

بررسی لیزر کم توان در درمان زخم مزمن پای دیابتی: ارزیابی کمی میکروبیولوژیک

خلاصه

زمینه و هدف: دیابت ملیتوس یکی از بیماری‌های شایع در جهان و ایران می باشد. زخم پای دیابتی نیز یکی از عوارض شایع و ناتوان کننده بیماران مبتلا به دیابت به شمار می رود که روند ترمیم آن با تأخیر همراه بوده و می تواند به قطع عضو بیانجامد. روش های مختلفی برای تسریع بهبودی زخم مزمن پای دیابتی از جمله استفاده از تحریک زیست نوری یا لیزرهای کم توان معرفی شده است. با این حال هنوز مشخص نیست که بار میکروبی زخم (به عنوان یک عامل پیش آگهی ترمیم زخم) تحت تأثیر لیزر کم توان، چه تغییری خواهد داشت. هدف از انجام این فاز مطالعه، بررسی پایایی روش بررسی بار میکروبی و تأثیر اولیه درمان بر روی آن می باشد.

روش بررسی: بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی با شدت و گتر ۱ الی ۳ وارد مطالعه شدند. پس از ارائه رضایت نامه، بیماران تحت درمان دبریدمان جراحی استاندارد، درمان آنتی بیوتیکی و حذف فشار قرار گرفتند. بیماران به طور تصادفی به دو گروه لیزر و دارونما تقسیم شده و لیزر درمانی با طول موج ۶۷۰ نانومتر با دوز 10 J/cm^2 انجام شد. بار میکروبی به روش جمع آوری مایع زخم پس از دبریدمان انجام گرفت. به منظور تعیین پایایی این روش از هر زخم سه نمونه مجزا جمع آوری شد و ICC (Intraclass Correlation Coefficient) محاسبه گردید.

یافته ها: در مجموع ۱۰ بیمار در دو گروه لیزر (۵ مورد) و دارونما (۵ مورد) تحت بررسی قرار گرفتند. متوسط سنی بیماران $53/5 \pm 12/4$ سال (دامنه ۳۳ تا ۷۳ سال) بود. ICC منفرد محاسبه شده برای ۳۲ جلسه اندازه گیری از بیماران (هر جلسه ۳ نمونه از هر زخم مشخص از ۳ نقطه مجزا یا یک نقطه برای زخم های کوچک) برابر ۰/۷ و ICC متوسط برابر با ۰/۸۷۳ بود. بار میکروبی در بدو ورود به مطالعه و یک هفته پس از شروع مطالعه به لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشتند. ($p > 0/05$).

نتیجه گیری: انجام فاز اولیه مطالعه نشان داد که استفاده از روش جمع آوری مایع زخم، روشی پایا و تکرارپذیر برای تعیین بار میکروبی به شمار می رود. تأثیر لیزر یا درمان بر روی بار میکروبی و یا سرعت ترمیم پذیری زخم نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

واژه های کلیدی: زخم پای دیابتی، بار میکروبی، مایع زخم پس از دبریدمان، لیزر کم توان

نسیم کاشف^۱

ابوالفضل شجاعی فر^۲

غلامرضا اسماعیلی جاوید^۳

محمد رضا مهاجری^۴

راضیه رضایی^۵

ملیحه سلامی^۶

مریم قدسی^۴

محسن فاتح^۷

^۱ استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی،

پردیس علوم، دانشگاه تهران

^۲ دانشیار گروه جراحی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران

^۳ عضو هیات علمی گروه تحریک زیستی-نوری، مرکز

تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم

پزشکی تهران

^۴ مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان شریعتی،

دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵ بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس

علوم، دانشگاه تهران

^۶ کارشناس مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد

دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

^۷ عضو هیات علمی گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز

تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم

پزشکی تهران

نویسنده مسئول: دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید، مرکز تحقیقات لیزر

پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، خیابان انقلاب،

خیابان ابوورحان، پلاک ۶۵ طبقه سوم، تلفن: ۶۶۴۰۲۰۲۰

پست الکترونیکی: esdjavid@tums.ac.ir

مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از بیماری‌های شایع در جهان و ایران می باشد. بر اساس گزارش انجمن دیابت آمریکا، تا سال ۲۰۲۵ مبتلایان به دیابت در حدود ۳۲۴ میلیون نفر برآورده شده است [۱]. شیوع دیابت در ایران با توجه به مناطق جغرافیایی مختلف بین ۳ تا ۱۷ درصد متغیر است [۲-۳]. از عوارض مهم دیابت، عوارض پای دیابتی و مشکلات مرتبط با آن است. بررسی ها حاکی از آن است ۶۰-۷۰ درصد بیماران مبتلا به دیابت به نوروپاتی محیطی و فقدان حس در پا دچار می شوند [۴] و حداکثر ۲۵٪ آنها زخم مزمن پای دیابتی تجربه

خواهد شد [۵]. بیش از نیمی از بیماران مبتلا به زخم مزمن پای دیابتی به علت عفونت نیاز به بستری در بیمارستان دارند و از هر ۵ بیمار بستری یک نفر نیاز به قطع اندام پیدا می کند [۶]. در حال حاضر در هر ۳۰ ثانیه یک بیمار مبتلا به دیابت به علت مشکلات زخم پای دیابتی، تحت آمپوتاسیون قرار می گیرند [۷]. مطالعات موجود در کشور نشان داده است که میزان آمپوتاسیون در بیماران دیابتی بستری به علت زخم پای دیابتی، در حدود ۳۰٪ می باشد [۸]. قطع اندام در بیماران دیابتی یک عامل خطر بسیار مهم در کاهش کیفیت زندگی و

افزایش مرگ و میر آنها به شمار می رود [۹۵]. بنابراین پیشگیری از آمپوتاسیون و روشهای تشخیصی و درمانی موثر در کاهش بروز آمپوتاسیون بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

عوامل موضعی مهمی در میزان بهبودی زخم پای دیابتی نقش دارند که می توان به عوامل زمینه ای بیمار، فشار بر روی زخم، خونرسانی نامناسب زخم و عفونت زخم اشاره کرد [۱۱-۱۰]. عفونت زخم در زخم پای دیابتی یک عامل بسیار مهم در تأخیر ترمیم زخم و آمپوتاسیون به شمار می رود [۱۴-۱۲]. علیرغم این که جهت بهبود روند ترمیم در زخم های مزمن باید عفونت تحت درمان قرار گیرد، امری پذیرفته شده است، با این حال هنوز تعریف درستی از عفونت صورت نگرفته است و در بسیاری از موارد پزشکان در مورد درمان آنتی بیوتیکی بیماران تردید دارند [۱۵]. در یک مطالعه نشان داده شده است که درمان آنتی بیوتیکی در بیماران که عفونت فعال بالینی در زخم ندارند مدت بستری شدن در بیمارستان و میزان قطع اندام را کاهش می دهد [۱۵]. از لحاظ تئوریک بار زیاد باکتریایی به تنهایی می تواند با تغییر در محیط زخم، ترمیم آن را به تأخیر بیندازد. اخیراً شواهد بالینی مبنی بر ارتباط بین بار میکروبی زخم با تأخیر ترمیم آن نشان داده شده است [۱۷-۱۶]. با این حال هنوز شواهد موجود در این زمینه محدود بوده و اثربخشی درمانهای موجود بر بار میکروبی هنوز به وضوح نشان داده نشده است.

یکی از مشکلات موجود در بررسی بار میکروبی در این شرایط، عدم وجود یک روش کمی مناسب و متداول برای کشت نمونه زخم است. به طور کلی در آزمایشگاه های بالینی گزارش بار میکروبی زخم مرسوم نبوده و تنها با کشت نمونه گرفته شده با سواب، نوع باکتری تعیین می شود [۱۸]. یکی از روش های مناسب برای تعیین بار میکروبی، گرفتن بیوپسی از بافت زنده، توزین و سنجش میزان باکتری در حجم می باشد [۱۷]. متأسفانه انجام این روش بطور معمول به دلایل مختلف از جمله تهاجمی بودن آن و عدم تکرار آن و در نتیجه پیگیری میکروبیولوژیک بیماران با محدودیت هایی همراه است. یکی از روشهای مطرح در این زمینه اندازه گیری مایع زخم پس از دبریدمان (post-debridement wound fluid) می باشد. به نظر می رسد که این روش بتواند به عنوان یک روش غیرتهاجمی، ارزیابی دقیقتری از بار میکروبی زخمهای مزمن بدست دهد [۱۶]. با این حال برای تعیین پایایی و روایی آن لازم است مطالعات تکمیلی انجام گیرد.

لیزرهای کم توان به عنوان یکی از روشهای مکمل در درمان زخمهای مزمن از جمله زخم مزمن پای دیابتی استفاده شده است [۲۲-۱۹]. لیزرهای کم توان با مکانیسم تحریک زیستی به روندهای ترمیم کمک می کند با این حال هنوز مشخص نیست که پرتوی لیزرهای کم توان چه تاثیر بر بار

میکروبی زخم و رشد میکروارگانیسم در شرایط بالینی خواهد داشت. در یک کارآزمایی بالینی سعی شده است که تاثیر لیزر کم توان با طول موج قرمز را بر رشد باکتری زخمها مورد بررسی قرار گیرد. با این حال لازم است ابزارهای سنجش در این طرح از نظر دقت مورد بررسی قرار گیرند. هدف اصلی مطالعه حاضر، بررسی پایایی ارزیابی بار میکروبی به روش سنجش مایع زخم پس از دبریدمان و نتایج اولیه لیزر بر بار میکروبی می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر، گزارش مقدماتی ارزیابی کمی میکروبیولوژیک به عنوان بخشی از یک کارآزمایی بالینی در حال اجرا می باشد که در آن به بررسی اثر تابش لیزر کم توان بر بار میکروبی زخم های مزمن و ترمیم زخم می پردازد. در این مطالعه بیماران مراجعه کننده به کلینیک زخم مزمن مرکز لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی طی سال ۱۳۸۸ که منطبق با معیارهای ورود و خروج بودند انتخاب شدند. بیماران مبتلا به دیابت بالای ۱۸ سال با زخم مزمن پای دیابتی (بیش از ۱۲ هفته) وارد مطالعه شدند (معیار ورود). وجود زخم با عفونت فعال نیاز به دریافت آنتی بیوتیک وریدی و یا بستری در بیمارستان و یا گانگرن نیازمند آمپوتاسیون، شواهد بالینی ایسکمی، شرکت در طرح های تحقیقاتی درمانی درمان زخم پای دیابتی طی ۳ ماه گذشته و عدم همکاری بیمار با تیم تحقیقاتی برای مراجعات بعدی و پیگیری از معیارهای خروج در این مطالعه به شمار می رفتند. از تمامی بیماران پرسشنامه رضایت از ورود به مطالعه اخذ گردید.

پس از انتخاب، بیماران، مجدداً توسط یک پزشک بررسی شده و اطلاعات بالینی مورد نیاز شامل سابقه بیماری دیابت، وجود عوارض دیابت (رتینوپاتی، نوروپاتی، نفروپاتی و ...) و اطلاعات مربوط به زخم و درجه بندی آنها ثبت شد. برای کلیه بیماران درمان استاندارد شامل دبریدمان و شستشوی زخم، حذف فشار (off-loading) و درمان با آنتی بیوتیک خوراکی انجام شد. کلیه بیماران تحت درمان خوراکی سیپروفلوکساسین (۵۰۰ mg روزانه) و کلیندامایسین (۴۵۰ mg - ۳۰۰ روزانه) بودند. برای تعیین بار میکروبی از روش مایع زخم پس از دبریدمان (post-debridement wound fluid) استفاده شد. پس از دبریدمان و شستشوی زخم با نرمال سالین استریل، با استفاده از یک پنس استریل، یک تکه از کاغذ فیلتر استریل (به مساحت cm^2 ۱)، بر روی زخم قرار داده شد تا با ترشحات زخم اشباع گردد. برای هر زخم بیماران سه نمونه مجزا تهیه شد. سپس لوله ها به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت، لوله ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شده و رقت های سریال از 10^{-1} تا 10^{-4} برای هر نمونه در لوله حاوی نرمال سالین استریل تهیه شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر لوله بر روی پلیت های آگار

جمعه) انجام می گرفت. در گروه دارونما، لیزر خاموش استفاده می شود. به منظور حفظ ایمنی چشمی بیماران و عدم اطلاع بیماران از نوع گروه درمانی به بیماران عینک مخصوص پوشانده می شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. اطلاعات بار میکروبی بر اساس لگاریتم مبنای ۱۰ و با شاخص میانگین و انحراف معیار نشان داده شده است. به منظور ارزیابی تغییرات بار میکروبی طی جلسات درمان در صورت تبعیت از توزیع نرمال از آزمون آماری pair t test استفاده شد. به منظور تعیین پایایی سه نمونه اخذ شده از بیماران از محاسبه Intraclass Correlation Coefficient یا ICC استفاده شد. سطح معنی داری در این مطالعه ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

یافته ها

اطلاعات اولیه ۱۰ بیمار در دو گروه لیزر (۵ مورد) و دارونما (۵ مورد) تحت بررسی قرار گرفت. در جدول شماره ۱ مشخصات اولیه

خوندار ریخته شده و با فیلدوپلاتین استریل کشت داده شد. تمامی پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط هوازی، گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، تعداد کلونی های رشد کرده بر سطح هر پلیت شمارش شد. برای بدست آوردن تعداد واقعی باکتری ها، از فرمول زیر استفاده شد: تعداد کل باکتریها = تعداد کلونی های شمارش شده روی سطح هر پلیت $\times$ عکس رقت تهیه شده $2 \times$ میلی لیتر/۰,۱ میلی لیتر از آنجایی که برای هر زخم ۳ مرتبه نمونه گیری انجام شد، میانگین کلونی های شمارش شده در ۳ پلیت مرتبط با یک رقت، تعداد باکتری های هوازی را نشان می داد. شمارش بار میکروبی در جلسه اول دبریدمان، هفته اول و دوم پس از درمان سنجش شد. لیزر درمانی با استفاده از لیزر طول موج ۶۷۰ نانومتر با توان ۳۰ میلی وات و با دوز 10 J/cm^2 انجام گرفت. در هنگام لیزر درمانی سطح تابش به صورت غیرتماسی یک 1 cm^2 در نظر گرفته می شد. لیزر درمانی به مدت ۶ روز در هفته به مدت دو هفته (به جز روزهای

جدول ۱- مشخصات زخم بیماران و ارگانیزم های جدا شده

سن (سال)	جنس	مدت ابتلاء به دیابت (سال)	مدت ابتلاء به زخم پا (ماه)	درجه زخم (وگنر)	محل زخم	بار میکروبی اولیه (CFU/cm^2)	نوع ارگانیزم جدا شده
بیمار ۱	مرد	۱۲	۱۳	III	Forefoot	۱۱۹۲۰۰۰۰	اشریشیا کلی، کوکسی گرم مثبت
بیمار ۲	مرد	۴	۳۶	IIb	Plantar	۱۴۰۰۰	اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کورینه باکتریوم
بیمار ۳	زن	۱۷	۱۰	IIb	Plantar	۲۰۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کواگولاز منفی
بیمار ۴	مرد	۱۳	۸	IIa	Heel	۱۶۰۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس، کواگولاز منفی
بیمار ۵	مرد	۳۰	۳	IIb	Forefoot	۳۵۲۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس، کورینه باکتریوم
بیمار ۶	مرد	۱۷	۲۴	IIa	Heel	۱۳۲۶۰۰	استافیلوکوکوس کورینه باکتریوم، کواگولاز منفی
بیمار ۷	زن	۳۶	۳	III	Forefoot	۴۶۰۰	استافیلوکوکوس کورینه باکتریوم، کواگولاز منفی
بیمار ۸	مرد	۱۰	۱۲	IIa	Forefoot	۶۱۸۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس، کواگولاز منفی
بیمار ۹	زن	۱۰	۲۴	IIa	Plantar	۲۰۴۰۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس، کورینه باکتریوم
بیمار ۱۰	زن	۱۰	۱۲	IIa	Forefoot	۲۰۰۰	استافیلوکوکوس کورینه باکتریوم، کواگولاز منفی

بحث

هدف از این مطالعه مقدماتی در مرحله اول بررسی کمی بار میکروبی به روش ارزیابی مایع زخم پس از دبریدمان در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی و در مرحله دوم تعیین نقش لیزر درمانی بر میزان بار میکروبی می باشد. بر اساس ICC محاسبه شده از سه نمونه گرفته شده از هر زخم، نشان داده شده است که روش مذکور می تواند به عنوان یک روش تکرارپذیر و پایا به جای نمونه‌گیری بافتی استفاده شود. البته این روش برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ به منظور تعیین بار میکروبی در زخم های مزمن پای دیابتی معرفی شد (۱۶). با توجه به تهاجمی بودن انجام بیوپسی بافتی و تعیین بار میکروبی، محققان به دنبال راهکارهای مناسبی برای تعیین بار میکروبی به روش های غیرتهاجمی می باشند (۱۸). یکی از این روش ها، استفاده از مایع زخم بدنال دبریدمان است. روایی (validity) روش مذکور در مقایسه با بیوپسی بافتی در مطالعات قبلی نشان داده شده است [۱۸]. نتایج این مطالعه نشان داد که روش بررسی مایع زخم نیز یک روش مطمئن در تعیین بار میکروبی بوده و نیازی به انجام روش های تهاجمی یا تکرار آزمایش به منظور افزایش پایایی نتایج وجود ندارد.

بار میکروبی یکی از عوامل مهم در تعیین پیش آگهی بهبود زخم به شمار می رود. مطالعات اولیه نشان داده است که وجود برخی از گونه های باکتری از جمله استافیلوکوکوس اورئوس یا کلونیزاسیون باکتری های هوازی و بی هوازی بیش از 10^6 CFU/mg در بافت زخم های غیرایسکمیک می تواند ترمیم زخم را به تأخیر بیندازد [۲۴-۲۳]. استفاده از دبریدمان جراحی و شستشوی مداوم به همراه درمان های مناسب آنتی بیوتیکی از روش های مؤثر در کاهش بار میکروبی و تسریع روند بهبودی زخم به شمار می رود. در حال حاضر روش های دیگری نیز معرفی شده است که در کنار روش های استاندارد درمان زخم مزمن پای دیابتی به منظور تسریع بهبودی به کارگرفته می شوند. یکی از این روش ها به نظر می رسد تحریک زیست نوری با استفاده از لیزرهای کم توان است [۲۰-۲۱]. لیزرهای کم توان با تحریک تکثیر فیبروبلاست ها، افزایش تولید برخی از پیش سازهای کلاژن و افزایش تولید سیتوکاین های مؤثر در رشد مو جهت افزایش روند بهبود زخم های مزمن می شوند. هر چند مطالعات تجربی نشان داده است که تحریک زیست نوری در محیط های تجربی، تأثیری بر رشد باکتری ها ندارد ولی هنوز این مسأله در شرایط بالینی بررسی نشده است. در این گزارش مقدماتی نشان داده شد که روند درمان استاندارد در هر دو گروه لیزر و دارونما تأثیری بر بار میکروبی نداشته است. نکته جالب این است که انجام دبریدمان و شستشوی زخم به همراه درمان آنتی بیوتیک خوراکی نه تنها بار میکروبی را کاهش نداده است بلکه طی هفته اول پس از شروع درمان، افزایش غیرمعنی داری داشته است که لازم است با پیگیری های طولانی تر این روند بیشتر

بیماران آورده شده است. ۶ نفر از کل بیماران مورد بررسی را مردان تشکیل می دادند. متوسط سنی بیماران $53/5 \pm 13/4$ سال (دامنه ۳۳ تا ۷۳ سال) بود. متوسط سنی بیماران در گروه لیزر $53/4 \pm 8/6$ سال و در گروه دارونما $53/6 \pm 18/2$ سال بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری مشاهده نمی شد ($p=0/9$). درجه زخم افراد مورد بررسی از لحاظ بالینی بر اساس سیستم طبقه بندی وگنر به جز یک مورد IIb به بالا بود.

همان گونه که در روش اجرا ذکر شد تمامی بیماران از بدو ورود به این مطالعه تحت درمان با آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین قرار گرفتند. به جز یک مورد از بیماران که مرحله زخم آن بر حسب وگنر درجه III داشت، بار میکروبی اولیه تمامی بیماران کمتر از 10^4 کلونی بود.

به منظور تعیین میزان پایایی (reliability) نمونه گیری های انجام گرفته، ICC (Intraclass Correlation Coefficient) محاسبه شد. ICC شاخصی است که می تواند میزان پایایی و تکرارپذیری متغیرها را به صورت کمی نشان دهد. در یک زمان معین، ICC شاخصی از هموژنیستی درون گروهی از اندازه گیری های مکرر در ارتباط با تغییرات کلی بین گروه هاست. در جدول شماره ۲، ICC برای اندازه گیری بین دو نمونه آورده شده است. ICC منفرد محاسبه شده برای ۳۲ جلسه اندازه گیری از بیماران (هر جلسه ۳ نمونه از هر زخم مشخص از ۳ نقطه مجزا یا یک نقطه برای زخم های کوچک) برابر ۰/۷ و ICC متوسط برابر با ۰/۸۷۳ بود.

در جدول شماره ۳ بار میکروبی زخم در بدو ورود و هفته اول در دو گروه لیزر و دارونما آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود بار میکروبی در بدو ورود به مطالعه از لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارد. هرچند در هر گروه، افزایشی در بار میکروبی در هفته اول پس از درمان مشاهده می شود ولی از لحاظ آماری معنی دار نیست ($p=0/5$).

جدول ۲- ضریب همبستگی ICC بین سه نمونه گیری انجام شده

متوسط	منفرد	
۰/۸۴۷	۰/۷۳۵	ICC (1, 2)
۰/۷۶۲	۰/۶۱۵	ICC (1,3)
۰/۸۸۸	۰/۷۹۸	ICC (2,3)

جدول ۳- توزیع بار میکروبی در دو گروه مقایسه

p-value	روز ۷ ($\log_{10}$ CFU/cm ²)	روز صفر ($\log_{10}$ CFU/cm ²)	
۰/۵	$3/1 \pm 0/1$	$2/5 \pm 0/8$	گروه لیزر
	$3/4 \pm 0/7$	$2/8 \pm 0/5$	گروه دارونما
	۰/۸	۰/۷	p-value

میکروبی داده می شود مورد سؤال واقع خواهد بود.

مورد بررسی قرار گیرد چرا که مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک در بیمارانی که عفونت واضح ندارند و آنتی بیوتیک ها به منظور کاهش بار

منابع

1. Kahn R. Diabetes technology-now and in the future. *Lancet* 2009; 373(9677): 1741-3.
2. Haghdooost AA, Rezazadeh-Kermani M, Sadghirad B, Baradaran HR. Prevalence of type 2 diabetes in the Islamic Republic of Iran: systematic review and meta-analysis. *East Mediterr Health J* 2009; 15(3): 591-9.
3. Hadaegh F, Bozorgmanesh MR, Ghasemi A, Harati H, Saadat N, Azizi F. High prevalence of undiagnosed diabetes and abnormal glucose tolerance in the Iranian urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *BMC Public Health* 2008; 8:176.
4. Dyck PJ, Davies JL, Wilson DM, Service FJ, Melton LJ 3rd, O'Brien PC. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Diabetes Care* 1999; 22(9): 1479-86.
5. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 2005; 293(2): 217-28.
6. 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.
7. <http://www.diabeticfootonline.com/> 2009.
8. Shojaiefard A, Khorgami Z, Larijani B. Independent risk factors for amputation in diabetic foot. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2008; 28(2): 32-7.
9. Armstrong DG, Wrobel J, Robbins JM. Guest Editorial: are diabetes-related wounds and amputations worse than cancer? *Int Wound J* 2007; 4(4): 286-7.
10. Kalish J, Hamdan A. Management of diabetic foot problems. *J Vasc Surg* 2009; 21. [Epub ahead of print]
11. Armstrong D, Dos Remedios E, Andersen C, Koller A, Roukis TS. Wound care and diabetic foot. *Foot Ankle Spec* 2009; 2(3): 146-50.
12. Nelson SB. Management of diabetic foot infections in an era of increasing microbial resistance. *Curr Infect Dis Rep* 2009; 11(5): 375-82.
13. Lipsky BA, Polis AB, Lantz KC, Norquist JM, Abramson MA. The value of a wound score for diabetic foot infections in predicting treatment outcome: a prospective analysis from the SIDESTEP trial. *Wound Repair Regen* 2009; 17(5): 671-7.
14. Penny HL, Webster N, Sullivan R, Spinazzola J. A multidisciplinary approach to a possible limb-threatening infection. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21(12): 564-7.
15. Edmonds M, Foster A. The use of antibiotics in the diabetic foot. *Am J Surg* 2004; 187: 25S-8S.
16. Xu L, McLennan SV, Lo L, Natfaji A, Bolton T, Liu Y, Twigg SM, Yue DK. Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2007; 30(2): 378-80.
17. Browne AC, Vearncombe M, Sibbald RG. High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neurotrophic ulcers retards wound healing after application of Dermagraft. *Ostomy Wound Manage* 2001; 47(10): 44-9.
18. Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Hillis SL, Park H, Scherubel M. Diagnostic validity of three swab techniques for identifying chronic wound infection. *Wound Repair Regen* 2006; 14(5): 548-57.
19. Minatel DG, Frade MA, França SC, Enwemeka CS. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers Surg Med* 2009; 41(6): 433-41.
20. Saltmarche AE. Low level laser therapy for healing acute and chronic wounds - the extendicare experience. *Int Wound J* 2008; 5(2): 351-60.
21. Sobanko JF, Alster TS. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. *Dermatol Surg* 2008; 34(8): 991-1000.
22. Erdle BJ, Brouxhon S, Kaplan M, Vanbuskirk J, Pentland AP. Effects of continuous-wave (670-nm) red light on wound healing. *Dermatol Surg* 2008; 34(3): 320-5.
23. Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of acute and chronic wounds. *Wounds* 1999; 11: 72-79.
24. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 244-69.