg S.** Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 2005; 13:302-7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
12. **Anderson GG, O'Toole GA.** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:85-105. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5
13. **Serralta VW, Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM.** Lifestyles of bacteria in wounds: Presence of biofilms? *Wounds* 2001; 13:29-34.
14. **Bello YM, Falabella AF, Cazzaniga AL, Harrison-Balestra C, Mertz PM.** Are biofilms present in human chronic wounds? "Symposium on Advanced Wound Care and Medical Research Forum on Wound Repair" simpozyumu, Las Vegas, NV, ABD, Nisan 2001.
15. **Percival S, Bowler P.** Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. *World Wide Wounds* 2004, <http://www.worldwidewounds.com/2004/july/Percival/Community-Interactions-Wounds.html> (Erişim tarihi: Mart 2017)
16. **Trengove NJ, Stacey MC, McGeachie DF, Mata S.** Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *J Wound Care* 1996; 5:277-80. <https://doi.org/10.12968/jowc.1996.5.6.277>
17. **Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, et al.** Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16:2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x>
18. **Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL.** Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008; 17:502-8. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.11.31479>
19. **Jefferson KK.** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236:163-73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>
20. **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
21. **Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L.** Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3235-8.
22. **Winn W Jr, Allen SD, Janda W, Koneman E (ed), Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, ABD, 2006.
23. **O'Toole GA, Kolter R.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998; 28:449-61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
24. **Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al.** The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:4538-45. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001>
25. **Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW.** A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:143-9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh513>
26. **Xu L, McLennan SV, Lo L, et al.** Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2007; 30:378-80. <https://doi.org/10.2337/dc06-1383>
27. **Ramakant P, Verma AK, Misra R, et al.** Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia* 2011; 54:58-64. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1893-7>
28. **Raja NS.** Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40:39-44.
29. **Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA.** Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2819-28. <https://doi.org/10.1128/JCM.00551-07>
30. **Louie TJ, Bartlett JG, Tally FP, Gorbach SL.** Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. *Ann Intern Med* 1976; 85:461-3. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-85-4-461>
31. **Murali TS, Kavitha S, Spoorthi J, et al.** Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. *J Med Microbiol* 2014; 63:1377-85. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076034-0>
32. **Hatipoglu M, Mutluoglu M, Uzun G, Karabacak E,**

- Turhan V, Lipsky BA.** The microbiologic profile of diabetic foot infections in Turkey: a 20-year systematic review: diabetic foot infections in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:871-8. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2047-5>
- 33. Hatipoglu M, Mutluoglu M, Turhan V, et al.** Causative pathogens and antibiotic resistance in diabetic foot infections: A prospective multi-center study. *J Diabetes Complications* 2016; 30:910-6. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.02.013>
- 34. Gadepalli R, Dhawan B, Sreenivas V, Kapil A, Ammini AC, Chaudhry R.** A clinicomicrobiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care* 2006; 29:1727-32. <https://doi.org/10.2337/dc06-0116>
- 35. Karmaker M, Sanyal SK, Sultana M, Hossain MA.** Association of bacteria in diabetic and non-diabetic foot infection - An investigation in patients from Bangladesh. *J Infect Public Health* 2016; 9:267-77. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.011>
- 36. Urbancic-Rovan V, Gubina M.** Infection in superficial diabetic foot ulcers. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (Suppl 2):S184-5. <https://doi.org/10.1086/516184>
- 37. Akhi MT, Ghotaslou R, Asgharzadeh M, et al.** Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of diabetic foot infections in Tabriz, Iran. *GMS Hyg Infect Control* 2015; 10:Doc02.
- 38. Banu A, Noorul Hassan MM, Rajkumar J, Srinivasa S.** Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. *Australas Med J* 2015; 8:280-5. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2015.2422>
- 39. Swarna SR, Madhavan R, Gomathi S, Devaraj, Thamaraiselvi S.** A study of biofilm on diabetic foot ulcer. *Int J Res Pharma Biomed Sci* 2012; 3:1809-14.
- 40. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J.** The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab Syndr* 2013; 7:101-7. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.02.006>
- 41. Mottola C, Mendes JJ, Cristiano JM, Cavaco-Silva P, Tavares L, Oliveira M.** Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 2016; 61:35-43. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0401-3>
- 42. De la Rosa-Ramos MA, Rodríguez-Cruz M, López-Villegas EO, Castro-Escarpullí G, Guerra-Infante FM.** Conditions that induce biofilm production by *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Pathol* 2015; 44:366-9. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1059923>
- 43. Davis SC, Martinez L, Kirsner R.** The diabetic foot: the importance of biofilms and wound bed preparation. *Curr Diab Rep* 2006; 6:439-45. <https://doi.org/10.1007/s11892-006-0076-x>
- 44. Podbielska A, Galkowska H, Stelmach E, Mlynarczyk G, Olszewski WL.** Slime production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58:321-4. <https://doi.org/10.1007/s00005-010-0079-9>