

# Microbiología del pie diabético determinada por estudio de biopsia

Francisco Cabeza-de-Vaca,\* Alejandro Ernesto Macías,\*\*\*\*\* José Antonio Álvarez,\*\*  
Aurora Cuevas,\*\* América Jazmín Ramírez,\*\* Welsy Araceli Ramírez,\* José Sifuentes-Osornio\*\*\*

\* Clínica "Cabeza de Vaca", de León. \*\* Universidad de Guanajuato.  
\*\*\* Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

## Diabetic foot microbiology through biopsy cultures

### ABSTRACT

**Objective.** To determine the microbiology of diabetic foot wounds, through biopsy cultures. **Materials and methods.** Patients with diabetic foot and clinical data of infection were recruited consecutively. Cultures were processed for aerobic organisms after mortar homogenization. For cases with multiple isolates, only the two predominant organisms were identified. The bacterial identification was carried out by biochemical procedures. The sensitivity to antibiotics was made by the disk diffusion method. **Results.** A total of 91 biopsies were studied, 47 from men (52%). There were 102 isolates, 68 being Gram negative bacilli (67%), with predominance of *Escherichia coli* (21%). A total of 28 Gram positive cocci were isolated (28%) and 6 yeasts (6%). Of the 68 Gram negative bacilli, 24 were resistant to ciprofloxacin (35%). A total of 55 Enterobacteriaceae were isolated, of which 4 (7%) produced extended spectrum beta lactamases. There were 8 *Staphylococcus aureus* isolates, 3 of which (38%) were resistant to methicillin. **Conclusions.** In comparison with reports from industrialized countries, we found a higher proportion of Gram negative and resistant organisms.

**Key words.** Diabetes. Diabetic foot. Microbiology.

### INTRODUCCIÓN

Existen múltiples complicaciones agudas o crónicas de la diabetes. Es particularmente común la propensión a infecciones, ulceraciones y necrosis de los pies, que integran el "pie diabético", definido como cualquier lesión isquémica o infecciosa por debajo de la rodilla, que afecta a una persona con diabetes. Incluye entidades diversas como paroni-

### RESUMEN

**Objetivo.** Conocer la microbiología de lesiones de pie diabético, a través de estudios por cultivo de biopsia. **Material y métodos.** Se incluyeron pacientes con pie diabético y datos clínicos de infección, reclutados de manera consecutiva. El proceso microbiológico se efectuó para aerobios luego de homogenizar en mortero. En presencia de flora polimicrobiana, se identificaron los dos gérmenes predominantes. La identificación bacteriana se efectuó por procedimientos bioquímicos. La sensibilidad a los antibióticos se efectuó por difusión en placa. **Resultados.** Se incluyeron 91 biopsias, 47 de varones (52%). Hubo 102 aislamientos, 68 fueron bacilos gramnegativos (67%), con predominio de *Escherichia coli* (21, 21%). Se aislaron 28 cocos grampositivos (28%) y seis levaduras (6%). De los 68 bacilos gramnegativos, 24 fueron resistentes a ciprofloxacino (35%). Se aislaron 55 enterobacterias, de las cuales cuatro (7%) produjeron beta lactamasas de espectro extendido. Hubo ocho cepas de *Staphylococcus aureus*, de los cuales tres (38%) fueron resistentes a meticilina. **Conclusiones.** Observamos que hay una mayor proporción de bacilos gramnegativos y alta tasa de resistencia a antibióticos en relación con los estudios de países industrializados.

**Palabras clave.** Diabetes. Pie diabético. Microbiología.

quias, celulitis, miositis, abscesos, fascitis necrosantes, tendonitis y osteomielitis. Estas lesiones ocurren como consecuencia de una amalgama de factores de riesgo que incluyen la neuropatía motora, sensorial o autonómica, la deformidad osteoartropática y la insuficiencia vascular. Con estas consideraciones, las úlceras pueden clasificarse como predominantemente neuropáticas, isquémicas o infecciosas.<sup>1,2</sup>

Una vez que se pierde la capa protectora de la piel, los tejidos subyacentes se exponen a colonización bacteriana y la herida puede complicarse con infección por diversos patógenos en los que predominan los cocos aerobios grampositivos, como estafilococos y estreptococos beta-hemolíticos en los procesos iniciales; en las úlceras crónicas la microbiota es más compleja e incluye enterococos, enterobacterias, *Pseudomonas spp.* y anaerobios.<sup>3,4</sup>

Por no existir un consenso, existen múltiples esquemas antimicrobianos para manejo del pie diabético. Comúnmente se utiliza clindamicina asociada a alguna quinolona o cefalosporina de tercera generación. Cuando se juzga necesaria la vía parenteral, se opta por clindamicina o metronidazol asociados con alguna cefalosporina de tercera generación o una quinolona, así como esquemas de piperacilina/tazobactam o carbapenémicos.<sup>5-10</sup>

Dada la compleja fisiopatología del pie diabético, su manejo requiere la intervención de un equipo multidisciplinario que incluya al menos al cirujano, el internista, el nutriólogo y el microbiólogo.<sup>11</sup> Es sabido que la tasa de resistencias a antibióticos es elevada en las infecciones comunitarias en México,<sup>12,13</sup> pero se desconoce la microbiología y sensibilidad a los antibióticos en los aislados clínicos del pie diabético de pacientes de nuestro medio sometidos a estudios de cultivo por un estándar reconocido (biopsia de tejido). Estos conocimientos son importantes para poder guiar el manejo empírico inicial de nuestros pacientes, lo que ayudará al manejo integral y salvamento de las extremidades.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo de pacientes con pie diabético y datos clínicos de infección activa. Los pacientes fueron atendidos en la Consulta Externa de la clínica de pie diabético "Cabeza de Vaca" de la ciudad de León, Guanajuato. Se obtuvieron cultivos por biopsia de todos los pacientes que acudieron con pie diabético y signos de infección desde el 22 de mayo del 2007 hasta el 20 de junio del 2008.

La gravedad de las lesiones del pie se estableció por la clasificación de la Universidad de Texas, que considera como profundidad grado 0 a la ausencia de lesión ulcerosa, y como grados I, II y III, la úlcera que afecta piel, tendones y hueso, respectivamente. De acuerdo con la misma clasificación, el estado A corresponde a la ausencia de infección o isquemia, mientras que los estados B, C y D corresponden a la presencia de infección, isquemia o ambas, respectivamente.<sup>14-16</sup>

## Proceso de las muestras para cultivo

La toma de la muestra para cultivo se efectuó por biopsia con pinzas. El transporte al laboratorio se efectuó en contenedores estériles con medio de Amies sin carbón (Venturi Transystem®; Copan, Brescia, Italia.) para su proceso antes de 60 minutos. El proceso microbiológico de los especímenes se efectuó para bacterias aerobias; las biopsias de tejido se procesaron primero en mortero estéril. Se hizo coloración de Gram y siembra semicuantitativa. En presencia de flora polimicrobiana, se identificaron los dos gérmenes predominantes; del resto se efectuó sólo una descripción de las características de las colonias. La identificación bacteriana se efectuó por los procedimientos bioquímicos convencionales, luego de incubación por 18 a 24 h a 35 °C. La sensibilidad a los antibióticos se efectuó por el método de difusión en placa de agar, de acuerdo con los procedimientos de control de calidad del CLSI.<sup>17</sup> Cada nuevo lote de agar de Muller-Hinton se sometió a control de calidad con cepas ATCC *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 y *P. aeruginosa* 28753. La resistencia a meticilina para *S. aureus* se determinó mediante la prueba de disco de oxacilina en agar. La determinación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) para enterobacterias se efectuó por la técnica de doble disco en agar.

## Análisis y cálculo de la muestra mínima

Consideramos que una muestra consecutiva es razonablemente equivalente a una aleatoria pues las tomas se distribuyeron a lo largo de varios meses y no se excluyeron pacientes. Para estimar gérmenes que ocurran en proporciones de hasta 5%, con error absoluto de  $\pm 5\%$ , la muestra mínima calculada fue de 85 pacientes. Los gérmenes aislados se informan en medidas descriptivas de frecuencia con su intervalo de confianza del 95% (IC95%).<sup>18</sup> Para analizar la significancia de diferencias entre medianas para variables continuas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con un  $\alpha$  bilateral de 0.05.

## Aspectos éticos

El presente estudio se encuentra libre de problemas éticos y fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guanajuato. Se efectuó la descripción de cultivos que se solicitan de manera rutinaria por los médicos tratantes, de modo que se dispensó la necesidad de

obtener el consentimiento informado por escrito, aunque se dio información verbal del proceso y características del estudio a todos los pacientes.

## RESULTADOS

Se analizaron 91 biopsias de 91 pacientes. Del total, 47 especímenes fueron de varones (52%) y 44 de mujeres (48%); la edad promedio de los pacientes fue de 64.2 años. Con respecto de la gravedad de las lesiones de acuerdo con la clasificación de la Universidad de Texas, predominaron los pacientes con lesiones severas, dado que 20 tuvieron lesiones de pie diabético en Grado I (22%), 25 en Grado II (27%) y 46 en Grado III (51%).

Se obtuvieron 102 aislados clínicos de las 91 biopsias, pues en 56 de ellas hubo desarrollo monomicrobiano (62%; IC95%, 52 a 72%), mientras que en 23 fue polimicrobiano (25%; IC95%, 16 a 34%); en 10 no hubo desarrollo (11%; IC95%, 5 a 17%) y en 2 hubo datos sugestivos de presencia exclusiva de anaerobios estrictos por la tinción de Gram (2%; IC95%, 0 a 5%). En el cuadro 1 se enlistan los microorganismos aislados y su frecuencia.

No se encontró una diferencia significativa en las proporciones de los tipos de microorganismos aislados al compararlos con el género de los pacientes

( $\chi^2$  2.448, p 0.28). Al comparar las medianas de las edades de los pacientes con respecto al tipo de microorganismo aislado tampoco se tuvo diferencia significativa, (H 3.28, p 0.35). No se encontró diferencia significativa al comparar las medianas de las edades de los pacientes con respecto al grado de lesión (H 1.9, p 0.385). Por otro lado, se encontró diferencia significativa al comparar los aislamientos con los grados de profundidad de la clasificación de la Universidad de Texas ( $\chi^2$  21.257, p < 0.001), toda vez que se obtuvo una mayor proporción de bacilos gramnegativos (41/68, 60%) en lesiones grado III. El 100% de las levaduras aisladas (6/6) se obtuvieron de lesiones grado III y la mayor proporción de cocos grampositivos (23/28, 82%) se aisló de lesiones grado I y II.

Del total de aislados clínicos, 68 fueron bacilos gramnegativos (67%; IC95%, 58 a 76%), 28 cocos grampositivos (27%; IC95%, 19 a 36%) y 6 levaduras (6%; IC95%, 1 a 10%). De los 68 bacilos gramnegativos, 1 *Acinetobacter spp.* y 1 *Pseudomonas spp.* fueron resistentes a imipenem (3%; IC95%, 0 a 7%). Se obtuvieron 24 bacilos gramnegativos resistentes a ciprofloxacino (35%; IC95%, 24 a 47%).

Se aislaron 55 enterobacterias, de las cuales cuatro (7%; IC95%, 0 a 14%) fueron productoras de BLEE. Se aislaron 21 cepas de *E. coli*, de las cuales

**Cuadro 1.** Microorganismos aislados en 91 biopsias de tejido de pie diabético.

Gérmenes aislados	Número	Intervalo de confianza del 95% (%)
<i>Escherichia coli</i>	21	13 a 29
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0 a 6
<i>E. agglomerans</i>	6	1 a 11
<i>E. cloacae</i>	1	0 a 3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0 a 6
<i>K. ozaenae</i>	1	0 a 3
<i>K. pneumoniae</i>	3	0 a 6
<i>Proteus mirabilis</i>	8	2 a 13
<i>P. penneri</i>	3	0 a 6
<i>P. vulgaris</i>	6	1 a 11
<i>Acinetobacter spp</i>	4	0 a 9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	3 a 14
<i>Enterococcus spp</i>	11	5 a 17
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3 a 13
<i>S. coagulasa negativa</i>	4	0 a 8
<i>Streptococcus</i> Beta-hemolítico, Grupo A	1	0 a 3
<i>Streptococcus</i> Beta-hemolítico, Grupo B	2	0 a 5
<i>S. milleri</i>	1	0 a 3
<i>Streptococcus sp</i>	1	0 a 8
<i>Candida albicans</i>	4	0 a 8
<i>C. no albicans</i>	2	0 a 5
Total	102	-

18 mostraron resistencia a ampicilina (86%), 15 a ciprofloxacino (71%) y 13 a trimetoprim-sulfametoxazol (62%). De 28 cocos grampositivos, 8 fueron *S. aureus*; de ellos, 3 (38%; IC95%), 4 (71%) resultaron resistentes a meticilina.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra la descripción microbiológica de 91 biopsias de pacientes de una clínica mexicana especializada en la atención del pie diabético, y representa una de las mayores colecciones de cultivos por biopsia en pie diabético.<sup>19</sup>

Encontramos una proporción elevada de bacilos gramnegativos (67%), que difiere de lo informado en revisiones de microbiología en pie diabético, donde *S. aureus* es el aislamiento prevalente, seguido de *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp.* y bacterias coliformes.<sup>4</sup> Esto puede representar la mayor cronicidad de nuestros pacientes, toda vez que las lesiones agudas se colonizan e infectan inicialmente por grampositivos.<sup>3-5</sup> En países en desarrollo, los pacientes suelen retardar demasiado su atención; en nuestro trabajo hubo una alta proporción de úlceras en grado III y observamos una asociación importante de bacilos gramnegativos y levaduras con este grado de lesión; además observamos que la flora de cocos grampositivos se asoció principalmente con las lesiones grados I y II, lo que parece confirmar este concepto. No encontramos una asociación entre las edades y los géneros de los pacientes con algún tipo de microorganismo o con el grado de profundidad de la lesión. Nuestros resultados son consistentes con los publicados en una revisión clínica y microbiológica en un hospital de tercer nivel en la India, donde los bacilos gramnegativos fueron los más frecuentes, tanto en biopsias como en hisopados de úlceras de pie diabético. La proporción de enterobacterias productoras de BLEE

(7%) fue menor que la reportada en la India, pero la proporción de SARM (38%) fue semejante.<sup>20</sup> La proporción de enterobacterias aisladas en el presente estudio (56%) es mayor que la observada en un estudio multicéntrico llevado a cabo en los Estados Unidos (32%); además, la proporción observada de *E. coli* en el presente trabajo, es considerablemente mayor (21% contra 4%).<sup>21</sup>

Cuando la tasa de resistencia supera el 30% para un antibiótico, éste resulta una opción pobre para el manejo empírico inicial. La proporción de resistencia a ciprofloxacino observada para el patógeno más común (*E. coli*) fue de 71%, por lo que es una buena opción como tratamiento de las úlceras de pie diabético sólo después de demostrar su actividad *in vitro*, debiendo en su lugar optar por alguna cefalosporina de tercera generación para el manejo empírico inicial, aunque la producción de BLEE por las enterobacterias pudiera limitar su utilidad en el futuro. Cabe mencionar que se obtuvieron 2 cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores resistentes a imipenem. Ya se han informado tasas altas de resistencia en microorganismos aislados de infecciones comunitarias en México.<sup>12,13</sup>

Como centinela de la resistencia a los antibióticos, el cuadro 2 muestra la tasa porcentual de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas de muestras provenientes de úlceras de pie diabético en pacientes de hospitales de países en desarrollo, incluyendo el presente trabajo. Se observa que la resistencia a ciprofloxacino es considerable en estos países; también se observa una resistencia considerable a las cefalosporinas de tercera generación y a los aminoglucósidos. Con respecto a imipenem, no se encontraron cepas resistentes en ninguno de los trabajos publicados. Cabe mencionar que nuestro estudio es el único que ha valorado la susceptibilidad a tigeciclina, sin encontrar resistencia a este fármaco.

Debemos reconocer limitaciones de nuestro trabajo. En primer lugar, no se hizo análisis de hospitali-

**Cuadro 2.** Tasa de resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* aisladas del cultivo de úlceras de pie diabético en distintos países en desarrollo.

Autor (referencia)	País	n	Antibiótico(% resistencia)												
			AN	AMC	AM	FEP	CTX	CAZ	CTB	CRO	CIP	GM	IPM	TYG	SXT
Gadepalli R, et al. 2006 (20)	India	22	50	55	ND	ND	55	55	ND	ND	50	ND	0	ND	ND
Bansal E, et al. 2008 (22)	India	26	10	73	100	ND	ND	18	ND	ND	63	70	0	ND	ND
Khosravi AD, et al. 2007 (23)	Pakistán	10	ND	ND	ND	ND	ND	80	ND	80	80	ND	ND	ND	ND
Raja NS. 2007 (24)	Malasia	14	0	21	93	ND	ND	14	ND	14	29	29	0	ND	ND
Presente estudio. 2008	México	21	5	33	86	29	29	29	29	29	71	33	0	0	62

ND: no hay datos. n: número de cepas probadas. AN: amikacina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. AM: ampicilina. FEP: cefepime. CTX: cefotaxima. CAZ: ceftazidima. CTB: ceftibuteno. CRO: ceftriaxona. CIP: ciprofloxacino. GM: Gentamicina. IPM: Imipenem. TYG: tigeciclina. SXT: trimetoprim-sulfametoxazol.

zaciones y tratamientos previos ni duración de los mismos, por lo que no podemos determinar la asociación de las terapias con los perfiles de resistencia a los antimicrobianos. En segundo lugar, no analizamos el impacto que el resultado del estudio tuvo en la toma de decisiones de los médicos o en la evolución de los pacientes. A pesar de estas limitaciones nuestro estudio arroja datos importantes sobre la microbiota del pie diabético en nuestro medio, lo que constituye una aportación importante para el salvamento del pie diabético, tarea compleja que requiere el soporte de mejores evidencias para la toma de decisiones.

En conclusión, presentamos una de las mayores colecciones de la literatura de cultivos por biopsia en pie diabético. Observamos que hay una mayor proporción de gramnegativos y resistencias a antibióticos en relación con los estudios de países industrializados. Puesto que el manejo médico apropiado de la infección es sustancial para el salvamento del pie diabético, este trabajo aporta información importante para los clínicos.

#### REFERENCIAS

1. Caputo GM, Cavanagh PR, Ulbrecht JS, Gibbons GW, et al. Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N Engl J Med* 1994; 331: 854 60.
2. Frykberg RG. Diabetic foot ulcers: current concepts. *J Foot Ankle Surg* 1998; 37: 440 6.
3. Joshi N, Caputo G, Weitekamp M, Karchmer A. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 1906 12.
4. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 244 69.
5. Aragon SFJ, Ortiz RPP. Infección en el pie diabético. En: Martínez de Jesús FR (ed.). Pie diabético. Atención Integral. 2a. Ed. México: McGraw Hill; 2003, p. 143 53.
6. Gilbert DN, Moellering RC, Sande MA. The Sanford guide to antimicrobial therapy. 36th Ed. Antimicrobial Therapy Inc. Hyde Park; 2006.
7. Lipsky BA, Armstrong DG, Citron DM, Tice AD, et al. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): a prospective, randomized, controlled, double blinded, multicentre trial. *Lancet* 2005; 366: 1695 703.
8. Cunha BA. Antibiotic selection for diabetic foot infections: a review. *J Foot Ankle Surg* 2000; 39: 253 7.
9. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment of diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005; 366: 1725 35.
10. Lipsky B. Medical Treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2004; 39: S104 S114.
11. Martínez GD. Cuidados del pie diabético. Un enfoque multidisciplinario. 1st. Ed. España; Arán; 2001.
12. Arreguin V, Cebada M, Simon JI, Bobadilla M, et al. Microbiología de las infecciones urinarias en pacientes ambulatorios. Opciones terapéuticas en tiempos de alta resistencia a los antibióticos. *Rev Invest Clin* 2007; 59: 239 45.
13. Sader HS, Gales AC, Granacher TD, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997 98). *Braz J Infect Dis* 2000; 4: 245 54.
14. Armstrong DG, Lavery LA, Harkless LB. Validation of a diabetic wound classification system. *Diabetes Care* 1998; 21: 855 9.
15. Lavery LA, Armstrong DG, Harkless LB. Classification of diabetic foot wounds. *J Foot Ankle Surg* 1996; 35: 528 31.
16. Pittet D, Wysa B, Herter Clavel C, Kursteiner K, et al. Outcome of diabetic foot infections treated conservatively: a retrospective cohort study with long term follow up. *Arch Intern Med* 1999; 159: 851 6.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth International Supplement. M2-A8*. 2005; 25: 11 58.
18. Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. 1st. Ed. Geneva: World Health Organization; 1991.
19. Senneville E, Melliez H, Beltrand E, Legout L, et al. Culture of percutaneous bone biopsy specimens for diagnosis of diabetic foot osteomyelitis: concordance with ulcer swab cultures. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 57 62.
20. Gadepalli R, Dhawan B, Sreenivas V, Kapil A, et al. A Clinico microbiological study of diabetic foot ulcers in an indian tertiary Care Hospital. *Diabetes Care* 2006; 29: 1727 32.
21. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, et al. Bacteriology of moderate to severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2819 28.
22. Bansal E, Garg A, Bhatia S, Atri AK, Chander J. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. *Indian J Pathol Microbiol* 2008; 51: 204 8.
23. Khosravi AD, Alavi SM, Sarami A, Montazeri EA, et al. Bacteriologic study of diabetic foot ulcer. *Pak J Med Scien* 2007; 23: 681 4.
24. 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.

Reimpresos:

**Dr. Alejandro E. Macías-Hernández**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán,

Vasco de Quiroga 15, Tlalpan

14000, México, D.F.

Fax: 5555133501

Correo electrónico: aaeemmh@yahoo.com

Recibido el 5 de enero de 2009.

Aceptado el 11 de mayo de 2009.