

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNO-MICROBIOLÓGICO DE
INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. EN C. MARIO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

REYNOSA, TAMAULIPAS

AGOSTO 2019

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL INMUNO-MICROBIOLÓGICO DE
INFECCIONES DE PIE DIABÉTICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. EN C. MARIO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

REYNOSA, TAMAULIPAS

AGOSTO 2019

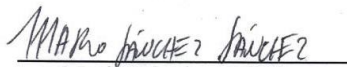


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 24 del mes de Junio del año 2019, el que suscribe Mario Sánchez Sánchez alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B150680, adscrito al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Virgilio Bocanegra García, Dra. Verónica Loera Castañeda y cede los derechos del trabajo titulado "Caracterización del perfil inmuno microbiológico de infecciones de pie diabético.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Mario Sánchez Sánchez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Junio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Caracterización del perfil inmuno microbiológico de infecciones de pie diabético

Presentada por el alumno:

Sánchez
Apellido paterno

Sánchez
Apellido materno

Mario
Nombre(s)

Con registro:

B	1	5	0	6	8	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Directores de tesis


Dr. Virgilio Bocanegra García


Dra. Verónica Loera Castañeda


Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina


Dr. Gildardo Rivera Sánchez


Dr. José Prisco Palma-Nicolás

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
GENOMICA

Sección	página
I. ÍNDICE.....	I
II. AGRADECIMIENTOS.....	III
III. DEDICATORIA.....	IV
IV. LISTA DE CUADROS	V
V. LISTA DE FIGURAS.....	VIII
VI. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XII
VII. ABSTRACT.....	XVIII
VIII. RESUMEN.....	XIX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Pacientes y obtención de las biopsias.....	20
7.1.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	21
7.1.3 Consentimiento informado.....	22
7.2 Obtención de aislados bacterianos a partir de biopsias.....	22
7.2.2 Perfiles de resistencia a antibióticos.....	23
7.2.3 Perfiles de producción de biofilm.....	24
7.2.4 Resistencia inducida a la clindamicina.....	26
7.2.5 Detección de cepas de <i>Staphylococci</i> meticilina resistente.....	26
7.2.6 Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia borde a la oxacilina.....	27

7.2.7 Evaluación del crecimiento de los géneros <i>Staphylococci</i> y <i>Enterococci</i> en agar de vancomicina.....	28
7.2.8 Concentración mínima inhibitoria para vancomicina en <i>S. aureus</i> y <i>Enterococcus spp</i>	29
7.3 Extracción de DNA genómico de cepas gram positivas obtenidas por cultivo de úlceras de pie diabético.....	30
7.3.2 Detección del gen <i>mecA</i>	30
7.3.3 Detección de los genes <i>vanA, B, C</i> y <i>H</i>	31
7.3.4 Detección del gen <i>icaA</i>	33
7.3.5 Detección del gen <i>lukSF</i>	34
7.4 Análisis por MALDI-TOF.....	35
7.5 Inclusión de muestras en parafina.....	35
7.5.2 Técnica de hematoxilina-eosina.....	36
7.5.3 Inmunohistoquímica específica de mediadores celulares.....	37
7.5.4 Inmunohistoquímica específica de linajes celulares.....	40
8. RESULTADOS.....	43
8.2 Pacientes y obtención de biopsias.....	43
8.3 Métodos microbiológicos.....	45
8.4 Métodos moleculares.....	57
8.5 Métodos instrumentales.....	63
8.6 Métodos inmunohistoquímicos.....	64
9. DISCUSIÓN.....	80
10. CONCLUSIONES.....	92
11. RECOMENDACIONES.....	93
12. ANEXOS.....	94
13. REFERENCIAS.....	102

AGRADECIMIENTOS:

Mi agradecimiento más sincero al **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL** y al **CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA** por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de posgrado.

Al **CONACyT**, por la beca otorgada que me permitió obtener este grado académico. A **BEIFI, COFAA y beca mixta CONACyT** por los apoyos económicos otorgados en el transcurso de mis estudios.

A mis directores de tesis, **Dr. Virgilio Bocanegra García** y **Dra. Verónica Loera Castañeda**, por sus consejos y confianza brindada para realizar este trabajo de investigación.

Al Maestro Mario Leyva de la **FMVZ-UAT**; a la Dra. Guadalupe Aguilera Arreola, Dra. María Teresa Valenzuela Vargas y Dra. Julieta Luna Herrera de la **ENCB-IPN**; y al Dr. Rogelio Hernández Pando y Dra. Brenda Marquina del **INCMNSZ** por permitir desarrollar parte de los objetivos de esta tesis doctoral en los laboratorios a su cargo.

A **los grupos de trabajo** de Medicina de Conservación e Interacción Ambiente Microorganismo, por su valiosa ayuda y soporte al momento de realizar los experimentos de laboratorio.

DEDICATORIA:

Esta obra y logro, lo dedico a mi esposa Jimena González Casados y a mi familia, porque son y serán mi sustento emocional y lo más importante para mí, siempre.

Bienaventurado el varón que no anduvo en consejo de malos, Ni estuvo en camino de pecadores, Ni en silla de escarnecedores se ha sentado; Antes en la ley de Jehová está su delicia, Y en su ley medita de día y de noche.

Y será como el árbol plantado junto a arroyos de aguas, Que da su fruto en su tiempo, Y su hoja no cae; Y todo lo que hace, prosperará.

LISTA DE CUADROS:

Cuadro		Página
1	Clasificación de susceptibilidad a antibióticos para bacterias obtenidas de úlceras de pie diabético.....	24
2	Criterios de Stepanović <i>et al.</i> para la determinación de producción de biofilm.....	25
3	Interpretación de halos de inhibición para la prueba de resistencia inducida a la clindamicina.....	26
4	Interpretación de los halos de inhibición de cefoxitina para especies de Staphylococci de acuerdo al CLSI 2018.....	27
5	Interpretación del crecimiento de cepas de Staphylococci y Enterococci en agar de vancomicina.....	28
6	Interpretación de los puntos de corte de vancomicina en base al CLSI 2018.....	29
7	Descripción de citocinas y/o mediadores celulares evaluados mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	38
8	Descripción de linajes celulares evaluados mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	40
9	Datos de los pacientes, resultado microbiológico y características de las úlceras.....	43

10	Descripción del total de bacterias aisladas a partir de úlceras de pie diabético de diciembre de 2011 a diciembre del 2016.....	45
11	Perfil de resistencia a antibióticos de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras del pie diabético.....	47
12	Perfil de resistencia a antibióticos de aislados gram negativos obtenidos por cultivo de úlceras del pie diabético.....	47
13	Origen específico de cada una de las cepas analizadas en este estudio.....	48
14	Asociación estadística entre el tipo de bacteria infectante y tejidos obtenidos.....	49
15	Representación de la producción de “slime” en aislados gram positivos obtenidos de úlceras de pie diabético.....	52
16	Valores de resistencia a antibióticos obtenidos para especies de cocos gram positivos por medio de la técnica de MIC utilizando vancomicina a diferentes concentraciones.....	56
17	Representación de las cepas obtenidas por métodos convencionales y por espectrometría de masas.....	63
18	Clasificación de las muestras de tejido de pie diabético por su viabilidad para la técnica de inmunohistoquímica.....	64
19	Relación de número de biopsias para IHC en comparación con el grado Wagner que presentaron.....	67

20	Resultado del marcaje con anticuerpos utilizados para técnica de inmunohistoquímica en relación al tejido utilizado.....	78
21	Resultado del abordaje y tratamiento de úlceras de pie diabético.....	79
22	Tipo de amputaciones llevadas a cabo por abordaje de úlceras de pie diabético.....	79

LISTA DE FIGURAS:

Figuras		Página
1	Representación clásica de una úlcera de pie diabético.....	2
2	Representación de las cuatro diferentes etapas del proceso de cicatrización de heridas.	5
3	Esquema general de trabajo.....	19
4	Procedimiento para inclusión de biopsias en parafina.....	36
5	Procedimiento para la tinción de tejido por hematoxilina-eosina.....	37
6	Diagrama representativo de los grados Wagner encontrados en biopsias de pie diabético evaluadas.....	44
7	Representación de antibiogramas realizados a aislados obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	48
8	Producción de biofilm en cepas de <i>S. aureus</i>	50
9	Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm en <i>S. aureus</i>	50
10	Producción de biofilm en cepas de CoNS.....	50
11	Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm para CoNS.....	51
12	Producción de biofilm en cepas de <i>Enterococcus</i> spp.....	51

13	Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm en <i>Enterococcus</i> spp.....	52
14	Representación de la producción de “slime” en aislados gram positivos obtenidos de úlceras de pie diabético.....	53
15	Evaluación de cepas gram positivas para la prueba de resistencia a clindamicina.....	54
16	Representación para posible fenotipo BORSA.....	55
17	Medio BHI adicionado con vancomicina.....	56
18	Extracción de DNA genómico de cepas gram positivas obtenidas de úlceras de pie diabético.....	57
19	Visualización para la amplificación del gen <i>mecA</i> (162 pb), a partir de aislados obtenidos por de cultivo de úlceras de pie diabético.	58
20	Visualización para la prueba de detección del gen <i>vanA</i> (1,030 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	59
21	Visualización para la prueba de detección del gen <i>vanA</i> (732 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	59
22	Visualización para la prueba de detección del gen <i>vanB</i> (433 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	60

23	Visualización para la prueba de detección del gen <i>vanC</i> (796 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	60
24	Visualización para la prueba de detección del gen <i>vanH</i> (503 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	61
25	Visualización para la prueba de detección del gen <i>icaA</i> (1,315 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	62
26	Visualización para la prueba de detección del gen <i>lukSF</i> (433 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético.....	62
27	Tinción de hematoxilina-eosina para tejidos con procesos agudos y crónicos de DFUs.....	65
28	Tinción de HE para tejidos con diferentes niveles de infiltrado celular.	65
29	Microfotografía de piel de sujeto sano a 10X (A) y 20X (B).	66
30	Tipo de tejidos que resultaron inviables para la técnica de inmunohistoquímica.....	67
31	Inmunohistoquímica para IL-4.....	68
32	Inmunohistoquímica para la proteína p53.....	69
33	Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-IL1, en tejidos de biopsias de pie diabético, 40X.....	69
34	Inmunohistoquímica para FGF-5.	70

35	Inmunohistoquímica para factor H.....	71
36	Inmunohistoquímica para TGF- β 3.....	71
37	Inmunohistoquímica para interleucina 10.....	72
38	Inmunohistoquímica para la proteína KAI1	72
39	Inmunohistoquímica para MMP-2.....	73
40	Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti IFN- γ , en tejidos de biopsias de pie diabético, 40X.....	73
41	Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti TNF- α	74
42	Inmunohistoquímica para caspasa 3.....	74
43	Inmunohistoquímica para macrófagos.....	75
44	Inmunohistoquímica para marcaje de células plasmáticas.....	76
45	Inmunohistoquímica para linfocitos T CD4 ⁺	76
46	Inmunohistoquímica para linfocitos T CD8 ⁺	77
47	Inmunohistoquímica para linfocitos B.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
%	Por ciento (Porcentaje)
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión cerebro corazón
CD4 ⁺	Clúster of differentiation 4
CD8 ⁺	Clúster of differentiation 8
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio

CoNS	Staphylococcus coagulasa negativo
CRA	Agar rojo Congo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DFIs	Infecciones de pie diabético
DFUs	Úlceras de pie diabético
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EE. UU.	Estados Unidos de América
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>et al.</i>	“y otros”
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FOX	Cefoxitina
h	Hora (horas)
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	Factor de inducción de hipoxia

HRP-DAB	Peroxidasa de rábano picante acoplada a diaminobencidina
I	Intermedio
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
IFN- γ	Interferón gamma
IPN	Instituto Politécnico Nacional
M	Molar
MALDI-TOF	Ionización/desorción láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHCA	Mueller-Hinton con cationes ajustados
MIC	Concentración mínima inhibitoria
mL	Militros
mm	Milímetros

MMP	Metaloproteinasas de matriz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MRCoNS	Staphylococcus coagulasa negativo meticilina resistente
MtP	Titulación en microplaca
<i>n</i>	Número de muestras
nm	Nanómetros
<i>OD</i>	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrógeno
PMN	Células polimorfonucleares
PVL	Panton Valentine-Leucocidin
R	Resistente

S	Sensible
s	Segundo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SSTIs	Infecciones profundas de la piel y tejidos blandos
sp.	Especie
spp.	Subespecie
<i>Taq</i>	Polimerasa termoestable (<i>Thermus aquaticus</i>)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
Tris-HCl	Tri (hidroximetil) aminometano- ácido clorhídrico
TSA	Agar soya tripticaseína
TSB	Caldo soya tripticaseína
U	Unidades internacionales
UV-vis	Ultra violeta-visible
V	Volts
VAS	Agar de vancomicina

VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VRE	<i>Enterococcus</i> vancomicina resistente
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

ABSTRACT

Diabetic foot ulcers (DFUs) are a serious and common problem in patients with diabetes mellitus and one of the major causes of lower-extremity amputation. The microbiological profile of DFUs depends on the acute or chronic character of the wound; however, little known about the immune response in processes with high concentrations of glucose or hypoxia. For this study, diabetic foot biopsies from patients admitted to *Angiología y Cirugía Vascular del Noreste*, in Reynosa, Tamaulipas from December 2011 to April 2016 were analyzed. The samples were processed using standard microbiology techniques. Antimicrobial susceptibility testing was carried out according to the protocol established by the Clinical & Laboratory Standards Institute. Immunoperoxidase assays were performed to establish relative presence of immune system cells and cytokines of the specific wound site. From 277 biopsies, we obtained 364 bacterial isolates; most biopsies samples categorized as Wagner II-B and II-C grades. *Staphylococcus aureus* was the most commonly isolated pathogen followed by *Enterobacter* spp. Based on the results of phenotypic resistance, the least effective antibiotics for gram-positive bacteria were penicillin and dicloxacillin; for gram-negative bacteria, cephalothin and penicillin were the least effective. Levofloxacin, cephalothin and amikacin were the most effective antibiotics for gram-positive and negative bacteria, respectively. *Enterobacter* genus was significantly associated with muscle biopsies ($p < 0.05$) and samples without growth were significantly associated with specimens of pyogenic origin ($p < 0.05$). We also found 15% of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; and 19% and 15.3% of gram-positive strains were positive for biofilm formation by the Microtiter plate assay and Congo red agar. MRSA strains were associated with healing failure and recurrent ulcers ($p < 0.05$). Immunoperoxidase assays shown the high presence of CD4⁺ lymphocytes comparing with CD8⁺ lymphocytes. Additionally, IFN- γ and TNF- α (pro-inflammatory response) identified in most samples comparing with anti-inflammatory agents such as IL-4 or IL-10. In conclusion, the identification of MRSA and Coagulase Negative Staphylococci resistant to β -lactam antibiotics, especially to oxacillin, warrants special attention in the hospitals. The immunohistochemistry revealed a high percentage of cytokines belonging to the T_H1 immune response.

RESUMEN

Las úlceras de pie diabético (DFUs) son un problema grave y frecuente en los pacientes con diabetes mellitus y una de las principales causas de amputación de extremidades inferiores. El perfil microbiológico de los DFUs depende del carácter agudo o crónico de la herida; sin embargo, poco se sabe acerca de la respuesta inmune en procesos con altas concentraciones de glucosa o hipoxia. Para este estudio, se analizaron las biopsias de pie diabético de pacientes ingresados en el hospital de Angiología y Cirugía Vascular del Noreste en Reynosa, Tamaulipas; desde diciembre de 2011 hasta abril de 2016. Las muestras fueron procesadas utilizando técnicas estándar de microbiología. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo establecido por el *Clinical and Laboratory standard Institute* (CLSI, 2018). Se realizaron ensayos de inmunoperoxidasa para cuantificar de manera relativa la presencia de células del sistema inmune y citoquinas del sitio específico de la herida. De 277 biopsias, obtuvimos 364 aislamientos bacterianos; la mayoría de las muestras de biopsias se clasificaron como grados de Wagner II-B y II-C. *Staphylococcus aureus* fue el patógeno más comúnmente aislado seguido por *Enterobacter* spp. Según los resultados de la resistencia fenotípica, los antibióticos menos eficaces para las bacterias gram positivas fueron la penicilina y la dicloxacilina; para las bacterias gram negativas, la cefalotina y la penicilina fueron las menos eficaces. Levofloxacino, cefalotina y amikacina fueron los antibióticos más efectivos para las bacterias gram positivas y negativas, respectivamente. El género *Enterobacter* se asoció significativamente con las biopsias de músculo ($p < 0.05$) y las muestras sin crecimiento se asociaron significativamente con muestras de origen piógeno ($p < 0.05$). También encontramos un 15% de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. Un 19% y 15% de las cepas evaluadas fueron positivas para la formación de biofilm mediante los ensayos de microtitulación en placa y agar rojo Congo, respectivamente. Las cepas de MRSA se asociaron con fracaso en la cicatrización y úlceras recurrentes ($p < 0.05$). Los ensayos de inmunoperoxidasa mostraron la alta presencia de linfocitos CD4⁺ en comparación con los linfocitos CD8⁺. Además, se identificaron IFN- γ y TNF- α (respuesta pro inflamatoria) en la mayoría de las muestras en comparación con agentes antiinflamatorios como IL-4 o IL-10. En conclusión, la identificación de MRSA y

estafilococos coagulasa negativos resistentes a los antibióticos β -lactámicos, especialmente a la oxacilina, merece una atención especial en los hospitales. La inmunohistoquímica reveló un alto porcentaje de citoquinas pertenecientes a la respuesta inmune T_H1 .

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. En el año 2014 se calculó que la prevalencia mundial de la diabetes fue del 9% entre los adultos mayores de 18 años (OMS, 2014). Con base al *National Institute for Health and Clinical Excellence* con sede en Reino Unido, el pie diabético se define como una infección, ulceración y/o destrucción de los tejidos profundos de la piel, relacionados con alteraciones neurológicas y distintos grados de enfermedad vascular periférica en las extremidades inferiores que afecta a pacientes con diabetes mellitus que no ha sido o no está siendo correctamente tratada (NHS, 2003). Además, el pie diabético se considera como una de las complicaciones más importantes e incapacitantes de la diabetes mellitus, con un fuerte impacto en la calidad de vida del paciente (Zimmet *et al.*, 2001). En datos y estimaciones del *International Working Group on Diabetic Foot* con sede en Bélgica (IWGDF) las cifras mundiales de incidencia anual de pie diabético se estiman en alrededor del 2%; para pacientes diabéticos la incidencia de sufrir afecciones (heridas, úlceras, traumatismos) por este padecimiento se encuentra entre el 15 y 25% (van Netten *et al.*, 2016; Lipsky *et al.*, 2016). De este modo, el desarrollo de infecciones de pie diabético (DFIs), es un problema de salud que requiere cuidados adecuados y especiales para los pacientes (Driver *et al.*, 2010).

En lo que respecta a nuestro país, en el año 2015 la *International Diabetes Federation* reportó 11.5 millones de personas con diabetes; ocupando así, México el sexto lugar en el mundo en número de pacientes con diabetes (IDF, 2015). De igual forma, la “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016” reportó un ligero aumento en el diagnóstico de pacientes con diabetes; además de que la presencia de úlceras (9,1%) y amputaciones (5,5%) en pacientes diabéticos aumentó en comparación con la encuesta informada anteriormente en el año 2012 (ENSANUT, 2016). De acuerdo con Ovalle *et al.*, 2019, en México, la prevalencia de complicaciones crónicas es similar a la informada en otras partes del mundo. Encontrando mayor prevalencia de pie diabético y menor prevalencia de enfermedad aterosclerótica y retinopatía diabética.

Así, el pie diabético es un síndrome resultante de múltiples factores sistémicos y ambientales que pueden interactuar para favorecer la aparición, evolución o perpetuación de las lesiones del pie. Tres puntos importantes que predisponen la aparición de pie diabético son: isquemia, neuropatía e infección (Papanas and Maltezos, 2009). En pacientes con pie diabético, la falta de control glicémico y desatención de las extremidades inferiores del cuerpo genera la aparición de úlceras de pie diabético (DFUs). Estas úlceras presentan procesos de cicatrización muy lentos y si no se toman las medidas de desinfección pertinentes con muchas probabilidades de infección bacteriana (figura 1). Finalmente, las úlceras las infectadas se convierten en heridas difíciles de tratar, generando altos costos monetarios en curación y tratamiento. Por ello, el pie diabético representa una de las complicaciones más incapacitantes debido a un mal control de la diabetes mellitus.

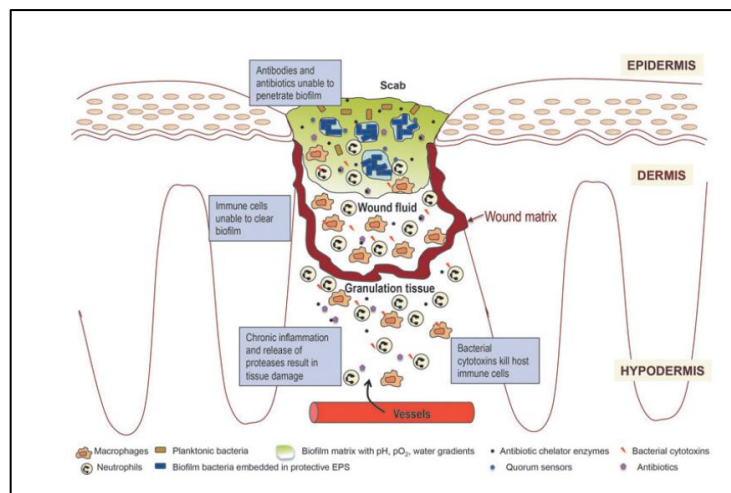


Figura 1. Representación clásica de una úlcera de pie diabético. Se observan las diferentes capas de la piel, y la profundidad de la lesión; así como el sitio donde coinciden la respuesta inmunológica y microorganismos extraños. Figura tomada de *New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers*. Lavigne *et al.*, 2015.

La microbiología de las DFIs es frecuentemente compleja, por ello el análisis microbiológico inicial se vuelve pieza vital para optimizar el tratamiento, tanto el inicial preventivo (a partir de la información epidemiológica acumulada), como el dirigido contra el agente causal una vez que se determina. Los diferentes hallazgos en los análisis microbiológicos de las DFIs pueden deberse a la severidad de la infección, a las variaciones geográficas o al uso de antibióticos (Citrón *et al.*, 2007).

La terapia antibiótica de elección es un paso primordial para combatir la infección y la cicatrización de la herida, el fracaso en la curación podría desencadenar la pérdida parcial de la extremidad. Estas heridas son colonizadas predominantemente por cocos gram positivos y especies de Enterobacterias (Jneid *et al.*, 2018). Sin embargo, la presencia de resistencia extendida a β -lactámico y glucopéptidos como vancomicina ha permitido la propagación de subpoblaciones con escasas opciones terapéuticas.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ha sido reconocido como un importante patógeno de las infecciones adquiridas en el hospital (Kwon *et al.*, 2018; Viquez *et al.*, 2018; Saseedharan *et al.*, 2018). Antibióticos β -lactámicos, cefalosporinas y/o macrólidos se prescriben como tratamiento inicial para infecciones por *S. aureus*; sin embargo, la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos como el caso del *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) supone el uso de antibióticos más eficaces y nuevos esquemas de tratamiento. Durante las últimas 2 décadas, las cepas de MRSA se han convertido en cepas endémicas en los hospitales de todo el mundo elevando así las tasas de resistencia a antibióticos de primera línea y por consiguiente aumentando los costos de tratamiento y cuidados para el paciente (Uçkay *et al.*, 2015). Desde el punto de vista de investigación estos fenotipos son importantes porque, permiten establecer pautas para el control de brotes de resistencia, así, establecer procedimientos de farmacovigilancia y ejecutar acciones precisas para la reducción de consecuencias fatales (amputación, bacteriemia).

Por ello, el MRSA es un patógeno de gran importancia que causa infecciones severas nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad, la presencia del gen *mecA* le confiere a este la resistencia a la mayoría de los antibióticos comunes. Sin embargo, el glicopéptido vancomicina ayuda a combatir las infecciones provocadas por MRSA; no

obstante, desde la década de los 90's se han reportado casos de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA), (Hiramatsu *et al.*, 1997); los cuales por su naturaleza son el reto a superar para la terapia con antibióticos. Para el año 2002 se aisló la primera cepa de VRSA, con una MIC para vancomicina de 1,024 µg/mL, en una paciente de 40 años residente de EE. UU. con diagnóstico de hipertensión, quien había recibido vancomicina previamente para tratar infecciones recurrentes de úlceras en miembros inferiores por MRSA y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), (CDC, 2002). Los aislados con resistencia a vancomicina están asociados a la conjugación de genes de resistencia del tipo *vanA* de *E. faecalis*, que, confiere resistencia a teicoplanina.

El gen *vanA* se puede encontrar tanto en plásmidos y/o cromosoma, originalmente fue localizado en el transposón 1546 (11 kilobases) del operón *van* de *Enterococcus faecium*; asimismo, la secuencia del gen *vanA* encontrada en los aislados de *S. aureus* ha resultado ser idéntica a las ya reportadas para los géneros Enterococci. Además del gen *vanA* se han descrito otros fenotipos diferentes como *vanB* y *vanC* entre los más importantes, el primero de ellos tiene organización y funcionalidad similar a *vanA*, pero difiere en la regulación, confiere resistencia a vancomicina más no a teicoplanina; sin embargo, también puede ser transmitido por conjugación. Por último, el fenotipo *vanC* en cual se ha descrito principalmente en *E. gallinarum* presenta baja resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina. El gen *vanC* es cromosómico, constitutivo y no transmisible (Cetinkaya *et al.*, 2000).

El género *Enterococcus* es predominante en las DFIs, y estos resultan de especial interés, debido a que han generado o presentan una resistencia natural a la vancomicina, diversos estudios alrededor del mundo reportan tasas bajas de prevalencia de resistencia a vancomicina (Al Benwan *et al.*, 2012; Jain and Barman, 2017; Murali *et al.*, 2014). Sin embargo, existen reportes de aislados clínicos de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE). En un estudio reportado por Shahi and Kumar, 2016, en la India, encontró que de 142 aislados obtenidos a partir de DFIs de grados Wagner III-V, 38 cepas resultaron ser multirresistentes a antibióticos, y de estos hubo prevalencia de VRE de 71.4%. Tascini *et al.*, 2011 en Italia, reportó 1,159 aislados de pacientes con DFIs donde *S. aureus* y *E. faecalis* fueron los gram positivos predominantes (40%).

El aislamiento, identificación y caracterización de cepas de los géneros *Enterococci* y *Staphylococci* a partir de muestras clínicas tienen especial interés debido a la capacidad de estos géneros de presentar resistencia a antimicrobianos, en especial a vancomicina. Es necesario guiar esfuerzos de vigilancia epidemiológica, para así conocer acertadamente la prevalencia de VRE, MRSA y VRSA.

Cuando un microorganismo rompe el equilibrio en su microambiente, y pasa de colonizar a producir toxinas e invasión de tejidos, se produce la infección; esta por lo general tiene conexión con la rotura de las capas protectoras de la piel, con lo cual se produce una herida. Así, para la cicatrización de heridas y combate de microorganismos u otros agentes extraños, nuestro sistema inmune tiene una gran cantidad de moléculas y linajes celulares que permiten el restablecimiento de la barrera natural del cuerpo. De acuerdo con Witte and Barbul 1997, existen 4 etapas establecidas que comprenden el proceso de remodelación de heridas (figura 2).

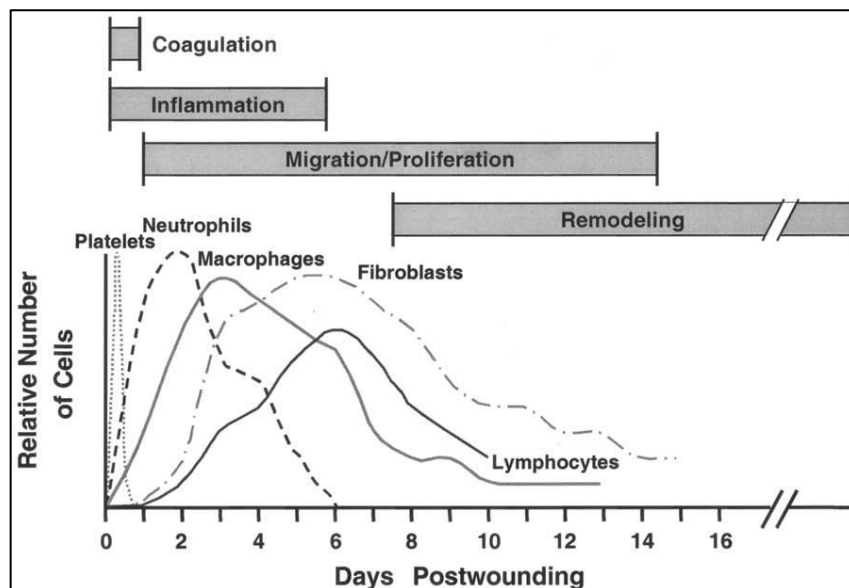


Figura 2. Representación de las cuatro diferentes etapas del proceso de cicatrización de heridas. Figura tomada del artículo *General principles of wound healing* publicado por Witte and Barbul, 1997.

El primero de ellos, el proceso de coagulación el cual comprende desde la aparición de la herida y las primeras horas, donde las plaquetas y factores de coagulación contienen la

hemorragia. Posteriormente en la etapa de inflamación, la primera línea celular en aparecer para contener la infección son los neutrófilos, los cuales tienen como función principal la fagocitosis de agentes extraños. En esta etapa, se realiza la liberación de moléculas activadoras de diversos mecanismos de sistema inmune, como el reclutamiento de macrófagos, y demás células de línea granulocítica.

A continuación, se presenta el proceso de migración y proliferación de diferentes células especializadas del sistema inmune; en esta etapa se presentan macrófagos, fibroblastos y linfocitos T y B. El primero de ellos, el macrófago es el linaje celular más importante ya que coordinan un sin número de actividades encaminadas a favorecer los procesos de cierre de heridas (Caputa *et al.*, 2019). Estudios recientes demuestran la especialización de poblaciones de macrófagos con actividades “pro” y “anti-inflamatorias”, describiendo así, los distintos roles que pueden tomar estos linajes celulares dependiendo del estado de cicatrización de la herida (Krzyszczuk *et al.*, 2018). La serie linfocítica también se ha reportado como promotora de la reparación de heridas, así como de tener un papel importante en la homeostasis celular y en la liberación de citocinas como el factor de crecimiento transformante beta e interferón gamma entre otras moléculas (TGF- β 1, IFN- γ); sin embargo, se ha reportado que, los efectos de esta línea disminuyen en la reparación crónica, teniendo como consecuencia un cierre tardío o deficiente de las heridas en la piel (Xu *et al.*, 2017). La última etapa en el cierre de heridas es la remodelación de la misma, y esta mediada principalmente por fibroblastos y en menor medida por células de soporte como adipocitos y células mesenquimatosas. Los fibroblastos están encargados de la síntesis de colágeno y componentes de la matriz extracelular, que en procesos anormales constituye lo que se denomina fibrosis crónica.

En lo que respecta al combate de microorganismos, el sistema inmune, activa diversos mecanismos de ataque y defensa contra agentes extraños. Las células polimorfonucleares (PMN), los linfocitos T y B, células “natural killer”, así como mediadores celulares tales como: interleucinas (IL-6, IL-12, etc.), interferón (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α), entre otros.

Así células y moléculas secretadas en respuesta a los microorganismos presentes en la infección de pie diabético, otros elementos propios como los agentes pro inflamatorios

juegan un papel clave tanto en el éxito de la cicatrización o en la falla de dicho proceso (Park and Barbul, 2004). La inmunosupresión, como consecuencia del desajuste inmunológico, puede ser un elemento central en la patología del pie diabético. Adicionalmente, se ha observado que la inmunidad celular está deprimida, y en pacientes con altas concentraciones de glucosa, la quimiotaxis de los neutrófilos y macrófagos también están disminuidas, de modo que la migración de las células a los sitios de infección se reduce y la curación es menos efectiva. La presencia de enfermedad arterial periférica, neuropatía o funciones alteradas de los leucocitos pueden reducir la respuesta inflamatoria local, los signos y síntomas clásicos de una infección local. Incluso los signos sistémicos de toxicidad pueden estar disminuidos o presentarse tarde. Debido a esto, los síntomas locales o sistémicos, así como los marcadores biológicos no son del todo confiables para el diagnóstico de infección en pacientes con DFUs. En pacientes con diabetes mellitus y DFUs los principales factores en la respuesta inmune no específica son las células PMN y factores del complemento los cuales se encuentran ligeramente a la baja en dichos pacientes (Richard *et al.*, 2011).

Es así como, se ha observado que la inmunidad celular está deprimida, especialmente en pacientes con altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, muchos de los factores inmunológico reportados han sido medidos de forma general (a partir de suero) pero no en el sitio activo de la infección.

2. ANTECEDENTES

Existen diversos reportes científicos donde se aborda la resistencia a antibióticos de aislados provenientes de cultivos de DFUs, trabajos realizados en diferentes zonas geográficas exponen cada vez, con mayor énfasis los altos índices de resistencia a múltiples antibióticos, la aparición de cepas con características especiales (que las hacen distinguibles de otros fenotipos por las pocas opciones terapéuticas de combate) y el papel de las comorbilidades asociadas a la diabetes en el desarrollo de las DFUs.

Para México, los reportes sobre prevalencia de microorganismos aislados de DFUs es limitado y enfocados al papel que juegan los microorganismos en infecciones moderadas de pie diabético. Tal es el caso de los estudios retrospectivos reportados por Cervantes *et al.*, en 2015 y 2017, llevados a cabo en la Ciudad de México donde se encontró prevalencia de *S. aureus* del 48% y altos índices de presencia de MRSA (34%). Posteriormente reportó que la educación y hábitos para sobrellevar la enfermedad son esenciales para mejorar la calidad de vida del paciente en especial si estos tienen bajos índices de alfabetización.

Hinojosa *et al.*, 2016, también en México, reportó el impacto de la bacteriología de las DFUs en la pérdida de extremidades, encontrando que el crecimiento de especies como *E. coli*, *E. faecium* y *Morganella morganii* estuvieron asociadas a la pérdida de la extremidad en pacientes con pie diabético. Adicionalmente, las infecciones donde se encontró *Proteus mirabilis* mostraron un índice de progreso a la amputación mayor que las bacterias anteriores. Posteriormente, el mismo Hinojosa *et al.*, 2018, reportó datos sobre los beneficios de la revascularización en pacientes con DFUs; encontrando que, un cirugía vascular temprana y criterios apropiados de selección de pacientes podrían aumentar la recuperación de la extremidad.

Estudios alrededor de mundo muestran cifras en aumento del padecimiento de complicaciones en pacientes con pie diabético, especialmente en países de bajo y mediano desarrollo.

Un estudio reportado por Najari *et al.*, 2019 evaluó la bacteriología de DFIs de grados severos en un estudio multicéntrico realizado en Irán, encontrando amplia resistencia de bacterias gram negativas a imipemen, que adicionalmente estuvieron asociadas a pacientes de mayor edad. Además, se reportó presencia de hasta 48% y 37% de MRSA y VRE respectivamente. Mencionan finalmente que, debido a la aparición de resistencia a los antibióticos el cultivo y las pruebas de sensibilidad son esenciales para el manejo correcto de las infecciones por DFIs y la selección de los antibióticos apropiados.

Otro estudio realizado en Grecia, al analizar que variables propician la infección de las úlceras de pie diabético, reportó que pacientes con DFUs exhibieron una correlación positiva entre el total de la carga microbiana con el número de aislados obtenido de cada tejido. Interesantemente, los autores reportaron que no encontraron asociación entre la severidad isquémica o la neuropatía diabética con la carga microbiana (Demetriou *et al.*, 2013).

Arias *et al.*, 2019, reportó el análisis del manejo de pacientes con osteomielitis debido a DFIs en hospitales del Reino Unido, encontrando amplio índice de MRSA y MRCoNS sin resistencia a vancomicina; resultado en 60% de amputaciones menores y un 12 % de amputaciones mayores. A pesar del enfoque multidisciplinario actual, muchos pacientes progresan a la amputación, donde la osteomielitis derivada de DFUs representa una condición clínica desafiante, que requiere un estudio adicional para desarrollar mejores pautas de manejo.

Otro estudio llevado a cabo en Trinidad y Tobago, reportó moderada presencia de bacterias multirresistentes (25%) y baja prevalencia de MRSA (5%) y VRE (1%). En cuanto a la terapia antibiótica, el ciprofloxacino y ceftazidima proporcionaron buena actividad antimicrobiana de amplio espectro contra los patógenos comúnmente aislados. Reportaron además que, cualquiera de los dos agentes puede usarse como terapia empírica contra agentes únicos en pacientes con DFUs con infecciones moderadas o graves en esa área geográfica. Si bien las limitaciones institucionales impidieron el aislamiento de los anaerobios en la mayoría de los casos en este estudio, existen pruebas suficientes para recomendar agentes anti-anaeróbicos como parte de la terapia empírica (Islam *et al.*, 2013).

Un estudio realizado en Brasil y reportado por Perim *et al.*, 2015, informó sobre las frecuencias de los aislamientos bacterianos cultivados a partir de DFUs y evaluó su resistencia y susceptibilidad a los antibióticos de uso común. La localización más común de la ulceración fue en el dedo del pie (54%), seguido de la superficie plantar (27%). En general se encontró baja prevalencia de cepas MRSA y VRSA. Imipenem y gentamicina fueron los antibióticos más eficaces contra las bacterias gram positivas y gram negativas. El estudio confirmó alta prevalencia de patógenos resistentes a múltiples fármacos en las DFUs, por lo que, es necesario evaluar los diferentes microorganismos que infectan la herida y conocer los patrones de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de la herida infectada. Finalmente puntualizaron que, el conocimiento es crucial para planificar el tratamiento con los antibióticos apropiados, reducir los patrones de resistencia y minimizar los costos de atención médica.

Otros mecanismos microbianos que favorecen la invasión e infección de tejidos son la formación de biofilms, la producción de citolisinas e incluso la modificación de los sitios activos de los blancos farmacológicos.

Rahim *et al.*, 2016, en Pakistán reportó presencia de bacterias productoras de biofilm obtenida de DFUs hasta en un 66%, aunque los antibióticos más eficientes fueron la amikacina y la cefepime, las bacterias productoras de biofilm presentaron índices mayores de resistencia a antibióticos en comparación con las bacterias que no produjeron biofilm. Destacaron además que, es necesario un uso prudente de antibióticos para controlar los patógenos productores de biofilms asociados a heridas.

Otro estudio por Johani *et al.*, 2017, reportó la presencia de biofilms en cultivos mono y polimicrobianos obtenidos de DFUs, los cuales no tuvieron correlaciones clínicas que ayudaran a los clínicos a identificar este tipo de mecanismos en las heridas. Debido que la detección de biofilms en muestras provenientes de úlceras aun parece imprecisa, es necesario un cambio en el abordaje de las DFUs y considerar estrategias contra el biofilm presente en este tipo de heridas.

Markakis *et al.*, 2018, mencionó que, el tratamiento de las DFUs, especialmente las heridas profundas, siguen siendo un reto, en parte porque la alteración de la perfusión de la sangre y la presencia de biofilms pueden afectar la eficacia de los antibióticos

sistémicos. Finalmente, aunque hay avances prometedores, el papel de los antibióticos tópicos en el tratamiento de las infecciones del pie diabético es limitado y está fuera de la práctica habitual.

Pobiega *et al.*, 2016, en un estudio realizado en Polonia reportó el potencial de virulencia de cepas de *S. aureus* recuperadas de DFUs, encontrado genes relacionados con la producción de enterotoxinas y elementos genéticos móviles implicados en la transferencia de material genómico a cepas no patogénicas. La mayoría de las cepas evaluadas presentaron el gen *luk* (70%), pero solo el 8% fueron positivas para *mupA* (implicado en la resistencia a mupirocina). Finalmente, ellos destacaron la importancia del manejo clínico apropiado de las infecciones por MRSA en pacientes con DFUs. Para este estudio, la selección de muestras de úlceras antes de la terapia con antibióticos permitió elecciones acertadas con respecto a la selección de agentes antimicrobianos (por ejemplo, octenidina, autorizada para el tratamiento de heridas crónicas) maximizando las posibilidades de una terapia positiva.

Viquez *et al.*, 2018, en un estudio llevado a cabo en Costa Rica, reportó la asociación de varios factores de virulencia de *S. aureus* con el desarrollo de DFIs. Encontrando amplia prevalencia de osteomielitis (70%) y la presencia de los genes *pvl* y *tsst* los cuales son implicados en la invasión de tejidos y desarrollo de necrosis. Adicionalmente, ellos reportaron que, el tiempo de curación fue significativamente mayor en los pacientes infectados con *S. aureus* genotipo *mecA*⁺.

Si bien se han descrito anteriormente el estado actual de la resistencia a antibióticos en cepas aisladas de DFUs, así como informes recientes del repertorio patogénico que estas cepas presentan; a continuación se describen las investigaciones más importantes reportadas que han encaminado a dilucidar el papel del sistema inmunológico en las DFUs; debido a que los reportes de evaluación inmunológica de tejidos procedentes de heridas diabéticas son escasos, hemos añadido reportes de evaluaciones con tejidos procedentes de modelos animales con el fin de establecer cuáles son los avances más significativos encaminados a comprender los procesos inmunológicos de combate antimicrobiano y de cicatrización de heridas.

En los procesos inflamatorios crónicos como la diabetes, la hipoxia es una característica que provoca estreses oxidativo y liberación de radicales libres. Así, en un entorno hipóxico las células regulan de forma ascendente las subunidades HIF- α encargadas de regular las concentraciones de oxígeno intracelular. De acuerdo con Kim *et al.*, 2010, la expresión de KAI1 está mediada por genes que contienen elementos funcionales de respuesta a hipoxia; lo que sugiere que KAI1 es un gen diana de hipoxia y que la hipoxia induce la expresión de KAI1. Bajo este contexto, Cho *et al.*, 2014, evaluó la expresión por IHC y Western blot de KAI1 en tejido de DFUs; encontrado mayor expresión de KAI1 en tejido de pie diabético que su contraparte de pie normal. El estudio sugirió que el tejido cutáneo diabético induce la expresión de KAI1 y apoya el papel de KAI1 en condiciones hipóxicas y estados inflamatorios; sin embargo, los mecanismos exactos son aún desconocidos.

Un estudio reportado por Tănțu *et al.*, 2018, evaluó aspectos epidemiológicos e histopatológicos en pacientes con DFUs. Encontrado que la mayoría de los pacientes evaluados pertenecieron a áreas rurales de difícil acceso a servicios de salud. Adicionalmente, la examinación por la tinción de hematoxilina e IHC demostraron procesos de angiogénesis con baja intensidad y amplias áreas de infiltrado crónico inflamatorio el cual estuvo principalmente formado por macrófagos, linfocitos CD4⁺ y mastocitos.

Otro trabajo, por Yang *et al.*, 2017, informó sobre el efecto de fibronectina y TGF- β 1 en la terapia con presión negativa para pacientes con DFUs. Reportando que, dicha terapia facilitó la expresión de fibronectina y TGF- β 1 en DFUs. El análisis inmunohistoquímico reveló niveles altos TGF- β 1 en el grupo de estudio en comparación al grupo control. Como conclusión se reportó que el TGF- β 1 desempeñó un papel clave en la formación de tejido de granulación y la cicatrización de heridas, y que la terapia de presión negativa en pacientes con DFUs promovió la expresión de dicho factor.

Las células del cordón umbilical también han sido evaluadas como agentes cicatrizantes de DFUs; un reporte de Çil *et al.*, 2016, donde se evaluó por medio de IHC una serie de factores implicados en el proceso de curación de heridas en un modelo experimental de ratón demostró que, la expresión de FGF-1 pudo prevenir la apoptosis por inhibición del

TNF- α lo cual pudo llevar a la cicatrización de los grupos de estudio. Finalmente, también se reportó intensa expresión de otras proteínas como TGF- β , IL-1 y caspasa-3.

Otra investigación reportada por Long *et al.*, 2016, informó sobre el papel del factor de transcripción NRF-2 (regulación de la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes) en la cicatrización de DFUs. La expresión de TGF- β 1 y metalopeptidasa de matriz-9 (MMP-9), que se expresa en queratinocitos y desempeñan funciones cruciales durante las fases de cicatrización de la proliferación y remodelación, se detectó en bajos niveles mediante inmunoblot e IHC. En resumen, los hallazgos definieron una función novedosa para el factor NRF2 en el proceso de curación de heridas diabéticas. Los mecanismos exactos por los cuales NRF2 puede modular la inflamación, el tejido de granulación y las funciones vasculares en las condiciones diabéticas aún deben investigarse en el futuro.

Otro de los estudios que fortalece las evidencias de que los factores VEGF, TGF- β , así como del PDGF tiene un papel destacado en la cicatrización de las DFUs fue el publicado por Zhang *et al.*, 2014, en el cual informó que pacientes con heridas de pie diabético tratados con terapia de ozono tuvieron tasas de curación de heridas más rápidas que el grupo control. Los autores mencionaron que, es importante para la cicatrización de la herida estimular las expresiones de los factores de crecimiento endógeno en el sitio local de la herida. Finalmente, los resultados mostraron que la eficacia del tratamiento con ozono para la curación de las DFUs pudo deberse en parte al aumento de los factores de crecimiento endógeno previamente descritos en las heridas locales.

Aragón and Cabrera, en 2013, reportaron la actividad que desempeña el TNF- α y la IL-6 en la osteomielitis del pie diabético. Informaron un marcaje intenso positivo para neutrófilos y macrófagos, así como para IL-6. La IHC para TNF- α demostró tinción moderada en la membrana de macrófagos en casos de osteomielitis crónica. Además, se mencionó que después de la infección en el hueso, hay una liberación de citoquinas locales por células inflamatorias, incluido el TNF- α y la IL-6. La principal fuente de IL-6 durante la fase aguda fueron los neutrófilos, aunque también se produjo en osteoblastos. En conclusión, la expresión del TNF- α en la fase crónica de estuvo relacionada con la reparación de la destrucción ósea y la IL-6 de los linfocitos y los

fenómenos de reparación del tejido ósea pudieran contribuir al daño en el hueso prolongando la vida útil de los neutrófilos.

En otro estudio se evaluó el papel de los metabolitos producidos por la larva *Lucilia sericata* (mosca verde botella) en el proceso de cicatrización de heridas en ratas diabéticas, que fue el reportado por Tombulturk *et al.*, 2019, donde se informó que, dichos compuestos indujeron un decremento en la expresión de MMP-2, MMP-9 y menores niveles de inflamación; aumentando así, los procesos de reepitelización y cicatrización del tejido. Finalmente, se concluyó que los productos de *L. sericata* pueden mejorar el proceso de curación de heridas modulando las expresiones de MMP-2 y MMP-9.

En base a los reportes previos mencionados se puede concluir que, resulta necesario conocer los patrones de resistencia a antibióticos para establecer esquemas de tratamiento más efectivos para los pacientes. Aunque los antecedentes muestran tasas de resistencia a antibióticos bajas en la región, es un hecho también que, los reportes en otras partes del mundo informan ya sobre la ineficacia de antibióticos de nueva generación para el tratamiento de infecciones de DFUs.

Diversos factores inmunológicos, así como linajes celulares están implicados que en los procesos de cicatrización y reepitelización de heridas. Sin embargo, los antecedentes demuestran que un modelo de úlcera de pie diabético es difícil de evaluar; primeramente, la toma de muestra requiere de personal especializado que genere el mínimo daño al paciente y segunda, refiere a la toma de muestra, que por lo general se obtiene después de un desbridamiento quirúrgico. Debido a esto, obtener un tejido con estereología viable para pruebas de laboratorio pasa a segundo término. Aun así, los modelos experimentales en ratón han desvelado que diversas citocinas tienen un papel preponderante en el cierre de heridas.

3. JUSTIFICACIÓN

Dada la complejidad de las DFIs y la falta de estandarización de protocolos de abordaje para este tipo de padecimiento, resulta necesario establecer pautas para el tratamiento oportuno y eficaz de este tipo de infecciones. Por ello el estudio de las causas y la interrelación de los factores que influyen al desarrollo de las úlceras de pie diabético permitirán acertar la terapéutica en pacientes con dicha enfermedad.

En este proyecto, el análisis microbiológico de tejidos de DFUs mostrará características específicas de los patrones de susceptibilidad a antibióticos en la región y permitirá conocer de manera indirecta la eficacia de los mismos. Adicionalmente, el estado inmunológico de sitio de la herida en pacientes con esta afección, podría sugerir pautas para el manejo adecuado de pacientes con dicha enfermedad. La medición de interleucinas u otro marcador molecular a nivel sistémico (en suero) permite conocer si dicha molécula se encuentra alterada; sin embargo, evaluar la presencia o ausencia de este tipo de factores a nivel físico (en el sitio exacto de la herida) permitirá conocer de manera acertada la cantidad relativa de estos factores tejidos con diferentes grados de evolución de la lesión.

4. HIPÓTESIS

Con base en reportes previos donde se ha correlacionado el daño microvascular con enfermedad arterial periférica y la disminución de actividad fagocítica especializada de macrófagos en ratones con diabetes mellitus; **nosotros, esperamos encontrar una correlación entre la intensidad del marcaje de mediadores de sistema inmune (células y citocinas) y la presencia de los diferentes grados de infección en las úlceras de pie diabético.**

Adicionalmente, por consenso médico que asume que la presencia de infecciones mono bacterianas esta es relacionado en la mayoría de los casos a microorganismos que han superado gracias a su resistencia el efecto de selección marcado por terapias con antimicrobianos. Por ello, esperamos concertar la hipótesis sobre la asociación de **la presencia de ciertos tipos de bacterias o su perfil de resistencia a antibióticos podría estar asociado con altos niveles de expresión de mediadores inmunológicos.**

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

La caracterización microbiológica y molecular de las especies de microorganismos causantes de infecciones en pacientes con pie diabético y la valoración del perfil inmuno-citoquímico del sitio de la infección.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el perfil de resistencia a antibióticos de microorganismos bacterianos aislados de DFIs.
2. Comprobación de la variabilidad e identidad de los patógenos aislados mediante métodos moleculares.
3. Conocer el perfil inmuno-citoquímico del sitio de la infección en comparación con el estatus inmunológico sistémico.
4. Comparar el perfil microbiano contra la respuesta inmune observada.

6. Esquema general de trabajo

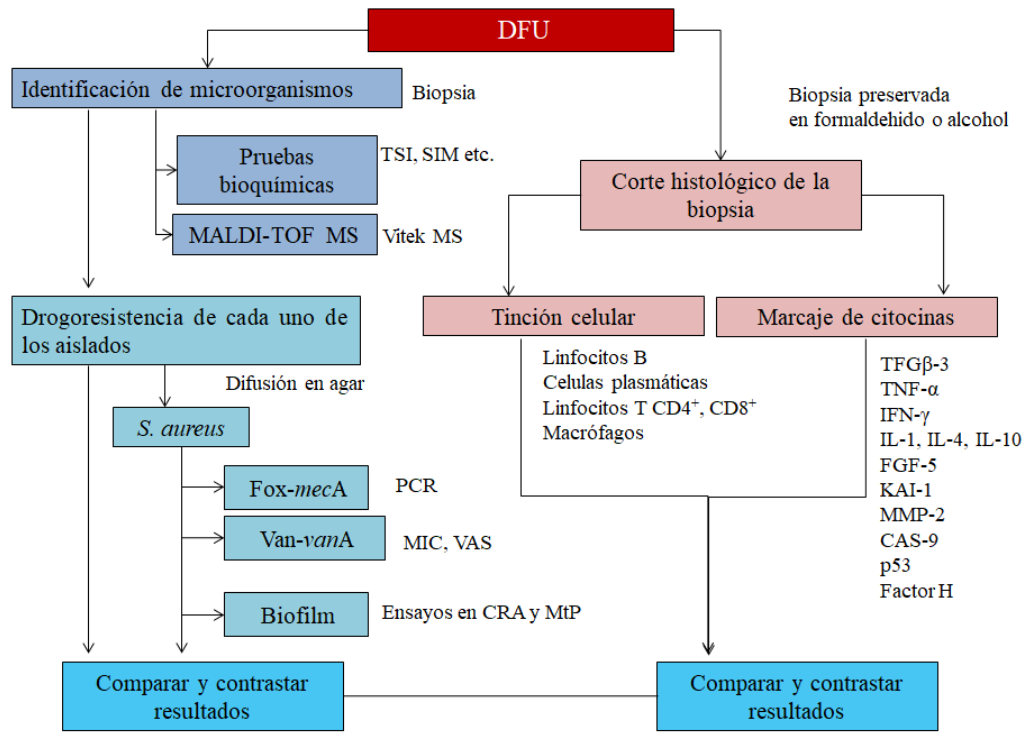


Figura 3. Esquema general de trabajo

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Pacientes y obtención de biopsias

Muestras de tejido procedentes de pacientes con úlcera de pie diabético se obtuvieron mediante cirugía por desbridamiento, en la clínica Angiología y Cirugía Vascular del Noreste con dirección en calle Aguascalientes No. 290, Colonia Rodríguez en Reynosa, Tamaulipas. Posteriormente, dicho tejido fue transportado para su procesamiento al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional con dirección en Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, colonia Narciso Mendoza en Reynosa, Tamaulipas.

- Las muestras de tejido de DFIs se obtuvieron de pacientes mayores de edad, sin importar el tipo de lesión (grados Wagner) en la que está se presentó.
- Las dimensiones de las muestras a analizar fueron a consideración del médico cirujano especialista, dichas muestras fueron transportadas en tubos Vacutainer sin anticoagulante con solución salina.
- Al llegar la muestra de tejido a las instalaciones de laboratorio se etiquetaron con una clave alfa numérica (iniciales del paciente, año, mes y día de recepción), adjunto a la muestra se obtuvo la orden de envío, donde el médico especialista indicó las características de la biopsia, la orden de envío fue resguardada en el Centro de Biotecnología Genómica por el Dr. Virgilio Bocanegra García.
- Las características de las muestras fueron registradas en la bitácora correspondiente para el procesamiento de muestras de pie diabético.
- Utilizando un bisturí estéril la muestra de tejido fue dividida en dos partes, la primera fracción se mantuvo en alcohol absoluto a temperatura ambiente, en tubos de preservación de 2 mL, y el resto (segunda fracción) se mantuvo en tubos Eppendorf con 500 µL de solución salina a -20°C.
- El etiquetado de dichas fracciones descritas en el punto anterior fue utilizando una clave alfanumérica consecutiva más el año en que se obtuvo dicha muestra.

7.1.2 Criterios de inclusión

Se incluyeron muestras de hombres y mujeres mayores de 21 años, con padecimiento de diabetes mellitus tipo 1 o 2, con presencia o evolución de úlcera de pie diabético y en pleno uso de sus capacidades mentales que radicaron en la frontera noreste de Tamaulipas México en un periodo de 2012 a 2016.

- Sujetos que presentaron úlcera de pie diabético por debajo del maléolo indistintamente de grado de severidad de la lesión.
- Muestra única de paciente.
- Se incluyeron muestras indistintamente del pie (derecho o izquierdo).
- Muestras de úlcera de pie diabético que fueron tomadas por los médicos vasculares Dr. Eduardo Bladinieres Cámara y/o Dr. Rodrigo Alcalá Durán en la clínica Angiología y Cirugía Vascular del Noreste.

Criterios de exclusión

Se excluyeron de estudio todas aquellas muestras que presentaron los siguientes criterios:

- Muestras de sujetos que presentaron úlcera debido a traumatismos o accidentes traumáticos.
- Muestras de sujetos que presentaron úlcera debido a tumores óseos.
- Muestras de sujetos que presentaron úlcera debido a síndrome de Charcot.
- Muestras de sujetos que presentaron úlcera de origen varicoso.

Criterios de eliminación

Se excluyeron también del estudio todas aquellas muestras que, aunque presentaron todos los criterios de inclusión, carecieron de datos o información de origen.

- Muestras de sujetos que no cumplieron el etiquetado correcto previamente descrito en el protocolo de investigación de este estudio.
- Muestras de sujetos seriadas (dos o más muestras de un mismo paciente).

- Muestras de sujetos que presentaron disconformidad alguna o que no aceptaron participar en este estudio.

7.1.3 Consentimiento informado

Un consentimiento informado para cada uno de los pacientes incluidos en este estudio fue obtenido de conformidad y acuerdo. Dicho documento fue firmado por el o la paciente con la previa explicación oral de los beneficios y consecuencias que pudieran repercutir en él, al aceptar participar en este estudio. En el anexo 1 se muestra una copia de dicho documento. Los consentimientos informados obtenidos son respaldados por personal del laboratorio de Interacción Ambiente-Microorganismo.

Métodos microbiológicos

7.2 Obtención de aislados bacterianos a partir de biopsias

Con ayuda de una pinza estéril los tejidos procedentes de úlceras de pie diabético fueron inoculados en placas Petri con agar sal-manitol, agar MacConkey y agar sangre (*MCD-LAB, MEX*); a continuación, el tejido restante fue retirado y guardado; las placas se incubaron a 37° C durante 24 h; posterior al crecimiento observado, se llevó a cabo una tinción de Gram y dependiendo del resultado previo de esta, se realizó una identificación bioquímica la cual fue contrastada con las características bioquímicas reportadas en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 2000. Para microorganismos gram negativos se realizó prueba de oxidasa, (*BBL, Becton Dickinson and Company, East Rutherford, NJ, EE. UU.*), agar de sulfuro indol y motilidad (*Conda ESP*), agar urea (*Difco, Sparks, MD, EE. UU.*), agar de hierro triple azúcar, agar citrato de Simmons, agar de hierro-lisina, agar ornitina indol movilidad, medio de rojo de metilo y medio Vogues-Proskauer (*MCD-LAB, MEX*). Para aislamientos gram positivos, se realizaron la prueba de catalasa, coagulasa y agar bilis-esculina (*Difco*). Posterior a la identificación bacteriana cada uno de los aislados se preservó a temperatura ambiente en tubos de 2 mL con agar nutritivo (1mL).

7.2.2 Perfiles de resistencia a antibióticos

Los antibióticos en sensidisco: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefepime (30 µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacino (5 µg) y trimetoprim/sulfametoxazol (1.25/23.75 µg) fueron utilizados conjuntamente para bacterias gram positivas y gram negativas; los antibióticos: amikacina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), netilmicina (30 µg) y nitrofurantoína (300 µg) fueron utilizando solo para evaluar aislados gram negativos y los antibióticos: cefuroxima (30 µg), dicloxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 U), tetraciclina (30 µg), y vancomicina (30 µg) fueron evaluados solo en cepas gram positivas (*Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU. y Becton Dickinson and Company*). Para ello, los aislados fueron recuperados de los cultivos originales de agar sal y manitol, agar MacConkey y agar sangre y se prepararon diluciones para cada uno de ellos a 0.5 en la escala de McFarland; posteriormente con la ayuda de un hisopo estéril y a estría cerrada se inocularon placas de agar Mueller-Hinton; previo secado de la superficie del agar, (10 min.) se procedió a dispensar los sensidiscos (máximo 7 sensidiscos por placa). Por último, las placas se incubaron 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, el diámetro de los halos de inhibición para cada antibiótico fueron determinados usando un micrómetro; dichos valores fueron contrastados con los puntos de corte (cuadro 1), reportados en el documento M100 del manual de resistencia a antibióticos del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2018). Finalmente, las cepas fueron clasificadas como resistentes, intermedias o susceptibles a determinado antibiótico. Las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 y *E. coli* ATCC 25922 se utilizaron con fines de control de calidad.

Cuadro 1. Clasificación de susceptibilidad a antibióticos para bacterias obtenidas de úlceras de pie diabético

Antibiótico	Contenido	Especies	Diámetro de inhibición (mm)		
			R	I	S
Ampicilina	10 µg	Enterobacteriaceae	≤ 13	14 - 16	≥ 16
		<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 23	-	≥ 29
		<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 13	-	≥ 17
		<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	≥ 24
† Cefalotina	30 µg		≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefepime	30 µg		≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefotaxima	30 µg		≤ 14	15 - 22	≥ 23
Gentamicina	10 µg		≤ 12	13 - 14	≥ 15
Levofloxacino	5 µg		≤ 13	14 - 16	≥ 17
Trimetoprim-sulfametoxazol	25 µg		≤ 10	11 - 15	≥ 16
<i>Amikacina</i>	30 µg		≤ 14	15 - 16	≥ 17
<i>Ceftriaxona</i>	30 µg		≤ 13	14 - 20	≥ 21
<i>Cloranfenicol</i>	30 µg		≤ 12	13 - 17	≥ 18
<i>Netilmicina</i>	30 µg		≤ 12	13 - 14	≥ 15
<i>Nitrofurantoína</i>	300 µg		≤ 14	15 - 16	≥ 17
*Cefuroxima	30 µg		≤ 14	15 - 22	≥ 23
*Dicloxacilina	1 µg	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 10	11 - 12	≥ 13
*Eritromicina	15 µg	<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 13	14 - 22	≥ 23
*Penicilina	10U	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 28	-	≥ 29
		<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 14	-	≥ 15
		<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	≥ 24
*Tetraciclina	30 µg		≤ 14	15 - 18	≥ 19
*Vancomicina	30 µg		≤ 14	-	≥ 15

(En *itálicas*) antibióticos solo para gram negativos; * antibióticos solo para gram positivos. Simplificación de acuerdo con el CLSI 2018. † Antibióticos para ambos tipos de bacterias.

7.2.3 Perfiles de producción de biofilm

Los ensayos de producción de biofilm fueron realizados para todas las cepas gram positivas obtenidas de úlceras de pie diabético, utilizando dos métodos previamente ya reportados; el primero de ellos descrito por Merritt *et al.*, 2005, (ensayo en placa de microtitulación) y el ensayo con colorante rojo Congo, previamente publicado por Salehzadeh *et al.*, 2016.

Para el primer ensayo, las cepas se cultivaron en agar soya tripticaseína (TSA) y posteriormente se transfirió una colonia pura a 5 mL de caldo nutritivo. Placas de 96 pocillos (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.*) se inocularon con 3 µL de cultivo y se llenaron con 300 µL de caldo soya tripticaseína (TSB) adicionado con

sacarosa al 1%. Se incubó 24 h a 37°C; después de eliminar las bacterias planctónicas mediante 3 lavados en serie con 500 mL de agua estéril, se realizó la tinción de bacterias productoras de biofilm con cristal violeta (0.1%) durante 15 minutos, posteriormente estas bacterias se disolvieron con la adición de ácido acético (30%), se midió la formación de biofilm utilizando un lector de microplacas (*Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU.*) a una $OD = 500$ nm. La interpretación de los resultados obtenidos fue de acuerdo con los valores de OD reportados previamente por Stepanović *et al.*, 2007, (cuadro 2). *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATCC 27853) se usaron como controles positivos, mientras que *Escherichia coli* (*E. coli* DH5 α) y *S. epidermidis* ATCC 12228 se usaron como controles negativos, las muestras se analizaron por triplicado.

Cuadro 2. Criterios de Stepanović *et al.* para la determinación de producción de biofilm

Producción de biofilm	Tipo de producción
1x = (OD de <i>E. coli</i>)	Nula
2x	Débil
3x	Moderada
4x	Fuerte

x se definió como el valor de producción de biofilm de una cepa no productora de biofilm (*E. coli* DH5 α).

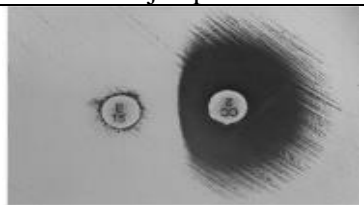

- Nulas productoras de biofilm, serán todos los aislados que den una OD menor o igual a la OD dada por un control negativo para producción de biofilm
- Débiles productoras de biofilm serán todas las cepas que den doble del valor de la OD dada por un control negativo para producción de biofilm
- Moderadas productoras, serán todas las cepas que muestren la triple del valor de la OD dada por un control negativo para producción de biofilm
- Fuertes productoras, serán todas las cepas que muestren 4 veces o más el valor de la OD dada por un control negativo para producción de biofilm

En el segundo ensayo, las cepas se cultivaron previamente en TSA; después del crecimiento, se seleccionó una sola colonia y se inoculó en agar rojo Congo (CRA), (infusión de cerebro y corazón con sacarosa al 1% y rojo Congo al 0.01%). Después se incubó 24 h a 37°C, la presencia de “baba” áspera negra se consideró positiva para la formación de biofilm (los ensayos se realizaron por duplicado). *S. aureus* ATCC 25923 fue usado como control positivo, mientras que *E. coli* DH5 α se usó como control negativo, las muestras se analizaron por duplicado.

7.2.4 Prueba de resistencia inducida a la clindamicina

La resistencia inducida a la clindamicina se evaluó en las especies del género *Staphylococci*. Para ello, los aislados fueron previamente reactivados en TSA, posteriormente para cada uno de los aislados se realizó una solución 0.5 de McFarland y posteriormente fueron inoculados en agar Mueller-Hinton a estría cerrada utilizando un hisopo estéril. A continuación, utilizando una pinza estéril se dispusieron los discos de clindamicina (2 mg) y eritromicina (15 mg) (*BBL sensi-disc*), con una distancia entre ellos de 15 mm. Posterior a la incubación por 24 h a 37°C los fenotipos de las cepas fueron evaluados como: sensibles, resistentes o inducidos en base a las directrices del CLSI 2018, documento M100 (cuadro 3).

Cuadro 3. Interpretación de halos de inhibición para la prueba de resistencia inducida a la clindamicina

Resistencia inducida	Descripción	Ejemplo
Positivo	Aplanamiento de la zona de inhibición adyacente a la eritromicina. Presencia de formación de zona D alrededor del disco de clindamicina.	
Negativo	Crecimiento alrededor de la clindamicina.	

Fotografías tomadas de la tesis reportada por Casas, 2016. Resistencia inducida a clindamicina en *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos en el Instituto Nacional de Salud del Niño.

7.2.5 Detección de cepas de *Staphylococci* meticilina resistente

La presencia fenotípica de cepas MRSA y *Staphylococcus* Coagulasa Negativos Resistentes a la Meticilina (MRCoNS) se evaluó de acuerdo con los protocolos del CLSI. Para ello, las cepas fueron reactivadas en TSA, posteriormente para cada uno de los aislados se realizó una solución 0.5 de McFarland y se inocularon en agar Mueller-Hinton a estría cerrada utilizando un hisopo estéril. A continuación, utilizando una pinza estéril se dispuso un disco de cefoxitina (FOX, 30 µg), (*Becton Dickinson and*

Company). Posterior a una incubación por 24 h a 37°C, los fenotipos fueron evaluados de acuerdo a las directrices de CLSI 2018, documento M100 (cuadro 4). Las cepas ATCC de *S. aureus* 43300 (*mecA*⁺) y 29213 (*mecA*⁻) se utilizaron como controles fenotípicos en la evaluación de resistencia al fármaco.

Cuadro 4. Interpretación de los halos de inhibición de cefoxitina para especies de Staphylococci de acuerdo al CLSI 2018

FOX 30µg	Interpretación de halos de inhibición (mm)		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	≥ 22	---	≤ 21
<i>Staphylococcus</i> spp.	≥ 25	---	≤ 24

7.2.6 Detección de cepas de *S. aureus* con resistencia borde a la oxacilina

La detección de cepas de *S. aureus* con resistencia borde a la oxacilina (BORSA) fue realizada para *S. aureus* que presentaron fenotipo de resistencia a FOX, pero fueron negativas para la amplificación del gen *mecA*. Para ello se utilizaron tres pruebas confirmatorias para este fenotipo de escasa prevalencia.

1. Prueba doble con discos de FOX y amoxicilina-ácido clavulánico; para ello, las cepas en cuestión fueron reactivadas en TSA y previa dilución 0.5 McFarland de cada una de las bacterias fueron inoculadas utilizando un hisopo en agar Mueller-Hinton; posteriormente se dispensaron los discos de FOX y FOX con AMC (amoxicilina-ácido clavulánico). Las cepas BORSA positivas presentan halo de inhibición de mayor diámetro que la contraparte evaluada con FOX debido a que la presencia del ácido clavulánico inhibe la acción de las betalactamasas del *S. aureus*.
2. Evaluación de la MIC de oxacilina, donde la mayoría de las cepas BORSA presentan concentraciones de inhibición de ≤ 2µg/mL.

- Por último, la prueba con disco de cefinasa, un tipo de cefalosporina cromógena que indica en disolución la presencia de cepas productoras de betalactamasa (Hryniewicz and Garbacz, 2017).

7.2.7 Evaluación del crecimiento de los géneros *Staphylococci* y *Enterococci* en agar de vancomicina

El crecimiento de los géneros *Staphylococci* y *Enterococci* obtenidos de úlceras de pie diabético fueron evaluados primeramente en agar con vancomicina, para ello los aislados fueron previamente reactivados en TSA. Posteriormente, para cada uno de los aislados se realizó una solución 0.5 de McFarland y cada uno de ellos fue inoculado a estría cerrada con hisopo estéril en agar infusión cerebro-corazón (BHI) con vancomicina a una concentración final de 6 mg/mL. Los fenotipos obtenidos fueron evaluados de acuerdo a las directrices de CLSI 2018, documento M100 (cuadro 5). Las cepas de *E. faecalis* ATCC 51299 y 736H (resistentes a vancomicina) y *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a la vancomicina) fueron utilizadas como controles para fines de experimento.

Cuadro 5. Interpretación del crecimiento de cepas de *Staphylococci* y *Enterococci* en agar de vancomicina

Género	Concentración	Resultado positivo	Resultado negativo
Gram positivas	Vancomicina a 6 µg/mL	Crecimiento de película ligera o al menos 1 colonia indica presunta susceptibilidad reducida a vancomicina*	Sin crecimiento a 24 h.

*Los aislados con crecimiento en agar de vancomicina deberán ser evaluados por la técnica de MIC; valores tomados del CLSI 2018.

7.2.8 Concentración mínima inhibitoria para vancomicina en *S. aureus* y *Enterococcus* spp.

Una MIC para vancomicina fue evaluada en base a lo reportado por Wiegand *et al.*, 2008 y el *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing* (Cavalieri and Harbeck, 2005) únicamente para géneros Staphylococci y Enterococci; solo cuando los aislados fueron positivos para el crecimiento en el agar de vancomicina. Para ello los aislados fueron previamente reactivados en TSA. Posteriormente se prepararon alícuotas de los cultivos a 0.5 McFarland, las cuales posteriormente fueron diluidas 1:100 en caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados (MHCA), (anexo 2).

Se inocularon 50 μ L de esta dilución a cada uno de los carriles en horizontal de la placa de 96 pocillos (excepto para los dos últimos 2 carriles que fueron ocupados para el control positivo y negativo respectivamente). Se prepararon 800 μ L de una solución madre de vancomicina 128 μ g/mL, (se pesaron 0.00128 gramos del polvo de vancomicina y se adicionó a 1 mL de agua estéril). Para añadir la vancomicina a la placa de 96 pocillos se tomaron 80 μ L de la solución madre y se diluyeron en 720 μ L de medio MHCA, de la cual posteriormente, se añadieron 50 μ L a los primeros ocho pocillos en horizontal de la placa. Con esto, se obtuvo una concentración final de los primeros pocillos de 64 μ g/mL de vancomicina. A continuación, se realizaron concentraciones decrecientes a partir de los 400 μ L restantes de la solución madre. Para al final tener una concentración decreciente de vancomicina de 64 μ g/mL a 2 μ g/mL. La placa se incubó a 37° C por 24 h, posterior al crecimiento, los resultados fueron interpretados en base a la observación de crecimiento bacteriano en forma creciente en cada uno de los pocillos inoculados. La interpretación de los puntos de corte de vancomicina para cada uno de los géneros bacterianos evaluados se realizó en base a lo reportado por el CLSI 2018 (cuadro 6).

Cuadro 6. Interpretación de los puntos de corte de vancomicina en base al CLSI 2018

Bacteria	MIC para vancomicina (μ g/mL)		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	≤ 2	4 - 8	≥ 16
Staphylococcus spp.	≤ 4	8 - 16	≥ 32
<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 4	8 - 16	≥ 32

Métodos moleculares

7.3 Extracción de DNA genómico de cepas gram positivas obtenidas por cultivo de úlceras de pie diabético

Las cepas gram positivas se inocularon en caldo nutritivo (3 mL) durante 24 h a 37° C, después del crecimiento se obtuvo un sedimento celular de cada cepa; se extrajo el material genómico utilizando el sistema de extracción *Wizard Genomic DNA kit* (Promega, Woods Hollow Road Madison, WI, EE. UU.) según las especificaciones del fabricante. Para fines del procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada una de las extracciones realizadas fue visualizada por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% utilizando como revelador 2 µL SYBR green y visualizándolo en un transiluminador de luz UV (*KODAK gel logic 112*). Posteriormente el DNA se estandarizó de 20-50 ng/mL, para ello se realizaron diluciones las cuales fueron ajustadas con agua milli-Q estéril, y evaluadas utilizando el equipo de UV-vis Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

7.3.2 Detección del gen *mecA*

La detección del gen *mecA* fue evaluada solo en cepas de *S. aureus* y *Staphylococcus* spp. En la PCR se utilizaron como molde 2 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'), los cuales fueron anteriormente descritos por Oliveira and de Lencastre, 2002. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq[®] Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C. La reacción se completó con la incubación a 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, las amplificaciones de DNA se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa al 1.5 %, y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95

V. Finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 162 pb fue considerado como positivo. *S. aureus* ATCC 43300 se utilizó como control positivo para las amplificaciones por PCR.

7.3.3 Detección del gen *vanA*

La detección del gen *vanA* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* y *Enterococci* utilizando 2 tipos de iniciadores previamente reportados; para el primero de ellos se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-CATGAATAGAATAAAAAGTAGCAATA-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-CCCCTTTAACGCTAATACATCAA-3'), los cuales fueron anteriormente descritos por Clark *et al.*, 1993. Los iniciadores: forward (5'-GGGAAAACGACAATTGC-3') y reverse (5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3') previamente reportados por Dutka *et al.*, 1995, fueron utilizando en el segundo procedimiento con concentración de DNA e iniciadores iguales a la primera amplificación.

Las condiciones de reacción para los dos procedimientos de PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación del primer ensayo consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 45 s a 94 °C, 60 s a 50 °C y 60 s a 72 °C. Para el segundo ensayo la amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 45 s a 94 °C, 45 s a 54 °C y 60 s a 72 °C.

Las reacciones se completaron con la incubación de los productos a 72 °C por 7 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8µL) se mezclaron con 2µL de revelador SYBR green, se cargaron en un gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por luz UV donde un amplicón de 1,030 pb o de 732 pb respectivamente fueron considerados como positivos.

Detección del gen *vanB*

La detección del gen *vanB* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* y *Enterococci*; para la amplificación se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-GTGACAAACCGGAGGCGAGGA-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA-3'), los cuales fueron anteriormente descritos por Clark *et al.*, 1993. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C. La reacción se completó con la incubación a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8 µL) se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 433 pb fue considerado como positivo. *E. faecalis* ATCC 51299 se utilizó como control positivo para las amplificaciones por PCR.

Detección del gen *vanC*

La detección del gen *vanC* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* y *Enterococci*; para la amplificación se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-GAAAGACAACAGGAAGACCGC-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-ATCGCATCACAAGCACCAATC-3'), los cuales fueron anteriormente descritos por Clark *et al.*, 1993. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C. La reacción se

completó con la incubación a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8 µL) se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 796 pb fue considerado como positivo. *E. faecalis* ATCC 51299 se utilizó como control positivo para las amplificaciones por PCR.

Detección de gen *vanH*

La detección del gen *vanH* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* y *Enterococci*; para la amplificación se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-GTGAGCAGGATGAGGCAGA-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-GCTGCGACTATAAGCCAACAC-3'), los cuales fueron anteriormente descritos por Rezvani *et al.*, 2016. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 60 s a 94 °C, 60 s a 50 °C y 60 s a 72 °C. La reacción se completó con la incubación a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8 µL) se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 503 pb fue considerado como positivo. *E. faecalis* ATCC 51299 se utilizó como control positivo para las amplificaciones por PCR.

7.3.4 Detección del gen *icaA*

La detección del gen *icaA* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* y *Enterococci*; para la amplificación se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3') y 0.2 µM del iniciador reverse (5'-

AAGATATAGCGATAAGTGC-´3), los cuales fueron anteriormente descritos por Vasudevan *et al.*, 2003. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP´s 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 60 s a 94 °C, 60 s a 50 °C y 90 s a 72 °C. La reacción se completó con la incubación a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8 µL) se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 1,315 pb fue considerado como positivo. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se utilizaron como controles positivos para las amplificaciones por PCR.

7.3.5 Detección de gen *lukSF*

La detección del gen *lukSF* fue realizada en aislados del género *Staphylococci* para la amplificación se utilizó como molde 2.5 µL de DNA purificado dentro de un volumen total de 20 µL a una concentración final de 0.2 µM del iniciador forward (5´-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-´3) y 0.2 µM del iniciador reverse (5´-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC-´3), los cuales fueron descritos por McClure *et al.*, 2006. Las condiciones de reacción de la PCR fueron las siguientes: Tris HCl 60 mM pH 9.0, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP´s 10 mM y 0.05 unidades de polimerasa *Taq* (*GOtaq® Flexi DNA Polimerasa Promega Corp.*). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de amplificación de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 45 s a 72 °C. La reacción se completó con la incubación a 72 °C por 10 min. Posteriormente, las amplificaciones de DNA (8 µL) se mezclaron con 2 µL de revelador SYBR green, se cargaron en gel de agarosa (1.5 %) y se realizó electroforesis horizontal durante 55 minutos a 95 V, finalmente, los productos de DNA se visualizaron mediante transiluminación por UV donde un amplicón de 433 pb fue considerado como positivo.

Métodos instrumentales (espectrometría de masas)

7.4 Análisis por MALDI-TOF

La identificación bacteriana por espectrometría de masas fue realizada para los aislados gram positivos obtenidos de úlceras de pie diabético, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en la Ciudad de México, y fue realizada en el equipo Vitek MS (BioMérieux, France). Para ello, las cepas a evaluar fueron inoculadas en tubos Eppendorf con TSA y enviadas por servicio de mensajería al laboratorio de microbiología clínica a cargo de la Dra. María Guadalupe Aguilera Arreola; ya en el laboratorio, las cepas fueron nuevamente inoculadas en agar sangre e incubadas a 37 °C por 24 h.

Posteriormente, en el portaobjetos para gram positivos (bioMérieux MS), se adicionaron 2 µL de ácido α -ciano hidroxicinámico en la cual se disolvió la muestra a evaluar (una colonia pura). A continuación, la tarjeta fue insertada en el equipo Vitek MS, y mediante pulsación laser las proteínas fueron expuestas e ionizadas, para posteriormente ser detectadas por un electrodo anular (time of flight), para generar un espectro de proteínas el cual se comparó con espectros de la base de datos Myla software[®], para así poder identificar el microorganismo a nivel de género o especie. Dependiendo del porcentaje de coincidencia del espectro con el ya reportado, se determinó si la identificación fue a nivel de género (mayor a 70 % y menor a 80 %) o especie (mayor a 80 %). La cepa de *E. coli* ATCC 8739 fue utilizada como control interno en las pruebas de identificación bacteriana.

Métodos inmunohistoquímicos

7.5 Inclusión de muestras en parafina

La inclusión de tejidos de DFUs en parafina, se realizó en el departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. María Teresa Valenzuela Vargas. La serie de pasos que se realizaron para la inclusión de biopsias en parafina se describen en la figura 4.

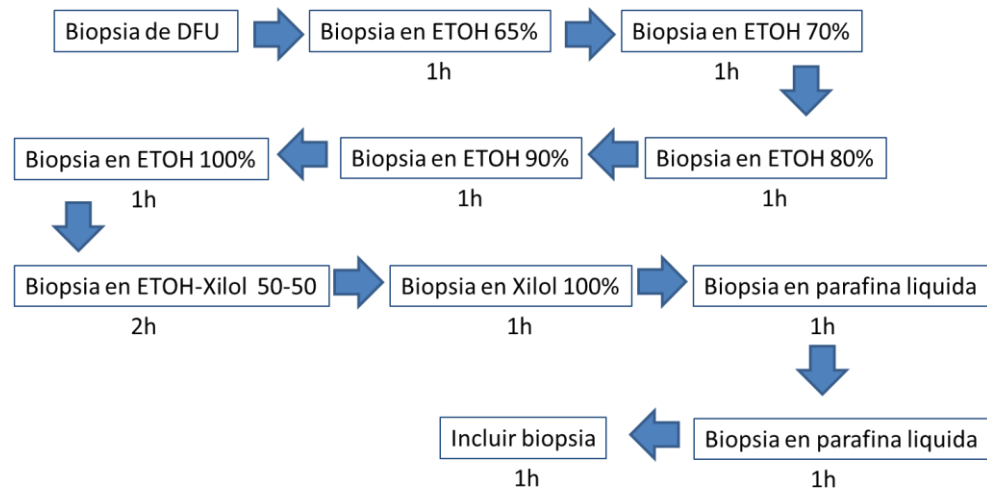


Figura 4. Procedimiento para inclusión de biopsias en parafina

7.5.2 Técnica de hematoxilina-eosina

En cada una de las muestras de biopsias fue realizado un corte de 5 μm utilizando un micrótopo convencional, posteriormente el corte de tejido fue extendido en un baño maría y montado en portaobjetos convencionales. Los pasos realizados para teñir la arquitectura de los tejidos montados en portaobjetos con hematoxilina-eosina se describe en la figura 5. La visualización de las imágenes fue realizada en un microscopio convencional (Olympus BX40) observando a 100X estructuras celulares como células PMN, formación de vasos sanguíneos o presencia de necrosis celular.

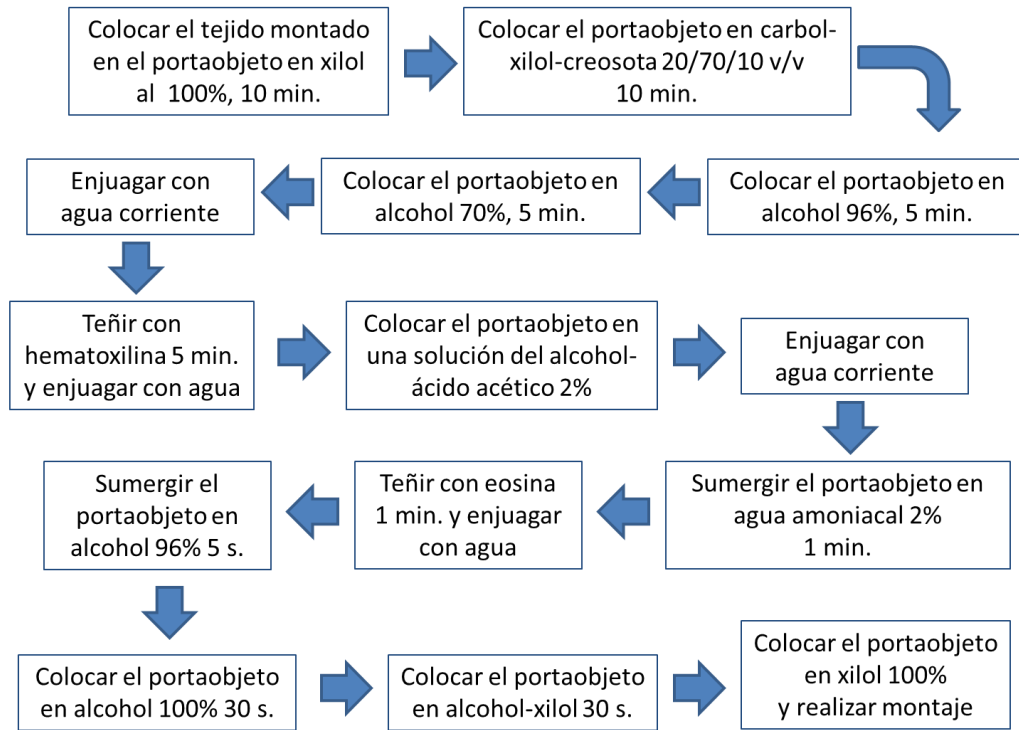


Figura 5. Procedimiento para la tinción de tejido por hematoxilina-eosina. Para el paso número 5, la hematoxilina fue previamente filtrada para evitar la formación de grumos.

7.5.3 Inmunohistoquímica específica de mediadores celulares

Para la técnica de inmunohistoquímica, las biopsias de pie diabético fueron evaluadas en el laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) bajo la supervisión de la Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo. Para ello, posterior a la evaluación de cada uno de los tejidos (muestras) por la tinción de hematoxilina-eosina, se seleccionaron las muestras que presentaron extenso infiltrado celular para realizar cortes histológicos, y posteriormente llevar a cabo la tinción por inmunohistoquímica para detectar la presencia de citocinas que se enlistan a continuación (cuadro 7):

Cuadro 7. Descripción de citocinas y/o mediadores celulares evaluados mediante la técnica de inmunohistoquímica

Mediador celular	Anticuerpo utilizado (epítipo)	Muestras evaluadas	Dilución
TNF- α	4E1	20	1:100
IFN- γ	NYRhIFN γ	20	1:250
TGF- β 3	B-11	6	1:250
IL-1	5-G3	14	1:250
IL-4	HIL41	17	1:100
IL-10	E-10	12	1:250
Factor H	C-18/3	6	1:100
p53	DO-1	12	1:250
Caspasa-3	E-8	9	1:100
MMP-2	2C1	10	1:100
FGF-5	F-11	16	1:80
KAI1	G-10	14	1:80

- Primeramente, los tejidos fueron retirados del alcohol absoluto y depositadas en un histocineta automático (*Spin Tissue Processor Microm STP 120*) con el fin de deshidratar los tejidos y prepararlos para la inclusión en parafina sintética.
- Los tejidos fueron incluidos en parafina sintética (*Paraplast Leica*) y se dejaron endurecer toda la noche (12 h).
- Posterior al paso de inclusión, las muestras fueron desbastadas hasta llegar al tejido utilizando un micrótopo semi-automático Leica Biosystems RM2245 para obtener cortes histológicos.
- Se realizaron cortes histológicos de 3 μ m de grosor, para cada una de las muestras de pie diabético obtenidas, los cortes se depositaron en un baño maría a 45 °C para finalmente ser tomadas con un portaobjetos cargado (*Santa Cruz Biotechnology*) y se dejaron a temperatura ambiente toda la noche (12 h).
- A continuación, los portaobjetos con la muestra se incubaron en una estufa a 60 °C por 20 min para el proceso de desparafinación, cada portaobjetos con muestra fue identificado con la clave alfanumérica de la muestra misma.
- Los portaobjetos con las muestras se sumergieron en una solución de xilol por 3 minutos.

- Después se sumergieron en una nueva solución de xilol por 3 minutos (esto para ir eliminado el exceso de parafina).
- Seguido de alcohol-xilol 3 minutos, después alcohol absoluto 3 minutos y alcohol al 96% por 3 minutos, finalmente los portaobjetos se mantuvieron en agua destilada a temperatura ambiente.
- Se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en una jarra Coplin con buffer de citratos 1X (pH 4), y se introdujeron a una olla de presión por 12 minutos a 120 libras de presión.
- Transcurrido el tiempo y después de que se enfriaran las soluciones, los portaobjetos se retiraron del buffer de citratos y se colocaron en una jarra Coplin con una solución de metanol-peróxido de hidrogeno (9:1) por 10 min. con el fin de bloquear la peroxidasa endógena; transcurrido el tiempo, se lavó el portaobjetos con buffer PBS-Tween 20.
- Posteriormente, se recuperaron los portaobjetos y se colocaron en una cámara húmeda y se restringió la zona de ensayo con un marcador hidrofóbico (con el fin de optimizar insumos).
- Se adicionaron 200 μ L de la solución ImmunoDNA Background Blocker y se dejó reaccionar en agitación por 20 minutos.
- Posteriormente, se lavaron las laminillas con PBS-tween y se adicionó el anticuerpo primario (ver cuadro 7) utilizando como solución diluyente ImmunoDNA Background Blocker (*Bio SB*[®]) y se dejó reaccionar por toda la noche.
- Al día siguiente se lavaron los portaobjetos con PBS-tween y se adicionó el anticuerpo secundario (una gota por tejido). En este caso se utilizaron anticuerpos secundarios de conejo y cabra de la siguiente manera.
- Las muestras donde se evaluó TNF- α y el control negativo de este se utilizó anticuerpo secundario de conejo (una gota de *Rabbit polydetector HRP/DAB detection system, Bio SB*[®]).
- Las muestras donde se evaluaron IFN- γ , IL-1, IL-4, e IL-10, TGF- β 3, factor H, p53, caspasa-3, MMP-2, FGF-5 y KAI1 y los controles negativos de estos, se utilizaron anticuerpos secundarios de cabra (una gota de *Goat probe* que se dejó incubar por 20 minutos y después se adicionó una gota de *Goat on rodent HRP-Polymer* también

con una incubación de 20 minutos) posteriormente los tejidos, se lavaron con PBS-tween y después se tiñeron con 50 µL de una solución de diaminobencidina 0.1M por 10 s o a observación del cambio a color marrón.

- Posterior a la tinción con diaminobencidina, los portaobjetos se lavaron con PBS-tween y se realizó una tinción con hematoxilina de Harris.
- A continuación, se deshidrataron los cortes utilizando el tren de desparafinado, en el siguiente orden: alcohol 96%, alcohol absoluto, alcohol-xilol, xilol 2 y xilol 1; todos por 3 minutos.
- Los portaobjetos fueron montados utilizando una resina sintética y se dejaron secar por 24 h.
- La visualización de estructuras, tipos de células y zonas de marcaje específico fue realizada en un microscopio convencional.

7.5.4 Inmunohistoquímica específica de linajes celulares

Los linajes celulares identificados y los anticuerpos utilizando por inmunohistoquímica de tejidos de úlceras de pie diabético se describen a continuación (cuadro 8).

Cuadro 8. Descripción de linajes celulares evaluados mediante la técnica de inmunohistoquímica

Linaje celular	Anticuerpo utilizado (epítipo)	Muestras evaluadas	Dilución
Linfocitos T CD4 ⁺	GK1.5	12	1:250
Linfocitos T CD8 ⁺	5F10	12	1:250
Macrófagos	25F9, CD68	6	1:100
Linfocitos B	CD19 (HIB19), CD20	6	1:100
Células plasmáticas	LIV3G11	11	1:100

- Posterior al paso de inclusión, las muestras fueron trabajadas en un micrótopo estándar (*Leica Biosystems RM2245*) para obtener cortes histológicos.
- Se realizaron cortes histológicos de 2 μm para cada una de las muestras de pie diabético obtenidas se depositaron en un baño maría para finalmente tomarlas con un portaobjetos cargado, se dejaron a temperatura ambiente toda la noche (12 h).
- Cada portaobjetos con muestra fue identificado con la clave alfanumérica de la muestra misma.
- A continuación, los portaobjetos con la muestra se incubaron en una estufa a 60 °C por 20 min para el proceso de desparafinación, los portaobjetos con las muestras se sumergieron en una solución de xilol por 3 minutos.
- Después se sumergieron en una nueva solución de xilol por 3 minutos (esto para ir eliminado el exceso de parafina).
- Alcohol-xilol 3 minutos, después alcohol absoluto 3 minutos y alcohol de 96° por 3 minutos, finalmente los portaobjetos se mantuvieron en agua destilada a temperatura ambiente.
- Se realizó la recuperación antigénica colocando los portaobjetos en una jarra Coplin con buffer de citratos 1X (pH 4), todo esto se introdujo una olla de presión por 12 minutos a 120 libras de presión.
- Transcurrido el tiempo y después de que se enfriaran las soluciones, los portaobjetos se retiraron del buffer de citratos y se colocaron en una jarra Coplin con una solución de metanol-peróxido de hidrogeno (9:1) con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. Finalmente se lavó el portaobjetos con buffer PBS-Tween 20.
- Posteriormente, se recuperaron los portaobjetos y se colocaron en una cámara húmeda y se restringió la zona de ensayo con un marcador hidrofóbico (con el fin de optimizar insumos).
- Se adicionaron 200 μL de la solución *ImmunoDNA Background Blocker* (*Bio SB*®) y se dejó reaccionar por 20 minutos.
- Se adicionó el anticuerpo primario (ver cuadro 8) utilizando como solución diluyente *ImmunoDNA Background Blocker* y se dejó reaccionar por toda la noche.

- Al día siguiente se lavaron los portaobjetos con agua corriente y sin que se seque la superficie se adicionó el anticuerpo secundario. En este caso se utilizaron anticuerpos secundarios de ratón y cabra de la siguiente manera.
- Las muestras donde se evaluó linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y los controles negativos de estos se utilizaron anticuerpos secundarios de conejo (una gota de *Rabbit polydetector HRP/DAB detection system, Bio SB*[®]).
- Las muestras donde se evaluaron macrófagos, células B, células plasmáticas y los controles negativos de estos, se utilizaron anticuerpos secundarios de cabra (una gota de *Goat probe* incubando 20 minutos más una gota de *Goat on rodent HRP-Polymer* también con incubación de 20 minutos). Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS-tween y después se tiñeron con 50 µL de una solución de diaminobencidina por 10 s o hasta la observación del cambio a color marrón.
- Posterior a la tinción con diaminobencidina, los portaobjetos se lavaron con PBS-tween y se realizó una tinción con hematoxilina de Harris.
- A continuación, se deshidrataron los cortes utilizando el tren de desparafinado, en el siguiente orden: alcohol 96%, alcohol absoluto, alcohol-xilol, xilol 2 y xilol 1; todos por 3 minutos.
- Los portaobjetos fueron montados utilizando una resina sintética y se dejaron secar por 24 h.
- La visualización de estructuras, tipos de células y zonas de marcaje específico fue realizada en un microscopio convencional.

8. RESULTADOS

8.2 Pacientes y obtención de biopsias

Se obtuvieron 277 biopsias de pie diabético no repetidas de pacientes que ingresaron a cirugía en el centro médico Angiología y Cirugía Vascular de Noreste, en Reynosa Tamaulipas, desde diciembre 2011 a diciembre del 2016, las muestras para cultivo fueron tomadas del sitio de la lesión después de una cuidadosa limpieza superficial inicial, seguida de desbridamiento quirúrgico. La toma de la muestra se realizó por raspado o corte con pinzas en el centro de la lesión. Una vez tomadas las muestras fueron enviadas al laboratorio para el cultivo de bacterias aerobias, en un lapso de tiempo no mayor a 1 h. Los especímenes fueron transportados al laboratorio en medio Stuart o solución salina estéril. En el cuadro 9 muestra las principales características de los pacientes incluidos en este estudio.

Cuadro 9. Datos de los pacientes, resultado microbiológico y características de las úlceras

Parámetro	n (%)
¹ Número de muestras	332 (100)
Número de aislados	364 (100)
Género (Hombre/Mujer)	192 (58) /137 (41.2)
Edad (Media de años \pm DS)	(58.9 \pm 11.5)
Duración de la diabetes (Media \pm DS)	(15.8 \pm 7.6)
² <i>Crecimiento Monomicrobiano</i>	86 (26)
<i>Crecimiento Polimicrobiano</i>	96 (58)
<i>Sin crecimiento</i>	54 (16)
<i>Aislados Gram negativos</i>	201(55)
<i>Aislados Gram positivos</i>	163 (45)
³ Tendón	85 (30.7)
Tendón-hueso	16 (5.7)
Tendón-fascia	34 (12.3)
Hueso	51 (18.4)
Tejido músculo-esquelético	90 (32.5)
Tejido (Biopsia)	277 (83)
Absceso (Aspirado)	38 (12)
Exudados (Líquido)	17 (5)

¹Datos del paciente

²Resultado microbiológico de la herida evaluada

³Clasificación de la herida en base a la localización en el pie

En nuestro estudio se reclutaron 277 muestras de diferentes grados Wagner (figura 6), 82% de las muestras evaluadas se incluyeron en grados 2 y 3 correspondientes a la clasificación de Wagner, que indica la homogeneidad de las características clínicas de la mayor parte de las muestras.

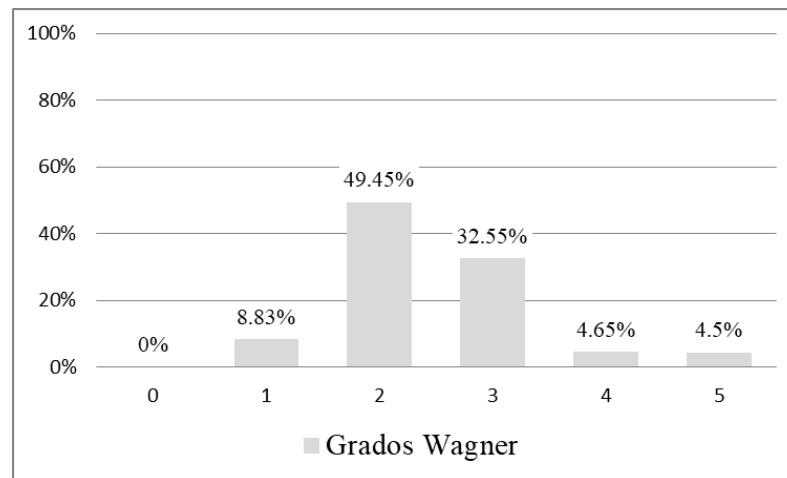


Figura 6. Diagrama representativo de los grados Wagner encontrados en biopsias de pie diabético evaluadas (0-5 indica el grado de la lesión en la escala de Wagner).

Consentimiento informado y permiso

Parte de este trabajo de investigación fue aprobado por una junta de revisión institucional (Oficina de Investigación y Estudios de Posgrado del Instituto Politécnico Nacional) con el número 20120763 en 2012. Para los ensayos histológicos y de inmunohistoquímica se utilizaron preparaciones de tejido de piel de sujetos sanos en portaobjetos con el objetivo de contrastar nuestros resultados, mismos que fueron donados por la Dra. María Teresa Valenzuela Vargas del departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en la Ciudad de México. Por consiguiente, los ensayos inmunohistoquímicos realizados se muestran como ensayos piloto para una siguiente prueba con más muestras de objeto de estudio.

En cuanto a las muestras de pacientes obtenidos, el anexo 1 muestra una copia del consentimiento informado obtenido en este estudio, por motivos éticos no se muestran los documentos firmados originales, pero si un formato en blanco como los cuales

fueron llenados. Los consentimientos informados obtenidos son respaldados por personal del Laboratorio de Interacción Ambiente-Microorganismo.

8.3 Métodos microbiológicos

Obtención de aislados bacterianos a partir de biopsias

Con base en la identificación bioquímica y después de un curado/confirmación mediante una metodología alterna (espectrometría de masas, MALDI-TOF) se determinaron las siguientes especies bacterianas obtenidas de pacientes con úlceras de pie diabético (cuadro 10).

Cuadro 10. Descripción del total de bacterias aisladas a partir de úlceras de pie diabético de diciembre de 2011 a diciembre del 2016

Microorganismos	Aislados <i>n</i> = 364	%
<i>S. aureus</i>	91	25
<i>Serratia</i> sp.	53	15
<i>Enterobacter</i> sp.	38	10
<i>Staphylococcus</i> spp.	35	10
<i>Proteus</i> sp.	34	9
<i>Enterococcus</i> spp.	32	9
<i>E. coli</i>	27	7
<i>Pseudomonas</i> spp.	17	5
<i>C. diversus</i>	15	4
<i>Klebsiella</i> sp.	6	2
<i>Providencia stuartii</i>	4	1
<i>Streptococcus</i> sp.	3	0.7
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	3	0.7
<i>Shigella</i> spp.	2	0.5
<i>Bacillus</i> sp.	2	0.5
<i>Edwardsiella</i> sp.	2	0.5

Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas obtenidas de úlceras de pie diabético

Los perfiles de resistencia a antibióticos para las cepas gram positivas se muestran en el cuadro 11; las cifras representan los porcentajes de resistencia y sensibilidad a cada antibiótico, el faltante para llegar a 100% correspondió a los porcentajes de aislados con resistencia o sensibilidad intermedia. El cuadro 12 muestra los perfiles obtenidos para las cepas gram negativas.

Con base en los resultados de la resistencia fenotípica (figura 7), los antibióticos más eficaces para las bacterias gram-positivas fueron levofloxacino (R = 28, S = 35) y cefalotina (R = 19, S = 38). Penicilina (R = 93, S = 5) y dicloxacilina (R = 88, S = 5) fueron los inhibidores menos eficaces para las bacterias gram positivas; para *S. aureus*, el 96% de todas los aislados fueron resistentes a la penicilina, y cefalotina fue el antibiótico más eficaz con el 57% de las cepas sensibles. Levofloxacino fue el antibiótico más eficaz para *Enterococcus* sp. como para *S. epidermidis* con 50 y 56% de las cepas sensibles respectivamente.

Para las especies gram negativas, los miembros de la familia Enterobacteriaceae fueron los más frecuentemente aislados, y la familia de los aminoglucósidos fueron los antibióticos más eficaces, para estos microorganismos. Así como en nuestro estudio, Citrón *et al*; 2007 reportaron que el grupo de Enterobacterias fueron en gran medida susceptibles a imipenem y aminoglucósidos. La amikacina resultó ser el antibiótico más efectivo contra las bacterias gram negativas (R = 12, S = 80), seguido de netilmicina (R 22, S = 51) y levofloxacino (R = 34, S = 54), respectivamente. Nuestros resultados indican que los aminoglucósidos como amikacina son eficaces en infecciones moderadas de pie diabético. Sin embargo, la presencia de cepas con resistencia de amikacina podría suponer la aparición o el movimiento de las cepas que podrían requerir esquemas de terapia antimicrobiana vigorosos en comparación con cepas sensibles a este antibiótico.

Perfiles de resistencia a antibióticos:

Cuadro 11. Perfil de resistencia a antibióticos de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras del pie diabético.

Aislados R/S (%)	GM	CTX	CF	AM	STX	LEV	FEP	PE	E	DC	TET	CXM	V
<i>S. aureus</i> (91)	45/27	45/35	24/63	86/5	30/64	32/63	75/16	97/2	66/14	94/3	40/30	52/27	45/55
<i>S. epidermidis</i> (35)	54/31	46/25	40/51	90/8	60/31	20/69	63/23	91/0	57/17	86/3	54/31	40/23	60/40
<i>Enterococcus</i> sp. (32)	56/25	50/30	40/43	77/13	33/47	40/53	60/37	90/7	57/20	94/3	50/33	57/21	47/53
Otros gram pos. (5)	80/20	0/20	40/40	100/0	20/80	0/100	40/40	100/0	20/0	100/0	40/20	0/20	20/80
Total (163)	50/28	45/32	31/56	86/8	37/54	29/63	68/23	94/2	61/15	93/3	45/31	48/25	48/52

*El porcentaje faltante para llegar a 100% representó el porcentaje de los aislados que mostraron resistencia intermedia. AM, ampicilina., CF, cefalotina., CTX, cefotaxima., CXM, cefuroxima., DC, dicloxacilina., E, eritromicina., GM, gentamicina., LEV, levofloxacino., PE, penicilina., TET, tetraciclina., STX, trimetoprim/sulfametoxazol., V, vancomicina.

Cuadro 12. Perfil de resistencia a antibióticos de aislados gram negativos obtenidos por cultivo de úlceras del pie diabético.

Aislados R/S (%)	GM	CTX	CF	AM	STX	LEV	FEP	C	NF	NET	AK	CRO
<i>Serratia</i> sp. (53)	44/30	61/26	85/7	83/11	48/28	20/74	24/57	46/37	74/16	31/43	20/69	63/18
<i>Enterobacter</i> sp. (38)	50/32	58/21	92/3	95/0	50/39	24/61	37/45	47/39	73/11	29/63	13/87	42/37
<i>Proteus</i> sp.(34)	44/26	53/26	91/6	97/0	76/18	20/62	38/53	44/32	74/9	9/62	0/88	41/27
<i>E. coli</i> (27)	78/07	70/19	93/0	96/0	59/33	63/37	30/52	37/52	26/56	15/44	4/96	52/22
<i>P. aeruginosa</i> (17)	24/29	47/18	88/6	100/0	76/6	29/53	6/82	70/18	82/6	12/65	6/88	53/12
<i>C. diversus</i> (15)	60/13	67/13	87/0	93/7	73/27	67/27	15/60	40/40	69/15	13/47	15/77	62/15
Other gram neg. (17)	47/53	65/18	100/0	100/0	70/24	53/41	53/41	47/41	47/35	35/47	12/65	47/35
total (201)	49/27	60/22	90/4	93/3	57/27	33/56	30/54	46/38	65/17	22/53	11/82	51/24

El porcentaje faltante para llegar a 100% representó el porcentaje de los aislados que mostraron resistencia intermedia. AK, amikacina., AM, ampicilina., CF, cefalotina., FEP, cefepime., CTX, cefotaxima., CRO, ceftriaxona., C, cloranfenicol., GM, gentamicina., LEV, levofloxacino., NET, netilmicina., NF, nitrofurantoína., STX, trimetoprim/sulfametoxazol

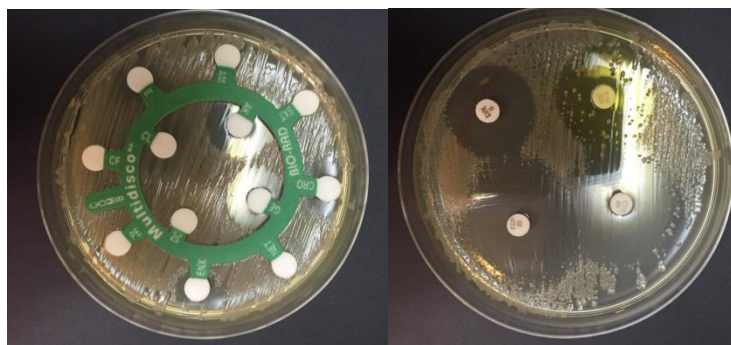


Figura 7. Representación de antibiogramas realizados a aislados obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. La presencia de halos sin crecimiento (previa medición y comparación del diámetro del halo) indica la susceptibilidad a él antibiótico, los crecimientos bacterianos alrededor de los discos de inhibición indican resistencia al antibiótico.

En cuanto al origen de estas biopsias evaluadas, las que mostraron una mayor diversidad fueron las muestras obtenidas de músculo y tendón, en el que sólo menos de 10% de las muestras fueron tomadas por hisopo (cuadro 13).

Cuadro 13. Origen específico de cada una de las cepas analizadas en este estudio

Tipo de tejido	1 <i>n</i> = 51	2 <i>n</i> = 6	3 <i>n</i> = 17	4 <i>n</i> = 29	5 <i>n</i> = 55	6 <i>n</i> = 36	7 <i>n</i> = 21
Sin crecimiento	6	0	0	3	4	12	4
Monomicrobianos	29	3	13	18	30	19	13
Polimicrobianos	8	1.5	2	4	10.5	2.5	2
Tipos de aislados							
<i>S. aureus</i> (<i>n</i> = 67)	14	4	6	13	15	11	4
<i>Enterococcus</i> sp. (<i>n</i> = 28)	5	2	4	3	7	4	3
<i>S. epidermidis</i> (<i>n</i> = 18)	6	0	0	3	7	0	2
Otros gram pos. (<i>n</i> = 3)	1	0	0	0	1	0	1
<i>Enterobacter</i> sp. (<i>n</i> = 29)	3	2	3	3	13	3	2
<i>Serratia</i> sp. (<i>n</i> = 26)	6	1	1	6	4	4	4
<i>Proteus</i> sp. (<i>n</i> = 26)	12	0	1	3	6	2	2
<i>E. coli</i> (<i>n</i> = 15)	6	0	1	2	3	3	0
<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>n</i> = 15)	4	0	1	1	8	0	1
<i>Citrobacter</i> sp. (<i>n</i> = 12)	4	0	2	0	3	2	1
Otros gram neg. (<i>n</i> = 7)	1	0	2	0	3	0	1

1: Tendón, 2: Tendón-hueso, 3: Tendón-fascia, 4: Hueso, 5: Músculo, 6: Aspirados, 7: Exudados.

Decidimos buscar diferencias significativas entre el tipo de bacterias infectantes frente a los tipos de biopsia (se evaluaron los 3 géneros predominantes encontrados), encontrando que la mayoría de los géneros de bacterias predominantes no asociadas estadísticamente con un tipo particular de tejido (cuadro 14). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas cuando el género *Enterobacter* se evaluó frente a biopsias de músculo ($p = 0.011$).

Cuadro 14. Asociación estadística entre el tipo de bacteria infectante y tejidos obtenidos

Aislados	1	2	3	4	5	6	7
	<i>n</i> = 51	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 17	<i>n</i> = 29	<i>n</i> = 55	<i>n</i> = 36	<i>n</i> = 21
	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>	valor <i>p</i>
<i>S. aureus</i> (<i>n</i> = 67)	0.463	0.57	0.735	0.88	0.421	0.931	0.192
<i>Enterococcus</i> sp. (<i>n</i> = 28)	0.434	0.134	0.180	0.645	0.940	0.709	0.856
<i>Enterobacter</i> sp. (<i>n</i> = 29)	0.069	0.134	0.601	0.594	0.011*	0.321	0.576

1: Tendón, 2: Tendón-hueso, 3: Tendón-fascia, 4: Hueso, 5: Músculo, 6: Aspirados, 7: Exudados, *Valor estadísticamente significativo.

Sugerimos que, si bien *S. aureus* es predominante en las DFIs, las bacterias gram negativas como las Enterobacterias podrían desempeñar un papel importante en la colonización de ciertos tejidos (anexo 3); Sin embargo, se necesitan estudios más profundos en este sentido.

Perfiles de producción de biofilm

La caracterización de bacterias productoras de biofilm se realizó en placas de 96 pocillos donde se evaluaron por triplicado 163 cepas gram positivas. De acuerdo a los criterios de categorización de bacterias productoras de biofilm se determinaron los siguientes valores que se muestran en las figuras 8-13.

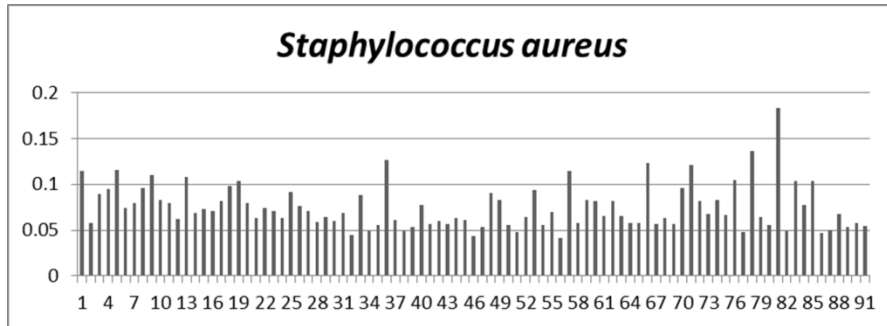


Figura 8. Producción de biofilm en cepas de *S. aureus*. En la escala horizontal se muestran el total de cepas evaluadas ($n = 91$), en escala vertical se representa el valor de *OD* obtenido de la producción de biofilm.

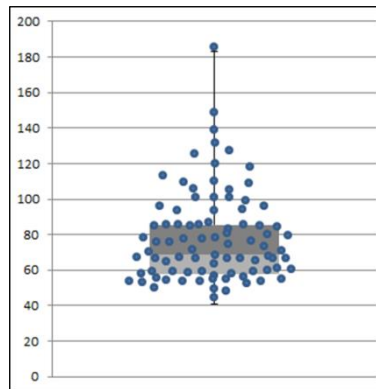


Figura 9. Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm en *S. aureus*. (Media = 69) en *S. aureus* ($n = 91$), así como rangos cuartiles, máximos (183) y mínimos (41). Para fines de representación, los valores de *OD* obtenidos fueron expresados en números naturales.

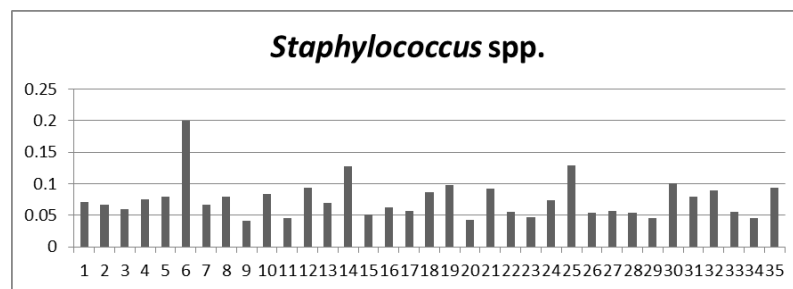


Figura 10. Producción de biofilm en cepas de CoNS. En la escala horizontal se muestran el total de cepas evaluadas ($n = 35$), en escala vertical se representa el valor de *OD* obtenido de la producción de biofilm.

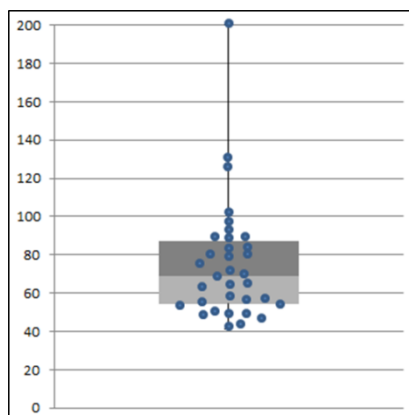


Figura 11. Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm para CoNS. ($m = 69$) en *Staphylococcus* spp. ($n = 35$), así como rangos cuartiles, máximos (200) y mínimos (41). Para fines de representación, los valores de *OD* obtenidos fueron expresados en números naturales.

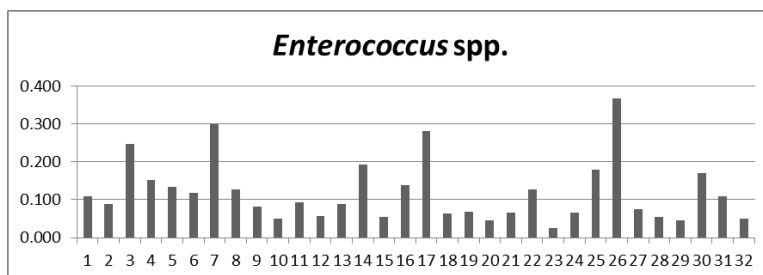


Figura 12. Producción de biofilm en cepas de *Enterococcus* spp. En la escala horizontal se muestran el total de cepas evaluadas ($n = 32$), en escala vertical se representa el valor de *OD* obtenido de la producción de biofilm.

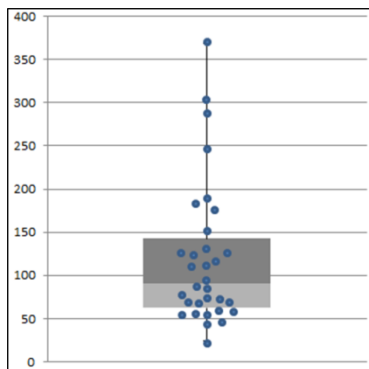
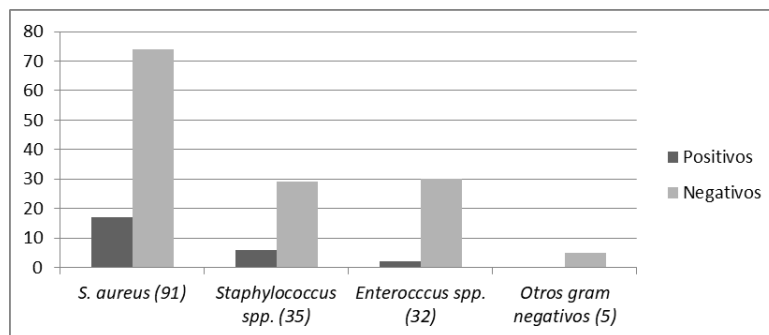


Figura 13. Diagrama de cajas que representa el promedio de producción de biofilm en *Enterococcus* spp. ($m = 91$) en *Enterococcus* spp. ($n = 32$), así como rangos cuartiles, máximos (368) y mínimos (24). Para fines de representación, los valores de OD obtenidos fueron expresados en números naturales.

Por medio del ensayo de rojo Congo para la producción de biofilm, el 19% (17 cepas) de los *S. aureus* presentaron la formación de “slime”, además otros 6 aislado de *Staphylococcus* spp. y 2 de *Enterococcus* spp. también fueron considerados positivos para la formación de biofilm (cuadro 15). En la figura 14 se muestran las características representativas de las cepas evaluadas.

Cuadro 15. Representación de la producción de “slime” en aislados gram positivos obtenidos de úlceras de pie diabético



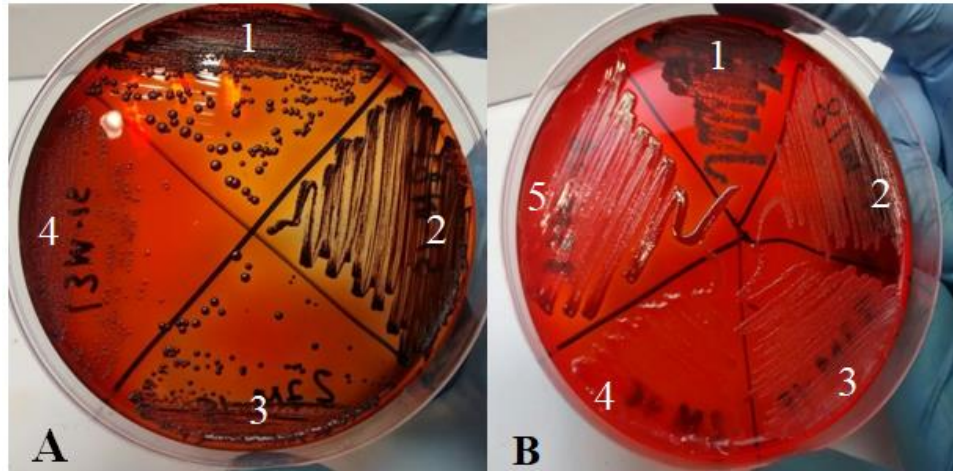


Figura 14. Representación de la producción de “slime” en aislados gram positivos obtenidos de úlceras de pie diabético. Las muestras A1, B1, A2 y A3 fueron positivas para formación de slime. Las muestras A4, B2, B3, B4 y B5 fueron negativas para la producción de “slime” por el método de rojo Congo.

La capacidad de producción de biofilm entre cepas gram positivas se describe como un factor patógeno importante para invadir la superficie del tejido. En nuestro estudio, el 19% y el 15.3% de las cepas de gram positivas totales presentaron formación de biofilm tanto por el ensayo MtP como por las pruebas de CRA. Sin embargo, solo el 2.4% (4 cepas) estuvo de acuerdo entre dos métodos.

Prueba de resistencia inducida a la clindamicina

La búsqueda de resistencia inducida a clindamicina fue realizada en aislados de *S. aureus* ($n = 88$) y CoNS ($n = 35$). De acuerdo con los resultados, 43 cepas (35%) presentaron resistencia natural a la clindamicina, 71 cepas (58%) fueron sensibles a la clindamicina y 9 cepas (7%) presentaron resistencia inducida a la clindamicina. En la figura 15, se describen los diferentes fenotipos encontrados al evaluar la resistencia inducida a clindamicina.

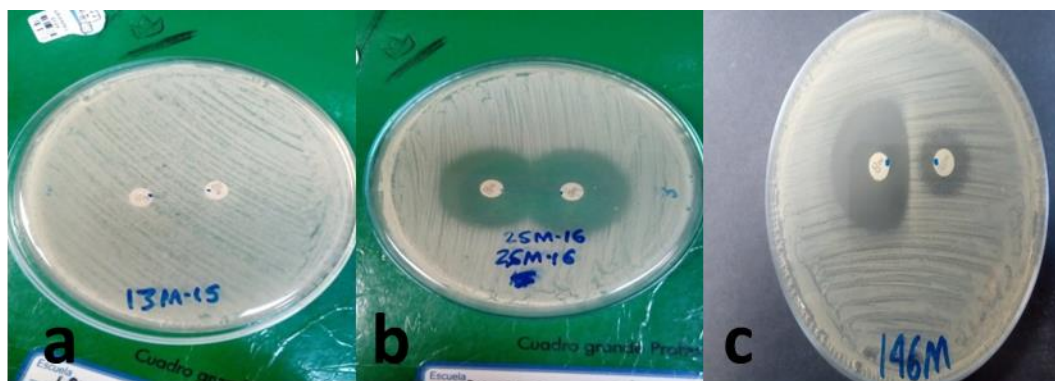


Figura 15. Evaluación de cepas gram positivas para la prueba de resistencia a clindamicina. a) con resistencia natural a la eritromicina y clindamicina, se observa la ausencia de halos alrededor de los sensibilizadores. **b)** con susceptibilidad natural a eritromicina y clindamicina, se observa la presencia de halos para los dos antibióticos; y **c)** con resistencia inducida a la clindamicina. Se observa la aparición de halo en forma de “D” para el antibiótico clindamicina.

Detección de cepas de *Staphylococci* meticilina resistente

A partir de 91 aislados de *S. aureus*, utilizando la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer con disco de cefoxitina se detectaron 21 (23%) cepas que fueron resistentes a FOX, por lo que de acuerdo a los criterios del CLSI 2018 fueron catalogados como MRSA. Para los CoNS que representaron el 21% de las cepas gram positivas aisladas, 8 cepas el 23% fueron también resistentes a la cefoxitina.

Detección de cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia borde a la oxacilina

Se realizó la prueba de detección de cepas BORSA en aislados de *S. aureus* negativos a la amplificación del gen *mecA*. De los 91 *S. aureus* obtenidos de DFUs, 6 cepas (7.3%) presentaron características de posibles fenotipos BORSA, la figura 16 muestra el patrón de inhibición representativo de estas cepas.

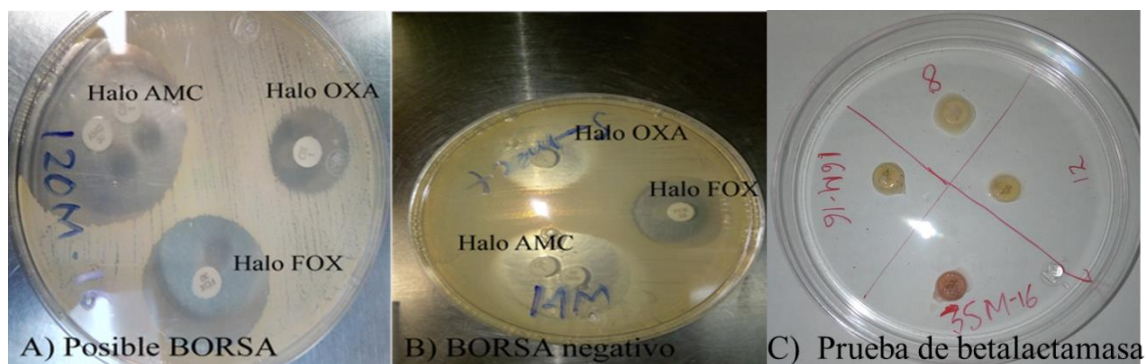


Figura 16. Representación para posible fenotipo BORSA. **A)** muestra la imagen de un aislado de *S. aureus* que fue positivo a la inhibición de betalactamasas por acción del ácido clavulánico (halo AMC-OXA mayor que los demás). **B)** muestra un fenotipo negativo de BORSA ya que no se encuentran diferencias en la inhibición con los discos de OXA, FOX y OXA-AMC. **C)** Prueba de betalactamasa positiva (color rojo) para el aislado 35M-16.

Evaluación del crecimiento de los géneros Staphylococci y Enterococci en agar de vancomicina

Sesenta y cinco cepas de *S. aureus* no mostraron crecimiento en VAS por lo que fueron consideradas como sensibles a la vancomicina y no fueron evaluadas por la técnica MIC. La figura 17 muestra el crecimiento característico de aislados con resistencia a la vancomicina a 6 µg/mL. Para el género Enterococci ($n = 29$), solo 11 aislados (38%) fueron negativos para crecimiento en VAS.

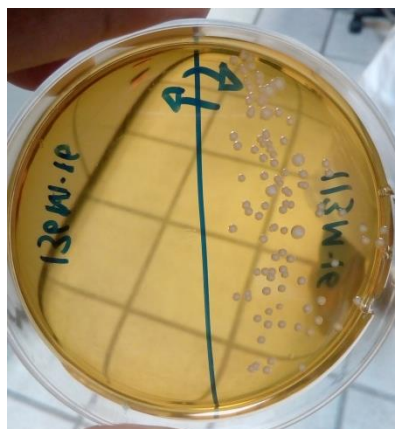


Figura 17. Medio BHI adicionado con vancomicina. Izquierda, aislado sensible a la vancomicina (113 M-16) y a la derecha, presencia de colonias color blanco de un aislado resistente a la vancomicina (136M-16).

Concentración mínima inhibitoria para vancomicina en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.

Para la prueba de la MIC de vancomicina (anexo 4), se evaluaron 54 aislados gram positivos, 18% de los *S. aureus* susceptibles a meticilina mostraron resistencia a vancomicina a una concentración de 16 µg/mL, adicionalmente la presencia de MRSA estuvo asociada a la presencia de resistencia a vancomicina, ($p = 0.04$). El cuadro 16 resume los niveles de resistencia a vancomicina, encontrados en cocos gram positivos utilizando la técnica de MIC.

Cuadro 16. Valores de resistencia a antibióticos obtenidos para especies de cocos gram positivos por medio de la técnica de MIC utilizando vancomicina a diferentes concentraciones

Aislados	Vancomicina MIC, µg/MI		
---	< 2	4 - 8	≥ 16
<i>S. aureus</i> (72)	56	3	13
MRSA (16)	7	2	7
---	< 4	8 - 16	≥ 32
<i>Enterococcus</i> spp. (29)	23	0	6

8.4 Métodos moleculares

Extracción de DNA genómico de cepas gram positivas obtenidas por cultivo de úlceras de pie diabético

Se obtuvo el DNA genómico de cada uno de los aislados gram positivos evaluados en este estudio. La calidad y cantidad de DNA fue evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa 1% (figura 18). Cada alícuota se estandarizó a 50-100 ng/mL para fines de procedimiento de PCR.

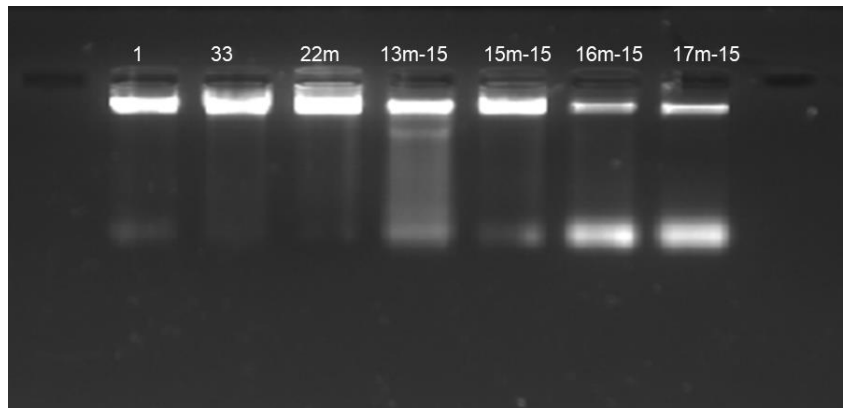


Figura 18. Extracción de DNA genómico de cepas gram positivas obtenidas de úlceras de pie diabético. En los carriles del 1 al 17m-15 se observa la extracción de DNA de cepas procedentes de cultivo de DFUs. No se incluyó un marcador de peso molecular ya que solo se requería comprobar tamaño del material de interés.

Detección del gen *mecA*

Un total de 91 cepas de *S. aureus* y 35 cepas de *Staphylococcus* spp. fueron evaluadas para la identificación del gen *mecA*, 24 (26%) y 7 (20%) de los aislados respectivamente resultaron ser positivos al presentar un amplicón de 162 pb. La figura 19 muestra la representación de la amplificación en agarosa al 1.5%.

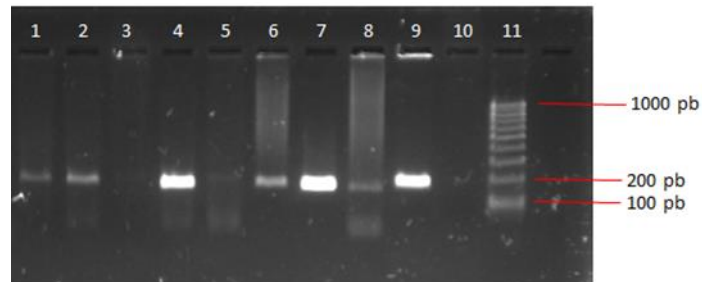


Figura 19. Visualización para la amplificación del gen *mecA* (162pb), a partir de aislados obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Carriles 1, 2, 4, 6-8 aislados con presencia de *mecA*. Carriles 3 y 5 aislados sin presencia de *mecA*; Carril 9 control positivo de amplificación (*S. aureus* ATCC 43300); Carril 10: control negativo de amplificación (agua); Carril 11: Marcador 100 pb Promega. Agarosa 1.5%, 95 V por 55 min. Tinción con 2 μ L de SYBR Green.

Detección del gen *vanA*

Un total de 91 cepas de *S. aureus* y 32 cepas de *Enterococcus* spp. fueron evaluadas para la detección del gen *vanA* utilizando 2 pares de iniciadores previamente reportados (Clark *et al.*, 1993; Dutka *et al.*, 1995). En ninguna de las 123 cepas ensayadas se encontró amplificación para el gen *vanA*. Pero es importante mencionar que dos aislados de género *Staphylococci* presentaron amplicón de 1,000 pb ambos con subproductos inespecíficos de 600 pb aproximadamente; sin embargo, no fueron tomados en cuenta como positivos (figura 20), por el hecho de que no amplificaron en una segunda ronda de verificación y fueron negativos para la amplificación con el segundo set de iniciadores (figura 21).

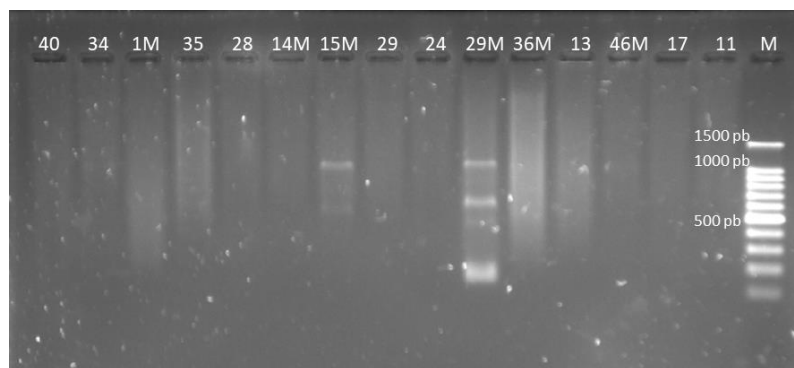


Figura 20. Visualización para la prueba de detección del gen *vanA* (1,030 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (40-17) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb ladder plus promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts por 60 min.

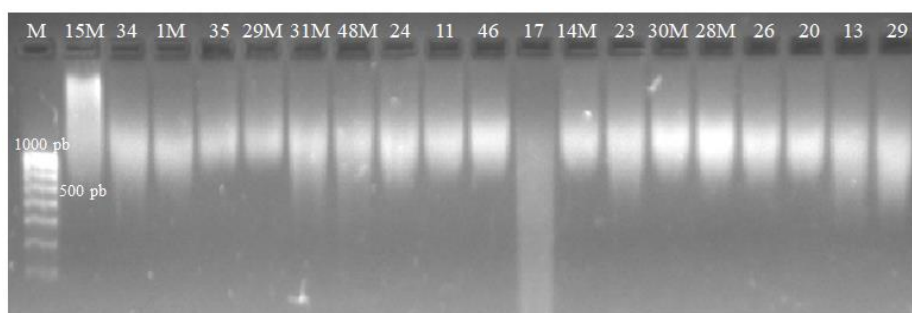


Figura 21. Visualización para la prueba de detección del gen *vanA* (732 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (15M-29) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb ladder promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts por 60 min.

Detección del gen *vanB*

Un total de 91 cepas de *S. aureus*, 35 de *Staphylococcus* spp. y 32 cepas de *Enterococcus* spp. fueron evaluadas para la detección del gen *vanB* utilizando iniciadores previamente reportados por Clark *et al.*, 1993. Seis cepas de *Enterococcus* spp. fueron positivas para la amplificación del gen *vanB*; para el género *Staphylococci* el gen *vanB* estuvo presente en 10 aislados. la figura 22 muestra el patrón representativo encontrado en la amplificación de este gen.

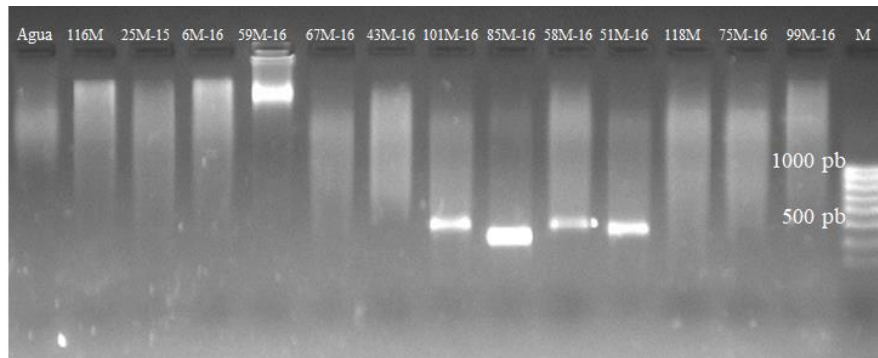


Figura 22. Visualización para la prueba de detección del gen *vanB* (433 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (116M-99M-16) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Agua: control negativo de amplificación. M: Marcador de 100 pb ladder promega 1 μ L + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts X 60 min.

Detección del gen *vanC*

Un total de 91 cepas de *S. aureus*, 35 de *Staphylococcus* spp. y 32 cepas de *Enterococcus* spp. fueron evaluadas para la detección del gen *vanC* utilizando iniciadores previamente reportados Clark *et al.*, 1993. De las 163 cepas evaluadas, 7 aislados de *Enterococcus* spp. fueron positivos para la amplificación del gen *vanC*. La figura 23 muestra el patrón representativo encontrado en la amplificación del gen *vanC*.

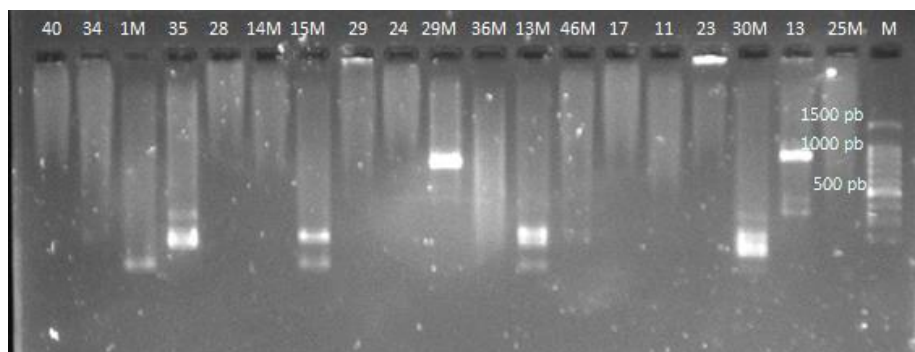


Figura 23. Visualización para la prueba de detección del gen *vanC* (796 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (40-25M) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb plus Ladder Promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts X 60 min.

Detección de gen *vanH*

Un total de 91 cepas de *S. aureus*, 35 de *Staphylococcus* spp. y 32 cepas de *Enterococcus* spp. fueron evaluadas para la detección del gen *vanH* utilizando iniciadores previamente reportados. De las 163 cepas evaluadas, *vanH* estuvo presente en 3 cepas de *S. aureus*, mientras que 7 cepas de *Enterococcus* spp. también presentaron amplificación de 503 pb (figura 24).

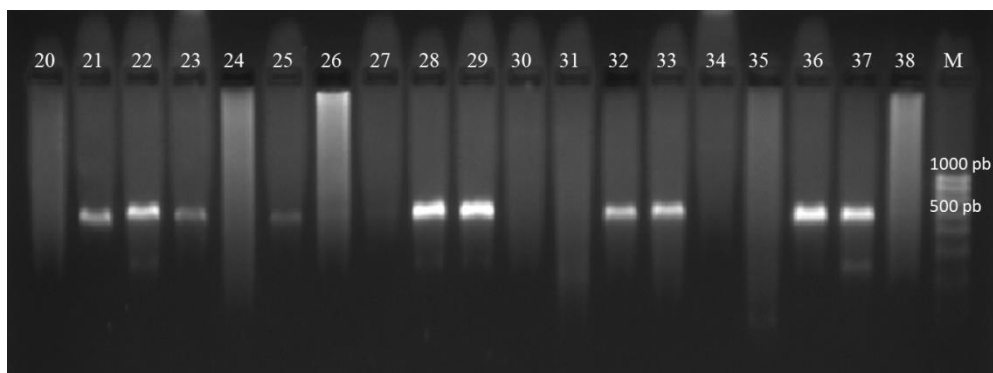


Figura 24. Visualización para la prueba de detección del gen *vanH* (503 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (20-38) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb Ladder Promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts X 60 min.

Detección del gen *icaA*

Un total de 163 cepas de aislados gram positivos fueron evaluados para identificar la presencia de genes relacionados con la producción de biofilm; 91 cepas de *S. aureus*, 35 de *Staphylococcus* spp. y 32 cepas de *Enterococcus* spp., después del análisis se determinó que 33 cepas de *S. aureus* fueron positivas para la amplificación de 1,315 pb. Solo se obtuvieron 6 aislados positivos para *Staphylococcus* spp. y 8 cepas de *Enterococcus* spp. que también resultaron positivas para la amplificación del gen, la figura 25, muestra el patrón representativo de amplificación del gen *icaA*.

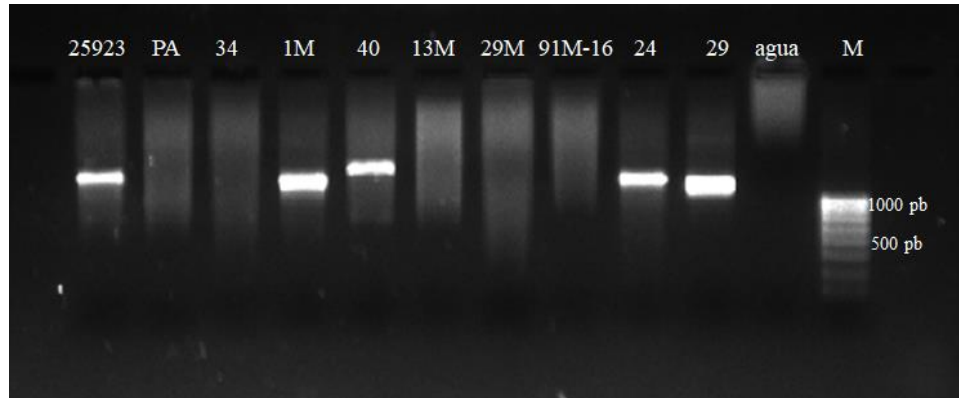


Figura 25. Visualización para la prueba de detección del gen *icaA* (1,315 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (25923-29) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Agua: control negativo de amplificación. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb Ladder Promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts X 60 min.

Detección de gen *lukSF*

La detección por PCR punto final del gen *lukSF* fue detectado en 10 (11%) cepas de *S. aureus* y en una cepa (3%) de CoNS (figura 26).

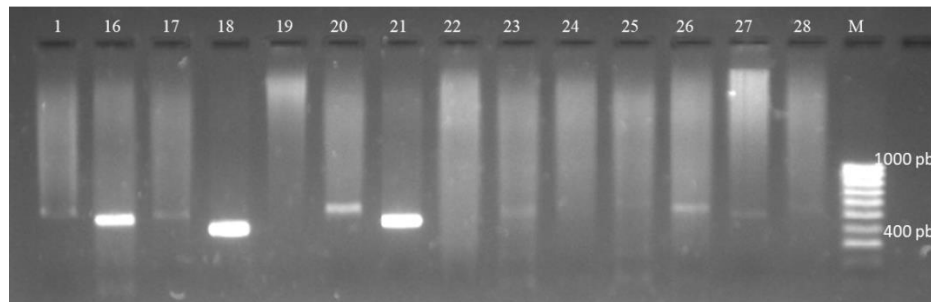


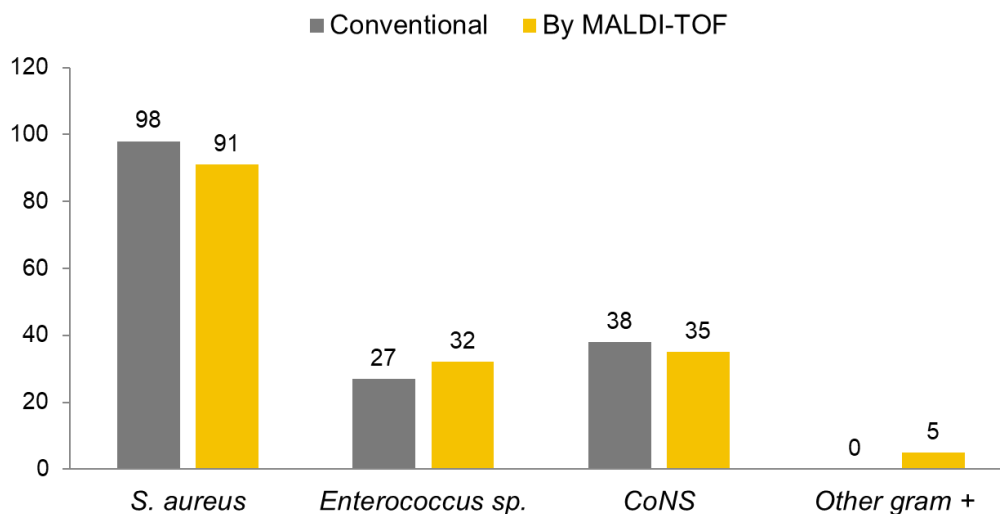
Figura 26. Visualización para la prueba de detección del gen *lukSF* (433 pb) a partir de DNA de aislados gram positivos obtenidos por cultivo de úlceras de pie diabético. Muestras: (1-28) 7 μ L de producto de PCR + 2 μ L de SYBR Green. Marcador: 1 μ L de Marcador 100 pb Ladder Promega + 2 μ L de SYBR Green. Agarosa 1.5%, 90 volts X 60 min.

8.5 Métodos instrumentales (espectrometría de masas)

Análisis por MALDI-TOF

Las 163 cepas gram positivas fueron evaluadas por medio de espectrometría de masas (Vitek MS), el resultado dado por esta técnica instrumental fue tomado como legítimo, aun cuando por medio de la prueba bioquímica difería. En general 8 de cada 10 cepas evaluadas por los dos métodos concordaron entre sí (cuadro 17). En el anexo 4 se muestran los espectros representativos para cada uno de los géneros obtenidos.

Cuadro 17. Representación de las cepas obtenidas por métodos convencionales y por espectrometría de masas



8.6 Métodos inmunohistoquímicos

Inclusión de muestras en parafina

De las 277 muestras de tejido, 159 tejidos fueron inviábiles para los métodos histológicos debido a que en el transcurso en que fueron preservadas (2012-2015) aún no se tenía definido el estudio por inmunohistoquímica, y los tejidos solo fueron guardados a -80°C . Así, solo 119 muestras fueron viables para la tinción de hematoxilina-eosina; y de estas solo 28 presentaron extenso infiltrado inflamatorio, cantidad y tamaño viable para la detección de células y citocinas por la prueba de inmunohistoquímica. Las principales características se indican a continuación en el cuadro 18.

Cuadro 18. Clasificación de las muestras de tejido de pie diabético por su viabilidad para la técnica de inmunohistoquímica

Grado Wagner	Muestras	Viables para inmunohistoquímica	No viables para inmunohistoquímica
1	5	0	5
2	52	11	41
3	47	8	35
4	11	7	4
5	4	2	2

Tinción de Hematoxilina-eosina

Como parte de un análisis previo al ensayo inmunohistoquímico, se observó el grado de destrucción tisular por medio de una tinción de hematoxilina-eosina. En concordancia con los grados Wagner y la evolución natural de la enfermedad, las muestras con poco tiempo de evolución presentaron escasos signos de daño o reclutamiento de componentes de sistema inmune. Sin embargo, las muestras de los grados con mayor progresión de la enfermedad (grados Wagner 3, 4 y 5) presentaron amplia destrucción celular, necrosis, reclutamiento de células de sistema inmune, localización de alta carga bacteriana, (cocos gram positivos) y procesos de fibrosis agudos. A continuación, se muestran los procesos característicos observados en tejidos de DFUs (figuras 27 y 28), adicionalmente se muestra la fotografía de material donado y utilizado como tejido de comparación (figura 29).

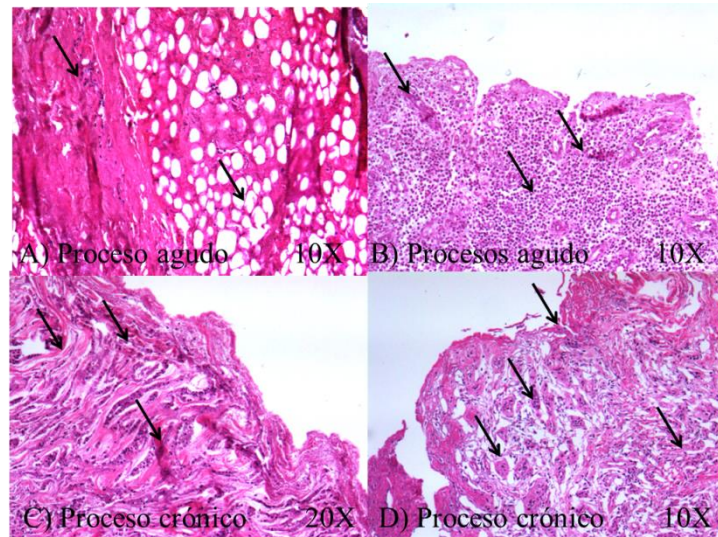


Figura 27. Tinción de hematoxilina-eosina para tejidos con procesos agudos y crónicos de DFUs. **A)** muestra escasas células inflamatorias en tejido subcutáneo y adiposo a 10X. **B)** muestra amplio infiltrado celular, de proceso agudo activo. **C)** muestra un estado crónico de la herida con necrosis en partes periféricas, presencia de infiltrado celular abundante y desarrollo de fibrosis. **D)** muestra el estado crónico de una herida caracterizado por necrosis con amplia destrucción tisular y extenso infiltrado inflamatorio.

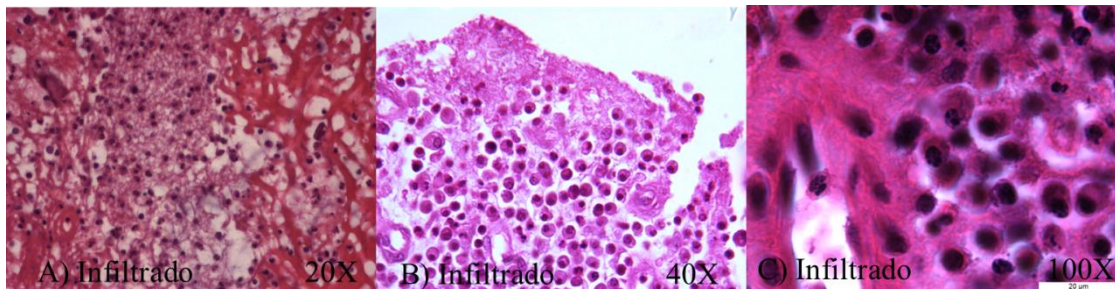


Figura 28. Tinción de HE para tejidos con diferentes niveles de infiltrado celular. **A)** se muestra tejido con abundante presencia de células PMN, muestra perteneciente a una herida en proceso agudo. **B)** muestra tejido con abundantes linfocitos y neutrófilos. **C)** muestra tejido de DFU con presencia de neutrófilos.

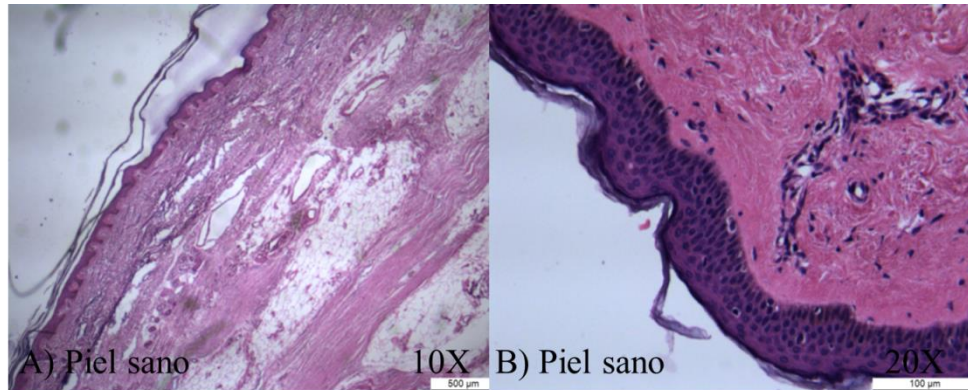


Figura 29. Microfotografía de piel de sujeto sano a 10X (A) y 20X (B). En la cual se puede observar la ausencia de signos patológicos de enfermedad, nulo infiltrado celular y capas de la piel bien delimitadas.

Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor para las 119 muestras de tejido de pie diabético utilizando un micrótopo convencional. Sin embargo, solo 28 muestras resultaron ser viables para la técnica de inmunohistoquímica debido a su extenso infiltrado celular. El resto de las muestras no aptas para inmunohistoquímica se describen a continuación (figura 30).

1. Muestras no aptas debido a la presencia de autólisis (45)
2. Muestras con escaso o nulo infiltrado celular (18)
3. Muestra con abundante presencia de colágeno y fibroblastos (15)
4. Otros factores (13)

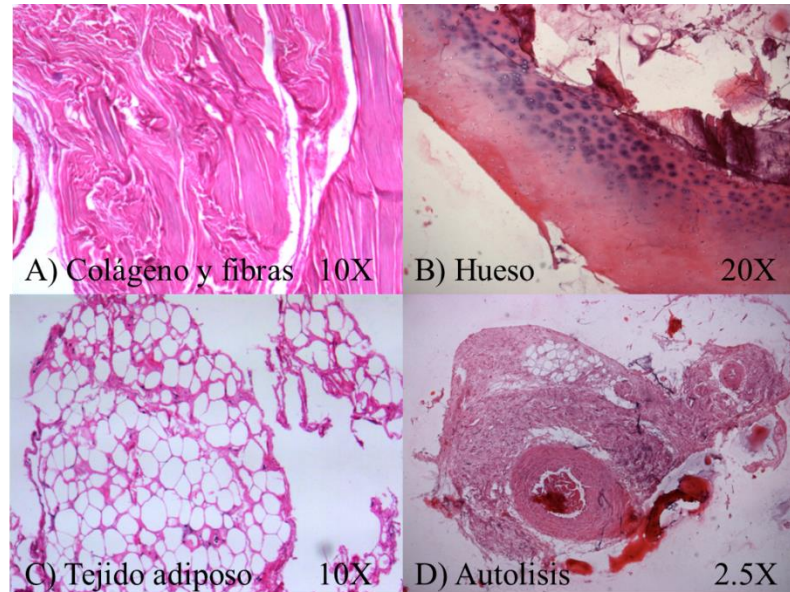


Figura 30. Tipo de tejidos que resultaron inviables para la técnica de inmunohistoquímica. **A)** tejido con amplias zonas de colágeno y tejido fibroso sin infiltrado celular. **B)** muestra de tejido con hueso, este tipo de tejido fue inviable debido a la dureza del material, 10 muestras presentaron presencia de hueso, en la imagen se puede observar osteogénesis, lo cual establece una herida crónica en proceso de cicatrización. **C)** Presencia de restos de tejido graso de biopsias de pie diabético. Las áreas interiores sin material celular pertenecieron al área ocupada por adipocitos que fueron disueltos por el xilol. **D)** tejido con presencia de autólisis y áreas con paniculitis.

Inmunohistoquímica específica de mediadores celulares

Se realizó la inmunohistoquímica (ensayos de inmunoperoxidasa) de 28 biopsias previamente seleccionadas que presentaron infiltrado celular suficiente para la prueba de IHC, en el cuadro 19 se describen las características de las muestras evaluadas.

Cuadro 19. Relación de número de biopsias para IHC en comparación con el grado Wagner que presentaron

Grados Wagner	Número de biopsias
1	0
2	11
3	8
4	7
5	2

Para los mediadores inmunológicos, se realizaron cortes histológicos de 2 μm de grosor y fueron montados en portaobjetos cargados (*Kling-On HIER*), posterior a las pruebas con los anticuerpos antes mencionados y revisando las áreas que presentaron patología en tejido subcutáneo (infiltrado celular, necrosis, formación de vasos sanguíneos, etc.) se encontró que las muestras con mayor grado de inflamación presentaron baja expresión de IL-4 y p53 en comparación con los controles de piel sana (figura 31 y 32). En el caso particular de IL-1 de las 17 muestras evaluadas, 8 presentaron ausencia de expresión, con un marcaje difuso de células (figura 33A-33C), el resto de las muestras presentaron amplia expresión para IL-1 (figura 33D-33F).

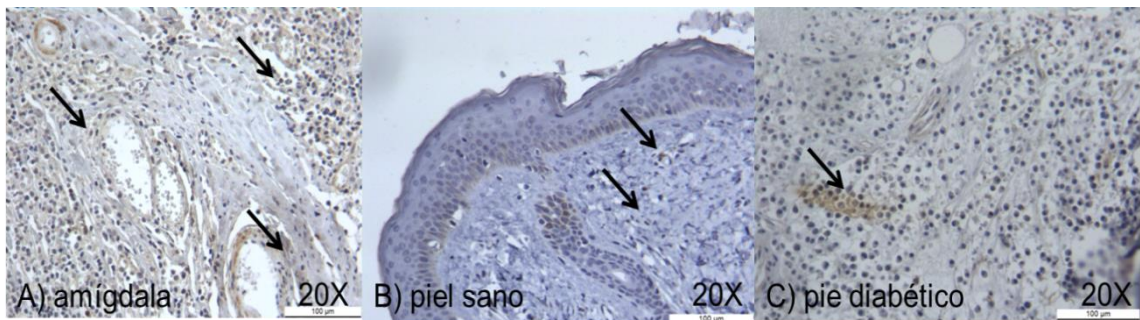


Figura 31. Inmunohistoquímica para IL-4. **A)** tejido de amígdala de humano, donde se puede observar la expresión de esta citocina en condiciones normales (tejido linfático y control externo). **B)** tejido de piel de sujeto sano, donde se observa una expresión baja de IL-4, y **C)** tejido de biopsia de pie diabético, donde se puede observar escasa tinción de células.

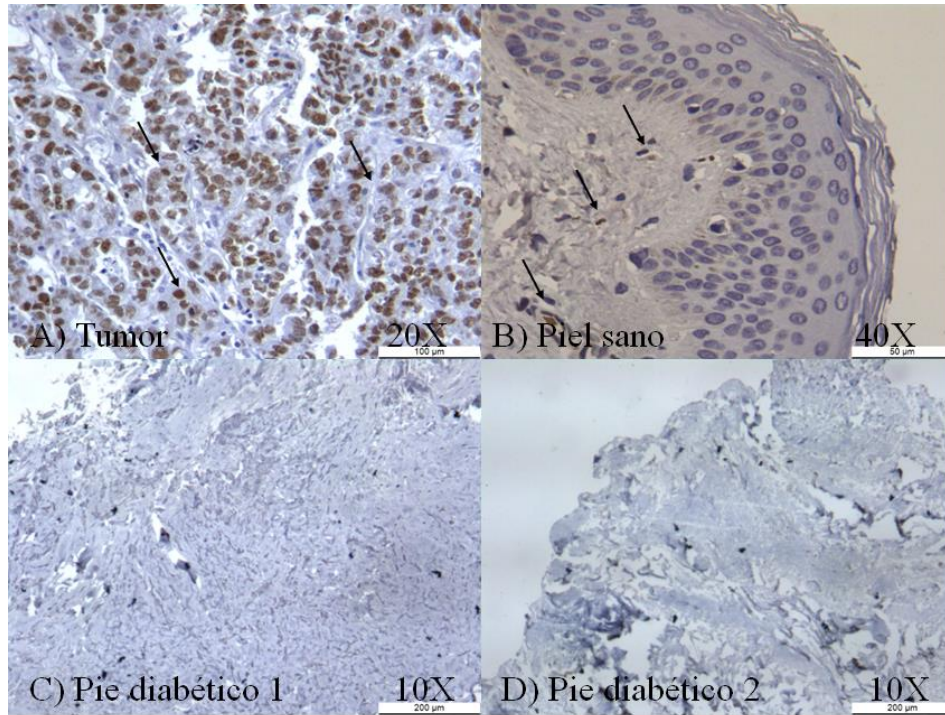


Figura 32. Inmunohistoquímica para la proteína p53. **A)** muestra la imagen de un tejido control de p53 en este caso un corte de tejido de un tumor. **B)** muestra la imagen de un tejido de piel sano, en la cual se observa una actividad base de esta proteína. **C y D)** muestran una ausencia de marcaje para p53 en muestras de DFUs.

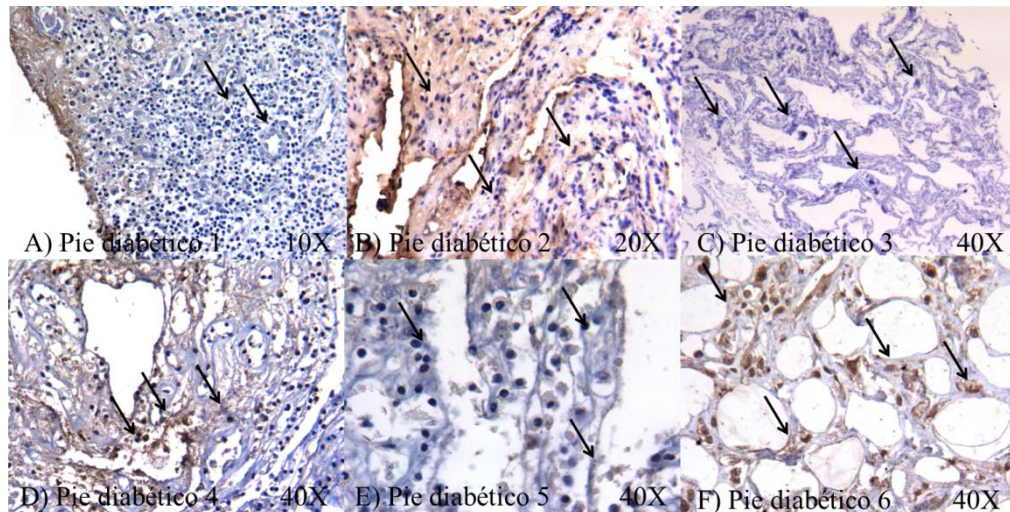


Figura 33. Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-IL1, en tejidos de biopsias de pie diabético, 40X. Imágenes A-C muestran expresión difusa de células, además de un marcaje inespecífico de fondo en los bordes del tejido. **D-F)** muestra la expresión leve-moderada de IL-1 en tejido de DFU.

Por otra parte, al evaluar los tejidos de DFUs por medio de IHC, no se observaron diferencias en la intensidad de marcaje al comparar los tejidos de pie diabético con el control de piel sano, para la expresión de proteínas como el FGF-5, (figura 34), factor H (figura 35) y TGF- β 3 (figura 36), que se muestran a continuación.

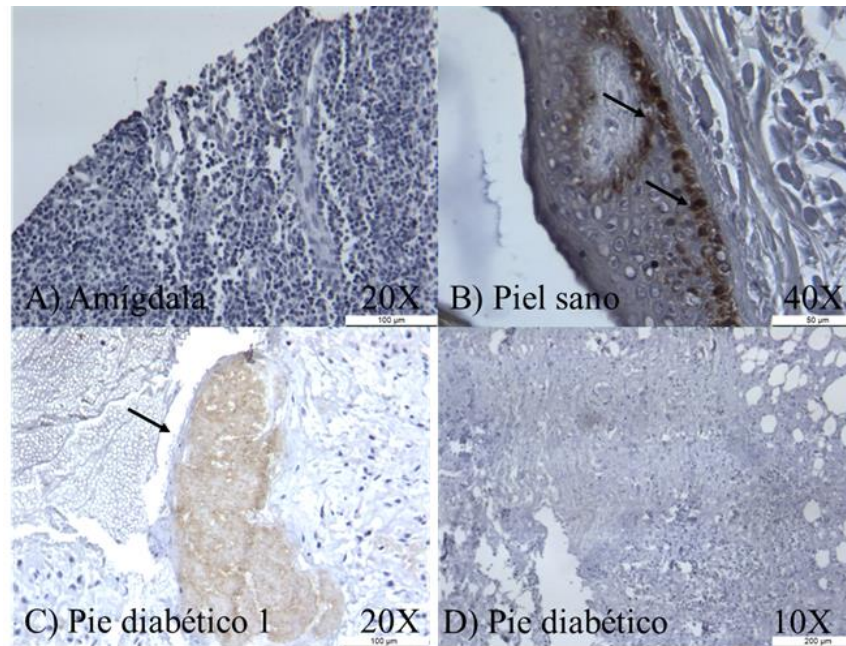


Figura 34. Inmunohistoquímica para FGF-5. **A)** tejido de amígdala de humano, donde se puede observar nula expresión de esta citocina en condiciones normales debido a que este agente (FGF-5) es específico de fibroblastos del tejido conectivo. (Tejido linfático y control externo). **B)** tejido de piel de sujeto sano, donde se observar células basales pigmentadas **C y D)** tejidos de DFUs, donde se puede observar nula expresión FGF-5 en células de tejido subcutáneo.

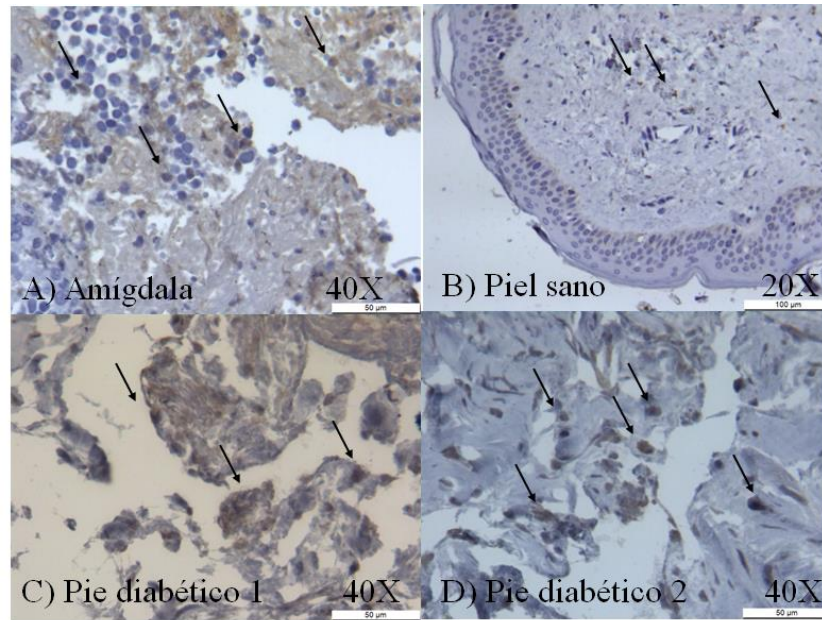


Figura 35. Inmunohistoquímica para factor H. A) IHC para tejido de amígdala, donde se puede observar marcaje moderado para esta proteína. B) tejido de sujeto sano, se puede observar un marcaje leve en tejido subcutáneo. C y D) muestran diferentes tejidos de pie diabético con leve expresión en tejido subcutáneo del factor H.

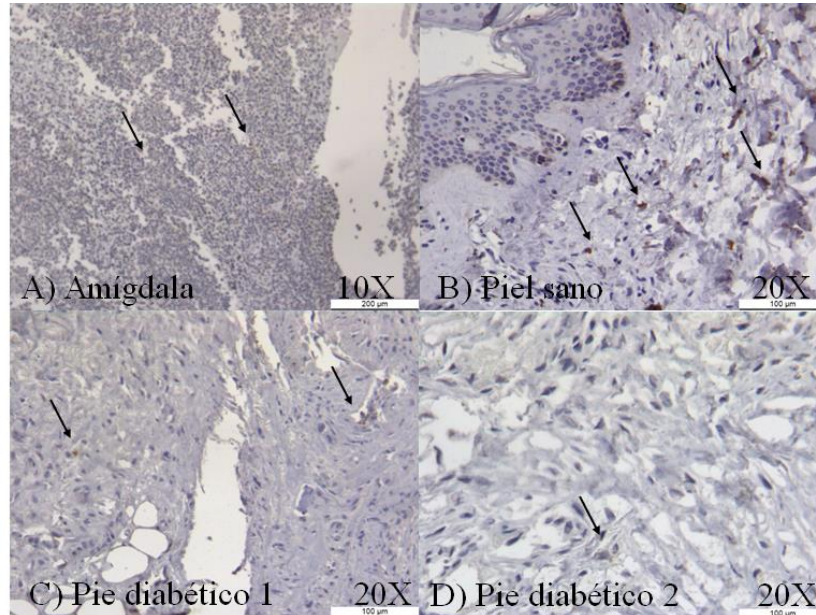


Figura 36. Inmunohistoquímica para TGF-β3. A) muestra la expresión basal para TGF-β3 en tejido de amígdala de humano. B) muestra la expresión de TGF-β3 en un tejido de piel de sujeto sano, donde se puede observar la producción de este factor de crecimiento por células del sistema inmune en tejido subcutáneo. C y D) muestran una escasa de expresión de TGF-β3 en tejido de pie diabético.

Los tejidos de pie diabético evaluados mostraron alta expresión para IL-10 (figura 37), KAI1 (figura 38), MMP-2 (figura 39), IFN- γ (figura 40), y TNF- α (figura 41); en comparación con el tejido control de piel sana; la proteína caspasa-3 presentó una expresión difusa en los dos tipos de tejidos evaluados (figura 42), (sano vs diabético).

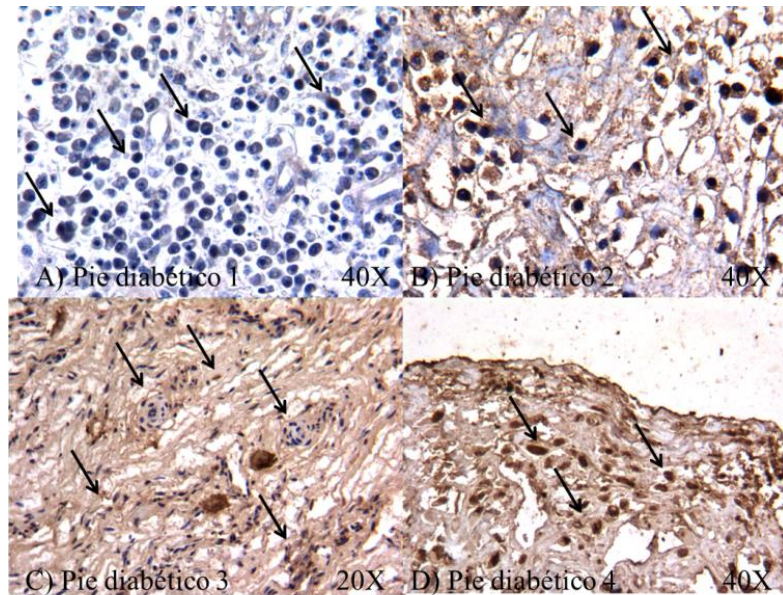


Figura 37. Inmunohistoquímica para interleucina 10. A) muestra expresión abundante de IL-10 en células del sistema inmune, sin marcaje inespecífico. B-D) muestra abundante expresión de IL-10 en tejido subcutáneo de DFU; los tejidos de estas imágenes mostraron marcaje inespecífico de fondo, pero diferenciable.

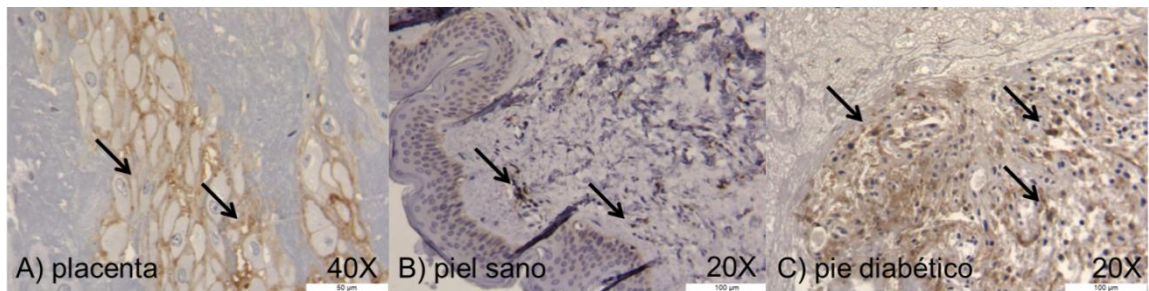


Figura 38. Inmunohistoquímica para la proteína KAI1. A) tejido de placenta de humano, donde se puede observar la expresión de esta citocina en condiciones normales (tejido linfático y control externo). B) tejido de piel de sujeto sano, donde se observa una expresión baja de macrófagos en tejido conectivo, y C) tejido de biopsia de pie diabético, donde se puede observar abundante expresión de macrófagos en tejido subcutáneo.

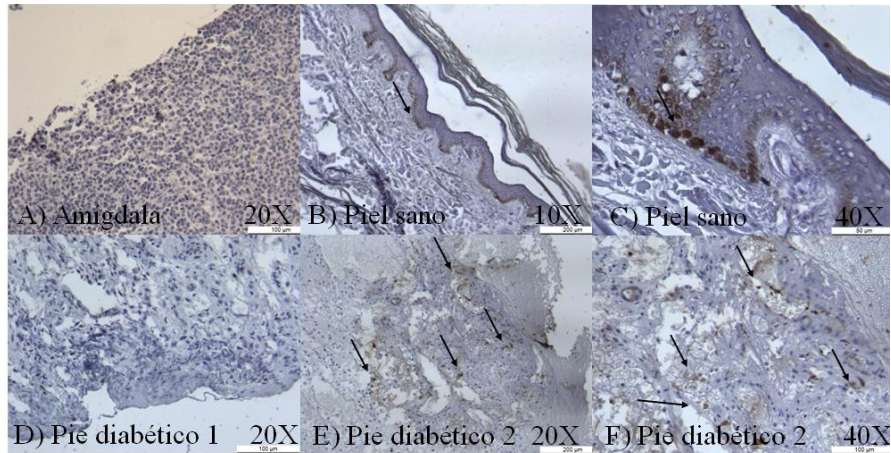


Figura 39. Inmunohistoquímica para MMP-2. A) muestra la expresión normal de la proteína en tejido de amígdala. B y C) muestran la expresión en la membrana basal de MMP-2 en tejido de piel sano a diferentes aumentos. D) muestra un tejido de pie diabético sin expresión de MMP-2. E y F) muestran un tejido de pie diabético a diferentes aumentos con expresión en tejido subcutáneo de MMP-2.

Para el marcaje de TNF- α y IFN- γ se observó alta afinidad para la mayoría de las muestras que poseían infiltrado celular, también se observó el marcaje de fondo, pero en esta ocasión no hubo problema al diferenciarlo de la expresión por células.

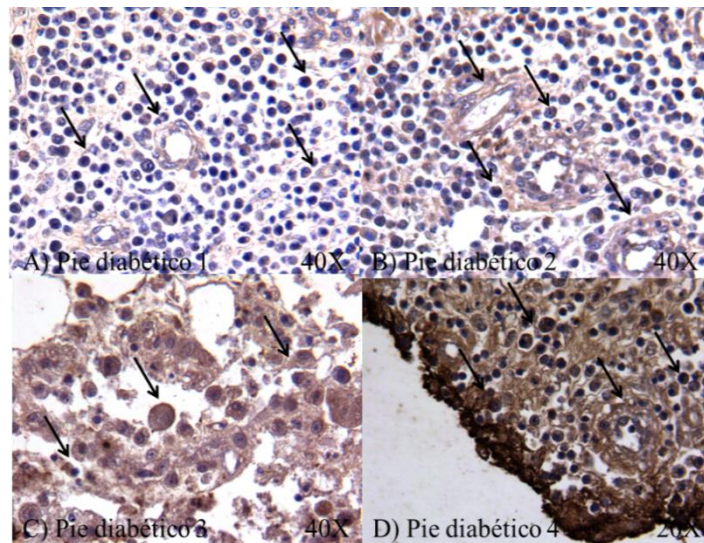


Figura 40. Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti IFN- γ , en tejidos de biopsias de pie diabético, 40X. Las flechas en negro indican la presencia de células que resultaron positivas para el marcaje de IFN- γ . Se observa además la presencia de linfocitos, así como estructuras pertenecientes a células plasmocitoides las cuales tienen la capacidad de producir diferentes tipos de interferón.

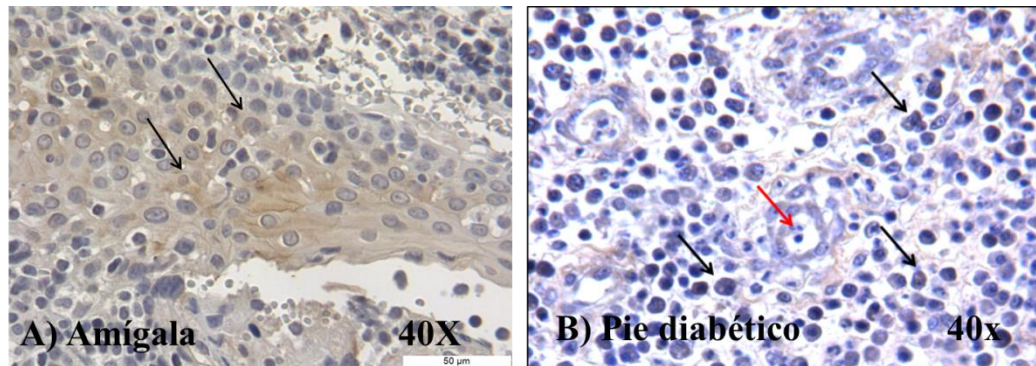


Figura 41. Marcaje por inmunohistoquímica con anticuerpos anti TNF- α . A) Tejido de amígdala. B) tejidos de biopsia de pie diabético, las flechas en color negro indican la presencia de células que resultaron positivas para el marcaje de TNF- α . En rojo la formación de nuevos vasos sanguíneos lo que indicaría que existe una actividad inmunitaria latente.

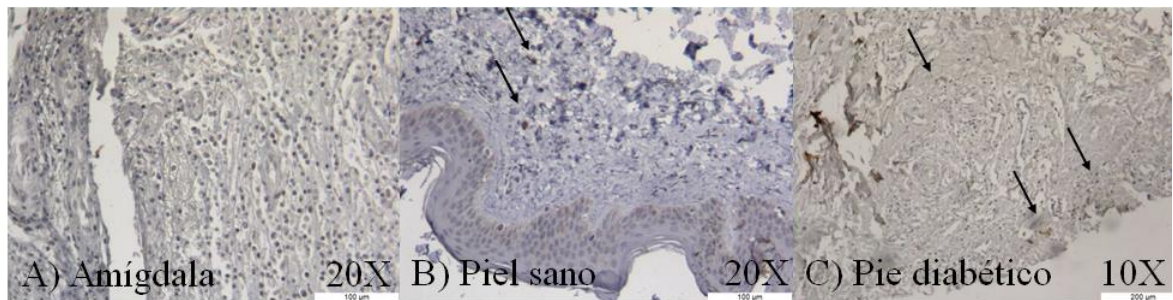


Figura 42. Inmunohistoquímica para caspasa-3. A) muestra tejido de amígdala con expresión normal para caspasa-3. B) muestra la expresión leve en área subcutánea de caspasa-3 en tejido de piel sano. C) muestra la expresión difusa de caspasa-3 en tejido de DFU.

Inmunohistoquímica específica de linajes celulares

Para los linajes celulares evaluados, se realizaron cortes histológicos de 2 μm de grosor y fueron montados en portaobjetos cargados (*Kling-On HIER*), posterior a las pruebas con los anticuerpos antes mencionados y revisando las áreas que presentaron patología en tejido subcutáneo (infiltrado celular, necrosis, formación de vasos sanguíneos, etc.) se encontró que las muestras con mayor grado de inflamación presentaron amplia expresión de macrófagos (figura 43) y células plasmáticas (figura 44). En cuanto a los linfocitos T, el linaje celular CD4^+ (figura 45), presentó mayor expresión que la contraparte de linfocitos T CD8^+ (figura 46). Finalmente, no se observó expresión para células B en ninguno de los tejidos evaluados (figura 47).

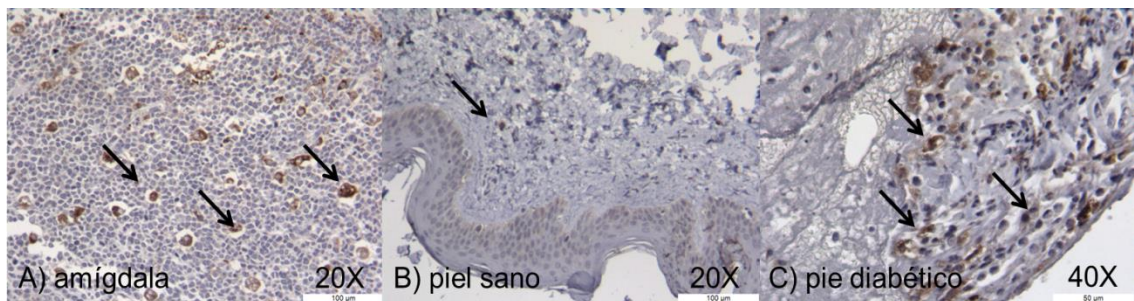


Figura 43. Inmunohistoquímica para macrófagos. **A)** tejido de amígdala de humano, donde se puede observar la expresión de esta citocina en condiciones normales (tejido linfático y control externo). **B)** tejido de piel de sujeto sano, donde se observa una expresión baja de macrófagos en tejido conectivo, y **C)** tejido de biopsia de pie diabético, donde se puede observar abundante expresión de macrófagos.

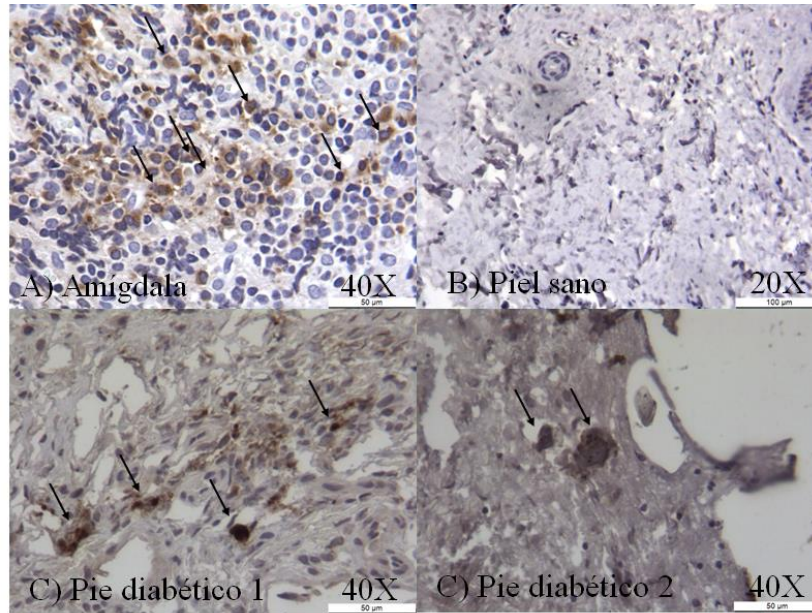


Figura 44. Inmunohistoquímica para marcaje de células plasmáticas. A) tejido de amígdala con expresión basal de células plasmáticas. B) tejido de piel sano con nulo marcaje para células plasmáticas en tejido subcutáneo. C y D) muestran la expresión encontrada en diferentes tejidos de pie diabético evaluados.

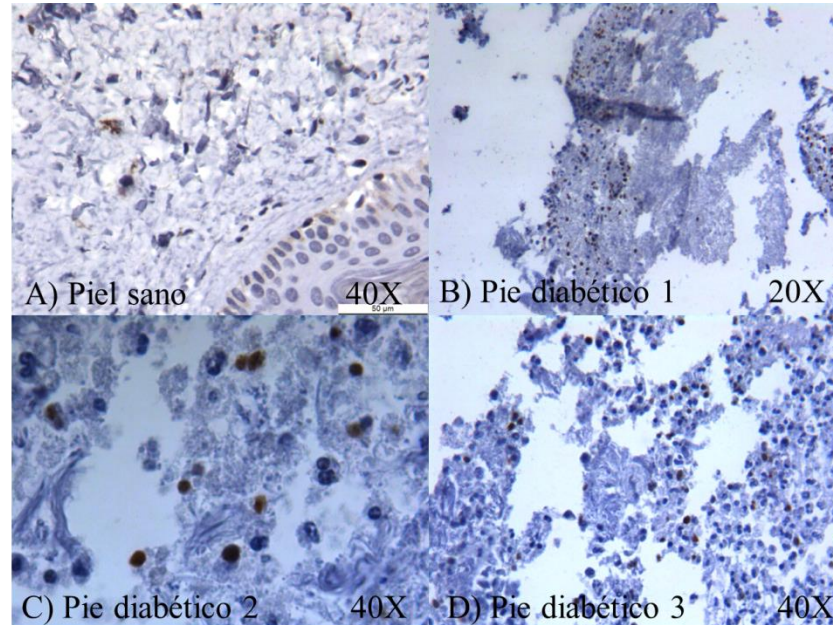


Figura 45. Inmunohistoquímica para linfocitos T CD4⁺. A) muestra la expresión basal de linfocitos T CD4⁺ en tejido de piel sana. B-D) muestra la una expresión leve-moderada para T CD4⁺ en diferentes tejidos de DFU en comparación con la respuesta encontrada en tejido sano.

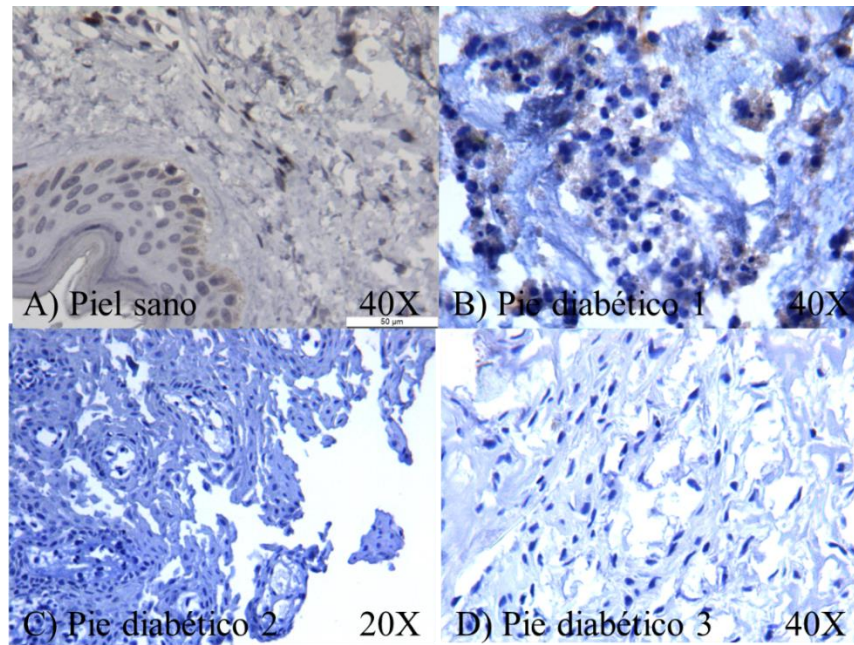


Figura 46. Inmunohistoquímica para linfocitos T CD8⁺. A) muestra la expresión basal encontrada para linfocitos T CD8⁺ en tejido sano. B-D) muestra una nula y difusa expresión del linaje CD8⁺ en muestras de tejido de DFUs.

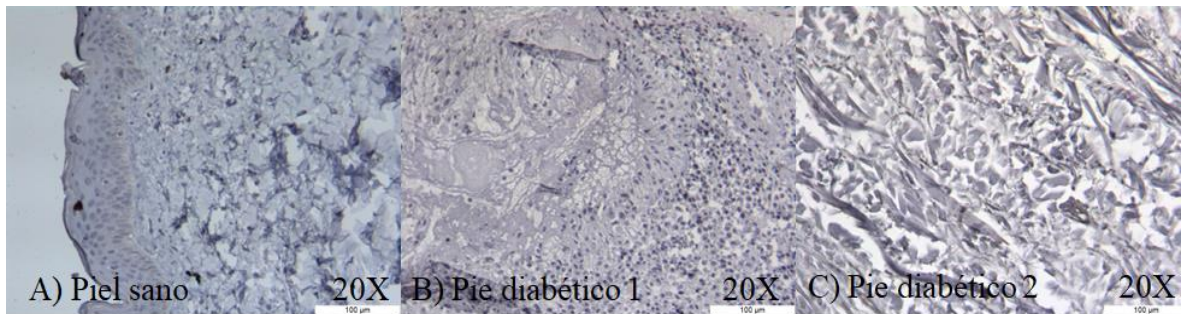


Figura 47. Inmunohistoquímica para linfocitos B. A) muestra la expresión de células B encontrada en tejido de piel sana. B y C) muestran una nula expresión de células B en tejido procedente de DFUs.

Las muestras de grados Wagner 2 y 3 ($n = 19$) presentaron moderada y definida expresión de agentes anti-inflamatorios como la IL-1 e IL-10. Sin embargo, las muestras de mayor evolución en la escala Wagner fueron identificadas por amplia expresión de proteínas como TNF- α e IFN- γ pero también por marcaje de fondo debido a la presencia de fibrosis y necrosis. Debido al bajo número de muestras evaluadas, no se encontró relación alguna para la asociación entre microorganismos específicos y la expresión de

mediadores específicos, sin embargo, se observó que las muestras evaluadas por HE e IHC con mayor infiltrado inflamatorio fueron las que presentaron mayores tasas de resistencia a antibióticos con rangos de 7 a 12 antibióticos de 14 para cepas gram positivas, y de 7 antibióticos de 12 para cepas gram negativas.

Adicionalmente, los tejidos utilizados fueron divididos en 4 tipos diferentes de material, como se muestra en el cuadro 20. Las muestras obtenidas de hueso fueron las que presentaron menor intensidad de marcaje (tinción) para las diferentes interleucinas evaluadas. IL-10, junto con IL-1 mostraron señales de marcaje intenso cuando fueron evaluadas en músculo y tendón. El TGF- β 3 una citocina implicada en el desarrollo de fibrosis y reclutamiento celular fue encontrado como mayor expresión en muestras de tendón y fascia. El IFN- γ una citocina producida por linfocitos y células “*natural killer*” también se encontró con amplio marcaje, a pesar de que dos muestras resultaron negativas para dicha interleucina. La extensa señal de marcaje de linfocitos CD4⁺ estuvo con mayor presencia en muestras de músculo y tendón.

Cuadro 20. Resultado del marcaje con anticuerpos utilizados para técnica de inmunohistoquímica en relación al tejido utilizado

Proteína	Músculo	Absceso profundo	Tendón-fascia	Hueso
IL-1	+,+,+,+,+,-,+,-,-	++,,-	-,+,++	-,+,-
IL-4	-,-,+,+,+,+,+,+,+	+	+,+	na
IL-10	++,+,+,-,+	++,++	-,+,++	-,+,-
TGF- β 3	+,+,+	+	+,+	na
Factor H	-,+	na	-,+,+,+	na
IFN- γ	+,+,+,+,+,+,+,+	++,++	-,+,++	+,+,-
TNF- α	+,+,+++	+	-,+,++	+,+,-
p53	-,+,-	-,-,+	-,-,-	na
Caspasa-3	++,+,-,-	+,+	na	na
MMP-2	+++,,+,+,+	++,++	+,,-,-	na
FGF-5	-,-,-,-,+,-,-	-,-,-,-	-,-,-	na
KAI1	++,+,+,+,+,+,+	+++,,+,+,+,+	++,+,+,-	na
Macrófagos	++,+,+,+	+,+	+	na
Plasmáticas	+++,,+,+,+,+,+,+	++,+,+,+,+,+	++	na
Células B	-,-,-,-,-,-,-	na	na	na
CD4 ⁺	++,+,+,-,+,,+	+,+,+,-	+++,,+,+	-
CD8 ⁺	+,+,-,+,,+	++,+,+,-	+++,,+,+	-

(+) Marcaje escaso, (++) marcaje moderado, (+++) marcaje abundante, (-) ausencia de marcaje, (na) no evaluado.

En base en el registro médico de los pacientes, y a las órdenes enviadas para el procesamiento de la muestra, se pudo obtener el resultado final de la lesión de los pacientes incluidos en este estudio (cuadro 21).

Cuadro 21. Resultado del abordaje y tratamiento de úlceras de pie diabético

Resultados	%
Cicatrización	35
Úlcera recurrete	28
Amputación	37

De los pacientes incluidos en este estudio, se obtuvieron 44 registros de amputación (37%); a continuación se resume la localización de los procedimientos específicos que fueron realizados, donde la mayoría de las acciones fueron consideradas amputaciones menores (cuadro 22).

Cuadro 22. Tipo de amputaciones llevadas a cabo por abordaje de úlceras de pie diabético

Tipo de amputación	Número de casos
Infracondileo	2
Falange con cicatrización	15
Falange con recurrencia	7
Transtarsiana-metatarsial	18
supracondilea	2

9. DISCUSIÓN

Resistencia fenotípica de aislados obtenidos de úlceras de pie diabético

Al igual que Richard *et al.*, 2011 y Sekhar *et al.*, 2014 encontramos que las bacterias gram negativas fueron predominantes a las bacterias gram positivas, pero con respecto a las especies individuales, se aisló *S. aureus* con mayor frecuencia. Aunque, Al Benwan *et al.*, 2012 y Citrón *et al.*, 2007 reportaron resultados similares, otros autores reportan *P. aeruginosa* o *Proteus* spp. como el principal microorganismo aislado después de *S. aureus* en las DFIs (Bansal *et al.*, 2008; de Vries *et al.*, 2014). Un estudio similar realizado por Turhan *et al.*, 2013 mostró patrones casi idénticos en levofloxacino para estas bacterias, pero informaron que otros antibióticos fueron más eficientes. Un estudio reportado por Molina *et al.*, 2016 también informó que las fluoroquinolonas fueron uno de los antibióticos más efectivos contra los microorganismos gram positivos.

La comprensión de las interacciones patógeno-humano ha permitido extender las terapias antimicrobianas, la identificación y características fenotípicas de los aislados se vuelven datos relevantes para el médico, ya que predicen la probabilidad de éxito de la terapia. Para este trabajo se aislaron 163 cepas de DFUs, *S. aureus* (55.8%) fue el microorganismo más frecuentemente aislado, por lo tanto, nuestros datos están de acuerdo con informes anteriores (Nageen, 2016; Bravo *et al.*, 2016). En este estudio, encontramos un 15.3% de *S. aureus* resistente a la oxacilina y otro 7.6% de cepas con resistencia a FOX no mediadas por el gen *mecA*. Los estudios actuales realizados en EE. UU. y Grecia demostraron tasas de prevalencia de MRSA similares (9.8, 15 y 18.7%), (van Asten *et al.*, 2017; Reveles *et al.*, 2016; Demetriou *et al.*, 2017). Los estudios realizados en la Ciudad de México e India reportaron el 34 y el 24% de MRSA aislados de DFUs (Cervantes *et al.*, 2015; Saseedharan *et al.*, 2018). Adicionalmente, otro estudio realizado en Japón informó tasas del 25.6% de MRSA aislados de infecciones profundas de la piel y tejidos blandos (SSTIs), (Takadama *et al.*, 2017).

Nosotros obtuvimos tasas bajas de MRSA debido a dos razones: primero, la mayoría de las muestras de tejido eran de pacientes que acudieron al médico por primera vez para tratar la úlcera, y la segunda es que la prevalencia depende del área geográfica y los años de muestreo. La identificación de las cepas de MRSA predice la circulación de aislados

que requerirán esquemas de tratamiento con antibióticos extensos y bien coordinados, además, la presencia de MRSA se describe como un factor significativo asociado con el fracaso del tratamiento en pacientes con infecciones del pie diabético (Vardakas *et al.*, 2008). En nuestro estudio, la presencia de MRSA se asoció ($p < 0.05$) con el fracaso de la curación de heridas en pacientes con DFUs. De acuerdo con los datos del registro, los pacientes de los cuales se obtuvo *S. aureus* ($n = 91$) un 52% tuvieron resultados positivos (curación), 23% de los pacientes presentaron úlceras recurrentes y un 25% tuvieron amputación de extremidad o dedo de la extremidad.

La presencia de CoNS en DFUs ha ganado importancia debido a que nuevos estudios enfatizan su importancia como patógenos verdaderos (Aragón *et al.*, 2010), en este trabajo de investigación, el 23% de las cepas fueron MRCoNS, un estudio realizado en la India encontró prevalencia de 10% de MRCoNS (Murali *et al.*, 2014) y al igual que ellos, nosotros obtuvimos mayor prevalencia de resistencia a FOX en CoNS que en *S. aureus* (23 vs 15.3%). De acuerdo con nuestros hallazgos e informes anteriores, la presencia de CoNS resistentes a la meticilina aislados de DFUs podrían ser asociados a esquemas de tratamiento con antibióticos más estrictos. Sin embargo, aún se deben realizar nuevas investigaciones centradas en las características patógenas específicas de CoNS.

La producción de biofilm en cepas gram positivas obtenidas por cultivo de úlceras de pie diabético

Un estudio realizado en India, informó tasas altas de formación de biofilm (38.8%) en *S. aureus*, pero no informó una comparación de métodos (Banu *et al.*, 2015). Por otro lado, Pugazhendhi *et al.*, 2018, también en la India, encontró discrepancia entre los métodos para evaluar la formación de biofilm (85 vs 29%); en nuestro estudio, nosotros encontramos 14 y 18% de *S. aureus* productores de biofilm (mediante dos métodos), otros estudios realizados en India y Nepal informaron tasas de 43 y 46% de formación de biofilm en *S. aureus* que también se evaluaron mediante un ensayo de microtitulación (Shettigar *et al.*, 2016; Belbase *et al.*, 2017). Un estudio actual realizado en Turquía informó la asociación entre la resistencia a múltiples fármacos y la formación de

biofilms en DFUs (Vatan *et al.*, 2018) y Vella and Formosa, 2017, informaron que la presencia de biofilm y la profundidad de la úlcera fueron factores que influyeron en la cicatrización en el estadio de la úlcera; en nuestro estudio, con base en el registro médico, los *S. aureus* productores de biofilm no se asociaron ($p > 0.05$) a úlceras recurrentes ni a la pérdida de la extremidad. Nosotros esperábamos encontrar valores estadísticamente significativos por el hecho de que la producción de biofilm es un factor importante en el desarrollo de la infección; sugerimos que otros factores como el estado inmunológico o los niveles de glucosa en la sangre podrían ser determinantes en el proceso de formación de biofilm.

Debido a que la formación de biofilm es el factor de virulencia más importante de los CoNS, que facilita su adherencia y colonización en materiales artificiales, se esperaba encontrar altos niveles de este genotipo/fenotipo. Sin embargo, solo el 9% de los CoNS fueron positivos para la formación de biofilm mediante el ensayo MtP. Los escasos informes sobre la aparición de CoNS productores de biofilm obtenidos de DFUs es el principal inconveniente para conocer de manera efectiva el papel e impacto de estos microorganismos en las DFIs. Finalmente, algunos de los pocos estudios publicados muestran diferentes patrones de capacidad de producción de biofilm en CoNS (Soumya *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2013). En nuestro estudio, a pesar de que se aislaron pocos CoNS, los hallazgos respaldan la idea de que las complicaciones en los pacientes se debieron a la resistencia natural a los medicamentos que presentan y no a factores de virulencia como la producción de biofilm.

En cuanto a *Enterococcus* spp. de los cuales se encontraron 47% de cepas productoras de biofilm, un estudio realizado por Shettigar *et al.* 2018, reportó correlación entre la infección poli-microbiana y la presencia de *Enterococcus* spp. en DFUs. En nuestro caso, no encontramos asociación entre formación de biofilm y aparición de úlceras recurrentes. También observamos una baja concordancia entre el ensayo MtP y los genes *ica*, lo que demuestra que en nuestro caso la formación de biofilm posiblemente fue mediada por otros genes aparte de los *ica*.

El operón *ica* es responsable de la producción de biofilm mediada por la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) y polímeros de *N*-acetil-glucosamina (PNAG),

también se ha informado que la presencia y coexpresión de los genes *ica* A/D que conducen a niveles altos de producción de biofilm (Gerke *et al.*, 1998). En este estudio, el 28.8% de las cepas evaluadas, fueron positivas para la amplificación del gene *icaA*, sin embargo, solo el 4.2% de las cepas *ica* positivas estuvieron de acuerdo con el ensayo MtP. A pesar de que diferentes estudios informaron altas tasas de concordancia cuando las cepas *ica*-positivas son evaluadas con la prueba MtP y CRA (Sharma *et al.*, 2011; Gad *et al.*, 2009) se ha informado que el operón *ica* no es el único responsable de la formación de biofilm, sino que la presencia de genes como *sarZ*, *spx* y otros genes también son asociados con la producción de biofilm (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). En este contexto, otros hallazgos reportan mala concordancia entre los genes *ica*⁺ y las bacterias productoras de biofilm (Nasr *et al.*, 2012; Thilakavathy *et al.*, 2015).

La proteína Pantón Valentine-Leucocidín (PVL) codificada por el gen *lukSF*, se asocia a osteomielitis con múltiples complicaciones, incluidos los abscesos múltiples (Sheikh *et al.*, 2015). En este estudio evaluamos la prevalencia del gen *lukSF* en el género de *Staphylococci* mediante PCR punto final; encontramos un 8.7% de cepas *pvl*-positivas. Adicionalmente, la mitad de los pacientes ($n = 5$) en los que se detectó el gen *pvl*, el resultado final fue una amputación menor (dedo del pie), sin embargo, debido al bajo número de positivos en las muestras, no podemos asegurar que la expresión de este gen tenga un efecto en el desarrollo del DFUs.

Los informes de prevalencia en todo el mundo muestran diferentes perfiles de prevalencia cuando las cepas *pvl* son aisladas de DFUs o SSTIs, un estudio realizado en Portugal tampoco encontró la presencia del gen *pvl* en cepas aisladas de DFUs (Mottola *et al.*, 2016). Otros estudios realizados en China y Argelia reportaron un 12-14% de cepas *pvl* positivas de MRSA y MSSA aisladas de DFUs y SSTIs (Djahmi *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Otro reporte de Stappers *et al.* 2015, informó de 14% de cepas positivas para el gen *pvl* de un estudio multicéntrico en DFUs. Adicionalmente, Shettigar *et al.*, 2016, en la India, encontró hasta 57% de cepas de *S. aureus* positivos para *pvl* obtenidas de DFUs, según nuestros resultados, las cepas *pvl*-positivas se limitaron principalmente a las cepas de MSSA; en nuestro caso, todas las cepas procedían de cultivos de biopsia, por lo tanto, es importante establecer las características genómicas para conocer el riesgo

a fracaso en la cicatrización asociado a la infección por cepas *Staphylococci pvl* positivas.

El estado de la herida y otros factores como la neuropatía se describen como un predictores de amputación importante en pacientes con DFUs (Kim *et al.*, 2018); en nuestro caso, la mayoría de las muestras de biopsia se clasificaron como Wagner II-B y II-C. En este trabajo, un 35% de los pacientes de los cuales a partir de sus biopsias se obtuvieron cocos grampositivos sufrieron amputaciones ($n = 156$) y obtuvimos un 90% de casos ($n = 54$), que se consideraron como amputaciones menores. Estudios realizados en la Ciudad de México informaron 67% de amputaciones menores ($n = 45$), (Cervantes *et al.*, 2017). Otro estudio realizado en Brasil reportó también proporciones similares (63.5%, $n = 217$), (Leite *et al.*, 2018). Aunque la amputación distal a la articulación del tobillo se ha considerado como resultado de una mejor atención y supervisión del paciente (Vamos *et al.*, 2010); también, otros estudios sugieren a las lesiones menores como un fuerte predictor de úlceras recurrentes (Waaijman *et al.*, 2014).

La presencia de MRSA se asoció estadísticamente con la resistencia a la vancomicina ($p < 0.05$), además de que el 18% de los MSSA también obtuvo niveles de resistencia a la vancomicina más allá de los 16 $\mu\text{g/mL}$. De hecho, nuestra prevalencia de datos de vancomicina está por encima de los informes anteriores en todo el mundo (Liu *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2016; Hatipoglu *et al.*, 2014). Sin embargo, no encontramos asociación entre la presencia de resistencia a la vancomicina y la recurrencia de la úlcera o las amputaciones. Un reporte de van Asten *et al.* 2017, no encontró ninguna asociación entre la remisión de la osteomielitis del pie diabético y la presencia de MRSA o VRE. Inesperadamente, nuestros datos genotípicos mostraron que ninguna cepa fue positiva para la amplificación del gen *vanA*, por ello, el 15% ($n = 17$) de las cepas de *S. aureus* se clasificaron como *S. aureus* con resistencia inducida a la vancomicina. A nuestro conocimiento, la ausencia de este genotipo (*vanA*⁺) viene precedida por reportes de resistencia baja mediada por el gen *vanA*., esto debido a que existen otros mecanismos de resistencia a vancomicina como la resistencia intrínseca no mediada por conjugación. La otra posibilidad recae en el hecho de que el crecimiento de nuestros aislados bacterianos se llevó a cabo en medios enriquecidos, sin el estímulo de la vancomicina lo

que propició una nula inducción del gen, resultado que fuera complejo ser detectado por PCR. Adicionalmente, la guía de enfoque de médico para pacientes con DFUs graves con el uso de vancomicina es escasa en nuestra región, las cuales se prescriben principalmente con clindamicina, junto a eritromicina, mupirocina y/o gentamicina.

En este contexto, la prescripción de macrólidos y lincosamidas es extensa para complicaciones de DFUs. Por lo tanto, los niveles altos de resistencia inducible a la clindamicina podrían indicar un fracaso en las terapias iniciales. En este trabajo, y en comparación con informes anteriores (Demetriou *et al.*, 2017; Haldar *et al.*, 2017) encontramos una baja prevalencia de resistencia inducible a la clindamicina con 7%. Aunque más de un tercio de nuestras cepas gram positivas mostraron resistencia natural a la clindamicina, estas no se asociaron a úlceras recurrentes y amputaciones ($p > 0.05$). Estos hallazgos apoyan la idea de que la resistencia a los antibióticos por sí solo no es un factor para llevar a cabo amputaciones por infecciones del pie diabético. De hecho, realizar un desbridamiento apropiado y alcanzar una revascularización adecuada son objetivos que se deben cumplir para lograr remisión por DFUs.

Si bien no encontramos asociación entre la resistencia a antibióticos y el resultado final del paciente, nuestros patrones de resistencia a antibióticos podrían ser útiles como antecedente al momento de iniciar terapias para combatir las DFIs. En México existen pocas publicaciones donde se informe la resistencia inducida a la clindamicina, en cepas de origen clínico (Villaseñor-Sierra *et al.*, 2012; Castro-Alarcón *et al.*, 2011) con las cuales se podrían hacer comparaciones objetivas.

A pesar de que nuestro estudio céntrico se realizó utilizando varios criterios de exclusión; nosotros no evaluamos otros factores naturales como comorbilidades y uso previo de antibióticos antes de la enfermedad involucrados en la evolución de las DFIs. Además, solo evaluamos las lesiones en un período de 3 a 6 meses, y no conocimos el resultado final de los pacientes que abandonaron el tratamiento, lo que puede identificarse como nuestro sesgo principal.

El papel del estado inmunológico y la respuesta inmunológica presente en los sitios de herida de las DFUs

El estudio y caracterización de la expresión de proteínas del sistema inmunológico en el sitio exacto de la herida permite conocer de manera acertada el comportamiento, estado y pronóstico del desarrollo de heridas, en este estudio ensayos de inmunohistoquímica fueron realizados en tejidos de DFUs con el propósito de identificar los componentes inmunológicos presentes en los sitios exactos de las lesiones.

De acuerdo con Gorecka *et al.*, 2019, la cicatrización de heridas es la respuesta fisiológica a una interrupción en la arquitectura normal de la piel y requiere la coordinación espacial y temporal de múltiples tipos de células y citocinas. Este complejo proceso es propenso a la desregulación secundaria a factores locales y sistémicos, como la isquemia y la diabetes, que con frecuencia conducen a heridas crónicas como las DFUs. Desde un punto de vista bioquímico, la hiperinflamación favorece la degradación de la matriz de la herida, amplificando así la invasividad de las células productivas de un tejido de granulación preexistente y el déficit de reclutamiento (Acosta *et al.*, 2008). En este estudio, se encontró abundante expresión para macrófagos en tejidos de DFUs en comparación con tejido de piel sano; adicionalmente, algunas de las citocinas que este linaje celular expresa (IL-1, TNF- α), también fueron identificadas por medio de los ensayos de IHC. En este trabajo todos los tejidos evaluados para la presencia de macrófagos (6 muestras) pertenecieron heridas crónicas, con amplio infiltrado celular que además presentaron fibrosis extensa, lo que denota una reacción inflamatoria exagerada y prolongada para lograr un control local de la invasión bacteriana y la posterior cicatrización de la herida. En cuanto a las citocinas que los macrófagos expresan, se ha reportado que, altos niveles de TNF- α en la herida se han asociado como un factor predictivo para el fracaso de la cicatrización (Wetzler *et al.*, 2000), además de que el TNF- α perpetúa el inicio de las células inflamatorias, desencadena genes pro-apoptóticos y perjudica la reepitelización (Acosta *et al.*, 2008). Bajo este contexto nosotros encontramos un desbalance de las proteínas pro-apoptosis que decidimos evaluar; primeramente, para los tejidos pertenecientes a DFUs encontramos alta expresión de la proteína p53 en comparación con el tejido de piel sano, y una presencia

difusa de caspasa-3 la cual fue presente en los dos tipos de tejido evaluados. Un estudio en heridas de ratas diabéticas reportó amplia expresión de esta proteína (caspasa-3) en epidermis y en tejido conectivo (Çil *et al.*, 2017). Otro estudio reportado por Khanna *et al.*, 2014, reportó evidencias que demostraron que las heridas diabéticas que presentaron macrófagos disfuncionales resultaron en una mayor carga de células apoptóticas en el sitio de la herida, esta carga a su vez, prolonga la fase inflamatoria y complica la cicatrización de la herida. Otra proteína que mostró alta expresión en tejido de pie diabético fue IFN- γ , la cual es producida por linfocitos T CD4⁺ y cuya función más importante, es la activación de los macrófagos. En nuestro estudio, los niveles altos de IFN- γ , TNF- α , así como la amplia presencia de macrófagos identificados, pareciera establecer que el tipo de inmunidad en los sitios específicos de lesión es mediado por factores de la inmunidad celular establecida por la respuesta T_H1.

Se encontró, una respuesta anti-inflamatoria mediada por la expresión de IL-4. Sin embargo, aunque encontramos diferencias en la expresión de esta citocina en tejido de DFUs en comparación con tejido de piel sano, esta expresión fue mucho menor que la respuesta pro-inflamatoria mediada por IFN- γ , TNF- α y otras moléculas relacionadas. La IL-4 tiene como función principal el bloqueo de la síntesis IL-1, IL-6 y TNF- α propiciando así la diferenciación de linfocitos T a la respuesta T_H2. Aunque IL-4 también favorece la diferenciación de linfocitos B, la casi nula expresión de células B encontrada en nuestros tejidos diabéticos podría explicarse de algún modo por la leve expresión de IL-4 encontrada en tejido de DFUs.

La interleucina 10, una citocina antiinflamatoria que desempeña funciones importantes como regulador negativo de las respuestas inmunes a los antígenos microbianos (Rutz and Ouyang, 2016), fue evaluada en este estudio encontrando que, de los 12 tejidos evaluados, la mayoría presentaron abundante expresión para IL-10. Al ser esta citocina un factor de inhibición de linfocitos y macrófagos, nuestra hipótesis era que estaría expresada de manera leve o casi ausente en tejidos de DFUs; sin embargo, fue ampliamente expresada en tejido subcutáneo que presentó amplio infiltrado celular. Este fenómeno puede ser explicado por la naturaleza dual de los macrófagos, los cuales tiene la capacidad de establecer mecanismos anti o pro inflamatorios dependiendo de las

múltiples señales y el microentorno del tejido (Murray, 2017). Un estudio reciente en heridas diabéticas en ratas reportó que cierto tipo de infección activa un fenotipo mixto de macrófagos con polarización excesiva al fenotipo M1; provocando así, una respuesta pro inflamatoria nula, con desbalance en la angiogénesis y en la cicatrización (Chen *et al.*, 2018). Interesantemente, ninguno de los tejidos positivos para IL-10 presentó expresión de células B y, además, se observó que las células provenientes de los vasos sanguíneos no expresaron IL-10, por lo que nuevos estudios comparativos pudieran ser de utilidad para confirmar nuestros hallazgos.

Una moderada expresión de la proteína IL-1 β fue identificada en un 50% de las muestras evaluadas (7), el resto de las muestras fueron negativas a la expresión de esta citocina; la cual es activada por macrófagos y tiene capacidad dual, ya que puede presentar funciones inmunomoduladoras para beneficio de la defensa del huésped, así como desencadenar respuestas inflamatorias agudas (Dinarello *et al.*, 1997). En este estudio se observó una modulación proinflamatoria por parte de IL-1 β que al igual que el TNF- α fue observada en amplia expresión en tejido de DFUs. Un estudio previo en pacientes con DFUs reportó que, IL-1 β podrían ser responsable de la respuesta inmune deprimida, de la cicatrización tardía de la herida e infecciones repetidas (Kheiralla *et al.*, 2012).

El FGF-5, un miembro de la familia de factores de crecimiento de células precursoras de tejido fibroso, involucrado en la homeostasis de células precursoras de colágeno (Kyrou *et al.*, 2017), fue evaluado en este estudio; encontrando que, no se observó expresión de esta proteína en tejido subcutáneo de DFUs. Interesantemente, las células basales pigmentadas del control sano presentaron definido e intenso de marcaje, pero no fue considerado como positivo a la expresión de FGF-5. Aunque modificamos la concentración del anticuerpo y demás condiciones de trabajo, de las 16 muestras evaluadas, 12 fueron negativas y 4 presentaron un marcaje de área indefinido como lo marca la figura 34.

Conocer la expresión de FGF podría darnos pistas sobre el estado de cicatrización de las heridas, ya que pudiéramos conocer indirectamente la cantidad de fibroblastos y nivel de reepitelización presente en los tejidos diabéticos. Nuestra idea es que, aunque todos los anticuerpos utilizados en este estudio fueron monoclonales, el anticuerpo anti-FGF-5

resultó incapaz de identificar la expresión de este factor por el hecho de que no fue específico para la técnica de IHC. Otra respuesta válida sería que la presencia de este factor es nula en tejido de DFU; sin embargo, es necesaria con la confirmación por técnicas como Western blot o PCR en tiempo real. Un estudio reciente informó que el FGF-21 está involucrado en la regulación del estrés oxidativo y que su papel como posible diana farmacológica lo sitúa como candidato para una posible terapia antidiabética (Gómez *et al.*, 2017).

MMP-2, un miembro de la familia de metalopeptidasas de matriz, involucrada en múltiples funciones de diferenciación celular fue valorada en este trabajo, donde se encontró de leve a moderada expresión al ser contrastado con un tejido control; MMP-9 un homólogo de MMP-2 se encuentra casi ausente en tejidos normales y es secretada por células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, fibroblastos y linfocitos (Coronato *et al.*, 2012). Basados en nuestros resultados y en el hecho de que las metalopeptidasas participan activamente en la degradación de colágeno y son asociadas con el progreso de la enfermedad, esta enzima (MMP-2) y otros miembros de MMPs podrían tener una utilidad importante en el diagnóstico de DFUs propensas a empeorar.

En este contexto, un estudio reciente reportó a la MMP-9 como un nuevo blanco farmacológico para tratar heridas de DFUs, encontrado que la activación de MMP-9 es perjudicial para la curación de heridas diabéticas (Nguyen *et al.*, 2018). Un meta-análisis reciente reportó que MMP-2 y MMP-9 se encontraron en más del 50% de los casos de DFUs; adicionalmente, los altos niveles de metaloproteinasas se correlacionaron significativamente con la cicatrización retrasada de las heridas (Tardáguila *et al.*, 2019).

En un intento por determinar cuál sería el “status” del sistema del complemento en los tejidos de DFUs, decidimos evaluar el factor H, una proteína de regulación que tiene como función principal asegurar que el sistema del complemento se dirija hacia patógenos u otro material peligroso y no dañe el tejido del huésped (Scholl *et al.*, 2008). Nosotros evaluamos 6 tejidos de DFUs para factor H, aunque en todas las muestras encontramos la expresión de la proteína, también se encontró en las mismas cantidades relativas en el tejido control contrastado.

El factor H ha sido ampliamente estudiado y reportado en comorbilidades de riñón (Bonomo *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2019; Hu *et al.* 2019). Sin embargo, el abordaje y función que esta proteína pudiera presentar en el desarrollo de las DFUs no son claras aún.

La familia del TGF β incluye 3 isoformas con diferente funcionalidad, en lo que respecta a la actividad del TGF- β 3 en los tejidos, este estimula a los fibroblastos y aumenta la expresión de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Además, disminuye la actividad de las proteasas de la matriz extracelular resultando en una disminución de la degradación del colágeno (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluaron 6 tejidos de DFUs para la expresión de TGF- β 3, encontrando en todos estos una muy leve expresión de este factor de crecimiento comparado con el tejido control de piel sana. Un estudio por Jude *et al.*, en el 2002 reportó que no hubo diferencia significativa en la expresión de TGF- β 1 en muestras de tejidos de DFUs y controles, pero que el TGF- β 3 jugó un rol importante en el desarrollo de úlceras crónicas.

Otro estudio en ratones diabéticos reportó que el TGF- β 1 revirtió el deterioro de la herida, lo que pudiera sugerir que el proceso de curación asociado con la diabetes mellitus comparte eventos celulares comunes que responden a las funciones del TGF- β 1 (El Gazerly *et al.*, 2013). Adicionalmente, un estudio donde se evaluó el papel de TGF- β 3 en heridas de la cavidad oral en ratas reportó que este factor tuvo como función principal modular el ambiente inflamatorio, así como de redirigir y mejorar la cicatrización de heridas (Chang *et al.*, 2014). Por todo ello, sería probable que TGF- β 3 pudiera estar implicado en el desarrollo de la fibrosis crónica y cicatrización de heridas de pie diabético; sin embargo, estudios más específicos son necesarios realizarse para comprobar esta hipótesis.

La proteína KAI1 implicada en múltiples procesos celulares en medula ósea (Larochelle *et al.*, 2012), fue encontrada en alta expresión en tejidos de DFUs en comparación con el tejido control evaluado. Un estudio por Cho *et al.* en el 2014 reportó alta expresión de KAI1 en tejidos diabéticos; que pudiera ser asociado a condiciones de hipoxia o de concentraciones altas de glucosa en tejidos. Aunque el papel de supresión de tumores por parte de KAI1 ha sido ampliamente estudiado (Wang *et al.* 2019; Miller *et al.*, 2018)

poco se conoce acerca del papel de esta proteína en el desarrollo DFUs. Se ha reportado que la secuencia de DNA de KAI1 contiene genes de respuesta a hipoxia y que adicionalmente, estos genes también son activados por altas concentraciones de IL-1 β y TNF- α (Qian *et al.*, 2004). Concorde a esto, en nuestros ensayos, en la mayoría de las muestras donde hubo alta expresión de TNF- α e IFN- γ también hubo alta expresión de KAI1. Evaluar tejidos de DFUs de estados crónicos y compararlos con procesos agudos podría establecer pautas para comprender mejor el papel de KAI1 en los procesos de cicatrización de DFUs.

10. CONCLUSIONES

Staphylococcus aureus fue el patógeno más comúnmente aislado, con altos niveles de resistencia a antibióticos β -lactámicos y cefalosporinas. Se encontraron bajos niveles de MRSA en comparación con reportes previos, pero el fenotipo estuvo asociado a resistencia a la vancomicina y a la amputación de extremidades.

Los datos de resistencia fenotípica encontrados para MRCoNS demuestran que CoNS no es un patógeno oportunista, los altos niveles de resistencia a FOX encontrados, definen este fenotipo de especial interés debido a las escasas opciones terapéuticas para el combate. Se encontró baja prevalencia de especies con resistencia inducida, lo que indica que los tratamientos empíricos prescritos a pacientes con pie diabético están funcionando o al menos no están generando resistencia cruzada.

Por histología se definió que, los procesos agudos de tejidos de biopsias de pie diabético grados Wagner 2 y 3 presentaron alta carga bacteriana y reclutamiento de agentes del sistema inmune como células PMN y linfocitos. Los procesos crónicos fueron definidos por extensas áreas de fibrosis, destrucción tisular y necrosis periférica, con lo cual se aceptan las hipótesis anteriormente planteadas. Los niveles altos de expresión de IFN- γ , TNF- α , Macrófagos y bajos de IL-4, e IL-10 apuntan a un tipo de inmunidad local celular T_H1.

11. RECOMENDACIONES

1. Obtener muestras de tejido de DFUs de hospitales públicos, realizar los perfiles de resistencia a antibióticos y comparar los patrones de susceptibilidad.
2. Evaluar las propiedades de producción de biofilm en las cepas gram negativas obtenidas, así como la búsqueda y caracterización de Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido.
3. Para estudios futuros será importante obtener suero de pacientes con DFUs para así poder contrastar con mayor precisión los niveles y presencia de mediadores celulares implicados en las DFIs.
4. Cuantificar por PCR en tiempo real los niveles de los mediadores celulares evaluados y comparar las cantidades encontradas con la cuantificación relativa obtenida.

12. ANEXOS

Anexo 1. Formato de carta de consentimiento informado que fue usada, para obtener los consentimientos informados de los pacientes.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación: Análisis del perfil inmunológico de infecciones en pie diabético

Paciente:

Por medio del presente documento, expreso que fui informado y doy mi consentimiento para que resultados de los análisis inmunológicos de mis muestras biológicas sean incluidos de forma anónima en estudios epidemiológicos e inmunopatológicos relacionados a infecciones en pie diabético llevados a cabo por el Dr. Virgilio Bocanegra García, investigador adscrito al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional en colaboración el Dr. Eduardo Bladinieres Cámara de Angiología y Cirugía Vascular del Noreste, S. C.

Expreso además que, en estado de participante anónimo, fui informado sobre mi derecho si lo hubiera deseado, de no participar en este estudio o de retirar mi consentimiento en cualquier el momento que lo decida y que mis datos están protegidos por la reglamentación vigente de protección de datos personales.

Nombre y firma del participante (Paciente): _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Lugar y fecha: _____

Edad _____ **Tiempo de padecer diabetes** _____ **Amputaciones** _____

Ha tenido lesiones infectadas anteriores _____ **¿Cuántas?** _____

Grado de la lesión _____

¿Ha recibido tratamiento para la lesión actual? _____ **¿Cuál?** _____

Comorbilidades _____

Anexo 2. Preparación del medio Mueller-Hinton con cationes ajustados


1. Solución de magnesio a 10 mg/mL. Para ello, se pesaron 8.36 g de cloruro de magnesio hexahidratado y se disolvieron en 100 mL de agua. Se llevó a autoclave.
2. Solución de calcio a 10 mg/mL. Para ello, se pesaron 3.68 g de cloruro de calcio dihidratado y se disolvieron en 100 mL de agua. Se llevó a autoclave.
3. Después de atemperar el caldo Mueller-Hinton, se adicionaron a 25 mL de medio: 21.75 μ L de la solución de magnesio (10 mg/mL) y 51.75 μ L de la solución de calcio (10 mg/mL) se agitó el tubo y se llevó a un pH de 7.2.
4. Los cationes (solución) de magnesio y calcio, se adicionan al momento de trabajar, medios preparados con más de 3 días de anticipación no son recomendables para utilizar.

Anexo 3. Artículo JCR sobre los aspectos microbiológicos encontrados en DFUs.

Clinical and Translational Research

Bacterial Prevalence and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of Diabetic Foot Ulcers in the Northeast of Tamaulipas, Mexico

Mario Sánchez-Sánchez, MSc¹, Wendy Lizeth Cruz-Pulido, PhD¹, Eduardo Bladinieres-Cámara, PhD², Rodrigo Alcalá-Durán, PhD², Gildardo Rivera-Sánchez, PhD¹, and Virgilio Bocanegra-García, PhD¹

The International Journal of Lower
Extremity Wounds
1-6
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1534734617705254
journals.sagepub.com/home/ijl


Abstract

Diabetic foot ulcers (DFUs) are a serious and common problem in patients with diabetes mellitus and constitute one of the major causes of lower extremity amputation. The microbiological profile of DFUs depends on the acute or chronic character of the wound. Aerobic gram-positive cocci are the predominant organisms isolated from DFUs. Diabetic foot biopsies from patients admitted to the Angiology and Vascular Surgery Hospital of the Northeast, in Reynosa, Tamaulipas from December 2011 to April 2016 were analyzed. The samples were processed using standard microbiology techniques. Antimicrobial susceptibility testing was carried out according to the protocol established by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). We obtained 246 bacterial isolates, based on the results of phenotypic resistance. The least effective antibiotics for gram-positive bacteria were penicillin and dicloxacillin; for gram-negative bacteria, cefalotin and penicillin were the least effective. Levofloxacin, cefalotin, and amikacin were the most effective antibiotics for gram-positive and negative bacteria, respectively. *Enterobacter* genus was significantly associated with muscle biopsies ($P = .011$) and samples without growth were significantly associated with specimens of pyogenic origin ($P = .000$). In 215 DFU samples, we found that *Staphylococcus aureus* was the most commonly isolated pathogen followed by *Enterobacter* sp. This is consistent with previous reports. *Enterobacter* species may play an important role in the colonization/infection of certain tissues; however, further studies are needed in this regard.

Keywords

diabetic foot infections, antimicrobial susceptibility, MRSA

Diabetic foot is usually defined as any inframalleolar infection in a person with type 2 diabetes mellitus (DM2). It is a common and serious problem and one of the major causes of lower-extremity amputation.¹ According to the American Diabetes Association (ADA), this disorder affects 15% of all diabetic patients, leading to 80 000 amputations per year in the United States, with a high financial burden.² For Mexico, according to the “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición” (ENSANUT 2012), 6.4 million individuals suffer from diabetes, with a prevalence of ulcers of 7.2% and of amputations of 2% (128 000 per year).³ Loss of sensitivity in the plantar region, foot deformations, and appearance of wounds are factors that predispose the development of diabetic foot ulcers (DFUs). These wounds tend to become infected, generating a problem of patient care and treatment referrals. The microbiological profile of DFUs is variable and depends on the acute or chronic character of the wound, hospitalization occurrence and duration, prior antibiotic

therapy, and the sampling technique.⁴ Aerobic gram-positive cocci are the predominant organisms responsible for acute DFUs,⁵ *Staphylococcus aureus* is the most commonly isolated pathogen.⁶ In chronic wounds, the most predominant bacteria are aerobic gram-negative bacilli and obligate anaerobic bacteria.⁷ The presence of ischemia and neuropathy in the active site of infection leads to infected tissues that present an appearance of necrosis. This forces the implementation of drastic measures such as debridement or

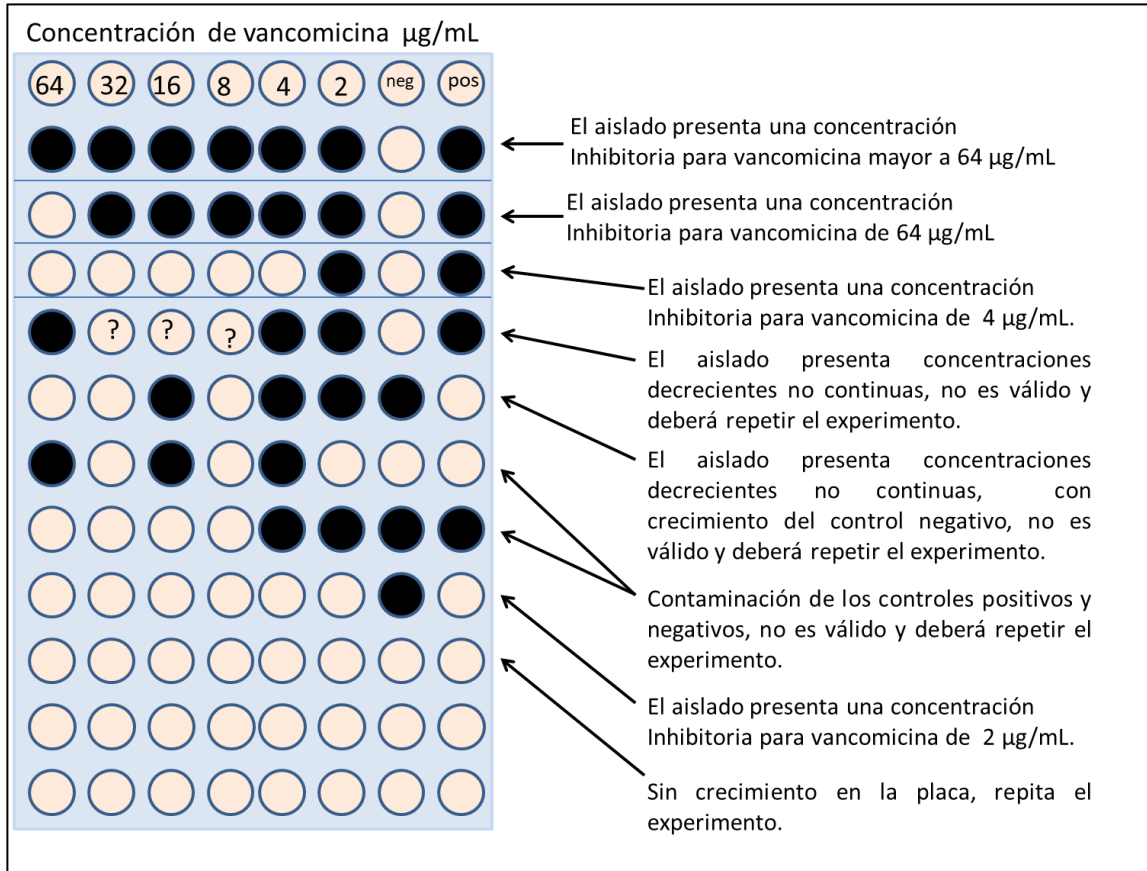
¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

²Angiología y Cirugía Vascular del Noreste, Reynosa, Tamaulipas, México

Corresponding Author:

Bocanegra-García Virgilio, Laboratorio de Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro s/n esq. Elias Piña, Col Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamaulipas, C. P. 88710, Mexico.
Email: vbocanegg@yahoo.com

Anexo 4. Representación de los posibles resultados para la MIC de vancomicina.



Anexo 5. Espectros de masas obtenidos y representativos para cada uno de los géneros de bacterias gram positivas evaluadas en este trabajo de investigación.

Espectro de masas para *S. aureus*

VITEK® MS Review Detail

http://192.168.168.240/myla/views/msid/review/msidShowDetail.jsf?ci...

VITEK® MS Review Detail

[VITEK® MS Review](#) VITEK® MS Review Detail

Isolate information

Accession ID: 1M16-1

Specimen Type: -

Confidence Level:

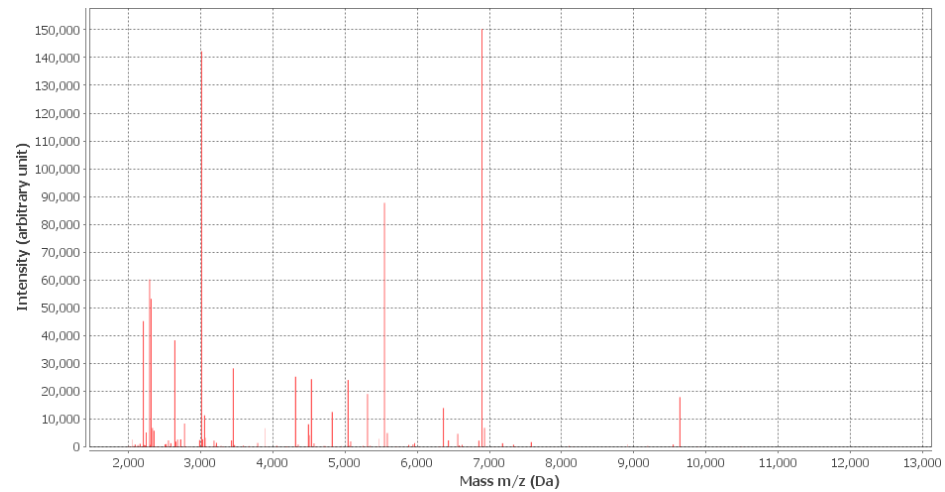


Number of identifications: 1

List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
F2	6/13/17 2:23 PM	Staphylococcus aureus		99.9		

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)



Espectro de masas para *S. haemolyticus*

VITEK® MS Review Detail

http://192.168.168.240/myla/views/msid/review/msidShowDetail.jsf?ci...

VITEK® MS Review Detail

[VITEK® MS Review](#) > [VITEK® MS Review Detail](#)

Isolate information

Accession ID: 132M16-1

Specimen Type: -

Confidence Level: ■

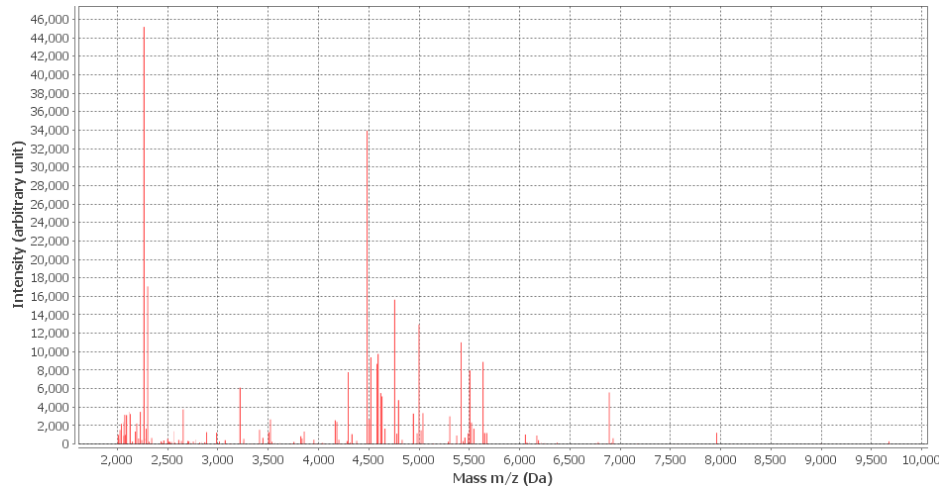


Number of identifications: 1

List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
G3	6/13/17 1:49 PM	Staphylococcus haemolyticus		99.9	■	

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)



Espectro de masas para *E. faecalis*

VITEK® MS Review Detail

<http://192.168.168.240/myla/views/msid/review/msidShowDetail.jsf?ci...>

VITEK® MS Review Detail

[VITEK® MS Review](#) [VITEK® MS Review Detail](#)

Isolate information

Accession ID: 1M15-1

Specimen Type: -

Confidence Level:

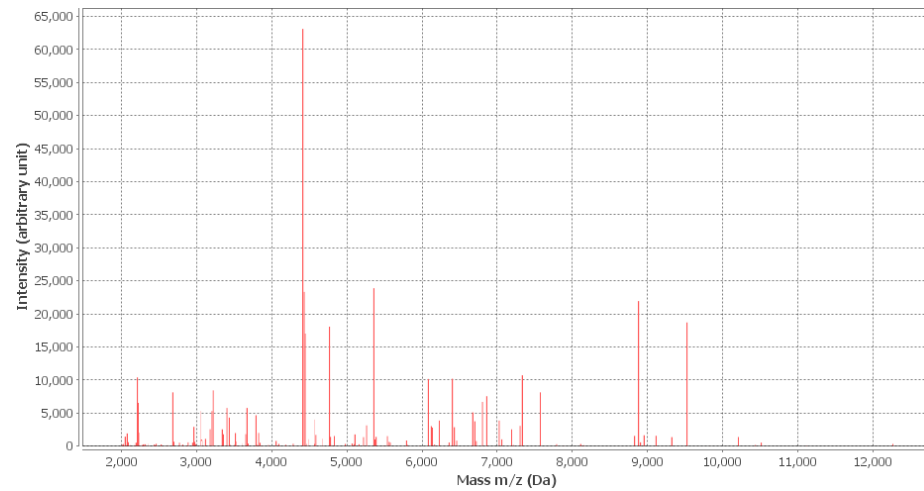


Number of identifications: 1

List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
F3	6/13/17 1:49 PM	Enterococcus faecalis		99.9		

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)



Espectro de masas para *Bacillus* spp.

VITEK® MS Review Detail

<http://192.168.168.240/myla/views/msid/review/msidShowDetail.jsf?ci...>

VITEK® MS Review Detail


[VITEK® MS Review](#) VITEK® MS Review Detail

Isolate information

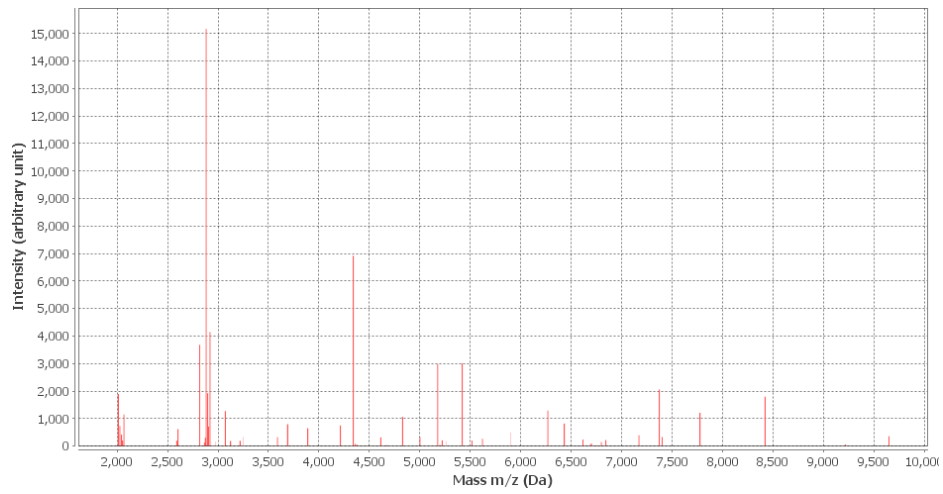
Accession ID: M551-1 Specimen Type: - Confidence Level:  

Number of identifications: 1

List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
D4	6/13/17 1:38 PM	Bacillus cereus group		99.9		

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)



13. REFERENCIAS

Disponible en: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/(última accesoión septiembre 2015)

Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/209093/ENSANUT.pdf> (última accesoión mayo 2017)

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698845>. School of Health and Related Research (ScHARR). 2003. University of Sheffield. Clinical Guidelines and Evidence Review for Type 2 Diabetes: Prevention and Management of Foot Problems. National Institute for Health and Clinical Excellence. (última accesoión abril 2019)

Acosta J.B., del Barco D.G., Vera D.C., Savigne W., López S.P., Guillen N.G., Schultz G.S. 2008. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *International Wound Journal*. 5(4):530-9. doi: 10.1111/j.1742-481X.2008.00457.x.

Al Benwan K., Mulla A., Rotimi V.O. 2012. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *Journal of Infection and Public Health*. 5(1):1-8. doi: 10.1016/j.jiph.2011.07.004.

Aragón S.J., Cabrera G.J. 2013. The role of cytokines in diabetic foot osteomyelitis. *Diabetic Medicine*. 30(5):628-9. doi: 10.1111/dme.12114.

Aragón S.J., Lázaro M.J., Hernández H.M., Quintana M.Y., Cabrera G.J. 2010. Clinical significance of the isolation of *Staphylococcus epidermidis* from bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diabetic Foot & Ankle*. 1:10.3402/dfa.v1i0.5418. doi:10.3402/dfa.v1i0.5418

Arias M., Hassan-Reshat S., Newsholme W. 2019. Retrospective analysis of diabetic foot osteomyelitis management and outcome at a tertiary care hospital in the UK. PLoS One. 14(5):e0216701. doi: 10.1371/journal.pone.0216701.

Bandyopadhyay B., Fan J., Guan S., Li Y., Chen M., Woodley D.T., Li W. 2006. A "traffic control" role for TGF β 3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. The Journal of cell biology. 172(7), 1093–1105. doi:10.1083/jcb.200507111

Bansal E., Garg A., Bhatia S., Attri A.K., Chander J. 2008. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 51(2):204-208.

Banu A., Noorul H.M., Rajkumar J., Srinivasa S. 2015. Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. Australasian Medical Journal. 8(9):280-285. doi:10.4066/AMJ.2015.2422

Belbase A., Pant N.D., Nepal K., Neupane B., Baidhya R., Baidya R., Reena B., Binod L. 2017. Antibiotic resistance and biofilm production among the care strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary hospital in Nepal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2017; 16:15. doi:10.1186/s12941-017-0194-0

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 1. 9th ed. Philadelphia, PA, EE. UU. Lippincott Williams & Wilkins; 2000. pp. 93, 175-290, 527-5

Bonomo J.A., Palmer N.D., Hicks P.J., Lea J.P., Okusa M.D., Langefeld C.D., Bowden D.W., Freedman B.I. 2014. Complement factor H gene associations with end-stage kidney disease in African Americans. Nephrology Dialysis Transplantation. 29(7):1409-14. doi: 10.1093/ndt/gfu036.

Bravo M.A., Linares P.J., Lozano A.S., Asensio G.R., Ros D.E., Hernández Q.J. 2016. Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot syndrome. Journal of Diabetes and its Complications. 30(2):329-34. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.11.001

Caputa G., Flachsmann L.J., Cameron A.M. 2019. Macrophage metabolism: a wound-healing perspective. *Immunology & Cell Biology*. 97(3):268-278. doi: 10.1111/imcb.12237.

Casas C.M. 2016. Resistencia inducida a clindamicina en *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativo en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Pag. 21

Castro A.N., Ribas A.R., Silva S.J., Calderón N.A., Sánchez P.A., Parra R.I., Aparicio O.G. 2011. Molecular typing and characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated in a Mexican hospital. *Journal of Medical Microbiology*. 60(Pt 6):730-6. doi: 10.1099/jmm.0.027847-0.

Cavaliere S., Harbeck R. 1961. Manual of Antimicrobial susceptibility testing. 2005. ISBN 1-55581-349-6 Applied Microbiology. 9; 334-336

Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 51:565-7.

Cervantes G.E., García G.R., Reséndiz A.A., Salazar P.M. 2015. Infections of diabetic foot ulcers with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 14:44-49. doi:10.1177/1534734614564053

Cervantes G.E., Salazar S.P. 2017. Clinical and surgical characteristics of infected diabetic foot ulcers in a tertiary hospital of Mexico. *Diabetic Foot & Ankle*. 8(1):1367210. doi: 10.1080/2000625X.2017.1367210.

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(4):686-707.

Chang Z., Kishimoto Y., Hasan A., Welham N.V. 2014. TGF- β 3 modulates the inflammatory environment and reduces scar formation following vocal fold mucosal injury in rats. *Disease models & mechanisms*. 7(1), 83–91. doi:10.1242/dmm.013326

Chen S., Li R., Cheng C., Xu J.Y., Jin C., Gao F., Wang J., Zhang J., Zhang J., Wang H., Lu L., Xu G.T., Tian H. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* infection alters the macrophage phenotype switching process during wound healing in diabetic mice. *Cell Biology International*. 42(7):877-889. doi: 10.1002/cbin.10955.

Cho M.K., Kwon S.B., Kim C.H., Lee Y.J., Nam H.S., Lee S.H. 2014. Overexpression of KAI1 Protein in Diabetic Skin Tissues. *Archives of Plastic Surgery*. 41(3):248–252. doi:10.5999/aps.2014.41.3.248

Çil N., Oğuz E.O., Mete E., Çetinkaya A., Mete G.A. 2017. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. *Biotechnic & Histochemistry*. 92(1):15-28. doi: 10.1080/10520295.2016.1243728.

Citrón D., Goldstein E., Merriam C., Lipsky B., Abramson M.A. 2007. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and *in vitro* activity of antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9):2819-28.

Clark N.C., Cooksey R.C., Hill B.C., Swenson J.M., Tenover F.C. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 37(11):2311-7.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. 2018. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

Coronato S., Laguens G., Vanda GV. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina*. 72: 495-502.

Demetriou M., Papanas N., Panagopoulos P., Panopoulou M., Maltezos E. 2017. Antibiotic resistance in diabetic foot soft tissue infections: A series from Greece. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 16(4):255-259. doi: 10.1177/1534734617737640.

Demetriou M., Papanas N., Panopoulou M., Papatheodorou K., Maltezos E. 2013. Determinants of microbial load in infected diabetic foot ulcers: a pilot study. *International Journal of Endocrinology*. 2013:858206. doi: 10.1155/2013/858206.

de Vries M.G., Ekkelenkamp M.B., Peters E.J. 2014. Are clindamycin and ciprofloxacin appropriate for the empirical treatment of diabetic foot infections? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*. 33(3):453-456.

Dinarello C.A. 1997. Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 8(4):253-65.

Djahmi N., Messad N., Nedjai S., Moussaoui A., Mazouz D., Richard J.L., Sotto A., Lavigne J.P. 2013. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients with infected diabetic foot ulcers in an Algerian university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. 19(9): E398-404. doi: 10.1111/1469-0691.12199

Driver V.R., Fabbi M., Lavery L.A., Gibbons G. 2010. The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team. *Journal of Vascular Surgery*. 52:17S-22S.

Dutka MS., Evers S., Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:24-27

El Gazerly H., Elbardisey D.M., Eltokhy H.M., Teaama D. 2013. Effect of transforming growth factor Beta 1 on wound healing in induced diabetic rats. *International journal of health sciences*. 7(2), 160-172.

Gad G.F., El-Feky M.A., El-Rehewy M.S., Hassan M.A., Abolella H., El-Baky R.M. 2009. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 3(5):342-51. doi: <https://doi.org/10.3855/jidc.241>

Gerke C., Kraft A., Süßmuth R., Schweitzer O., Götz F. 1998. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(29):18586-93. doi: 10.1074/jbc.273.29.18586

Gómez S.M., Grajales G.M., Zuarth V.J., Navarro F.M., Martínez S.M., Juárez L.O., Morales G.M., Enríquez E.V., Gómez P.J., Cuevas R.D. 2017. Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. *Redox Biology*. 11:335-341. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.024.

Gorecka J., Kostiuk V., Fereydooni A., Gonzalez L., Luo J., Dash B., Isaji T., Ono S., Liu S., Lee SR., Xu J., Liu J., Taniguchi R., Yastula B., Hsia H.C., Qyang Y., Dardik A. 2019 The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*. 10(1):87. doi: 10.1186/s13287-019-1185-1.

Haldar J., Mukherjee P., Mukhopadhyay S., Maiti P.K. 2017. Isolation of bacteria from diabetic foot ulcers with special reference to anaerobe isolation by simple two-step combustion technique in candle jar. *The Indian Journal of Medical Research*. 145(1):97-101.

Hatipoglu M., Mutluoglu M., Uzun G., Karabacak E., Turhan V., Lipsky B.A. 2014. The microbiologic profile of diabetic foot infections in Turkey: a 20-year systematic review: diabetic foot infections in Turkey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 33(6):871-8. doi: 10.1007/s10096-014-2047-5.

Hinojosa C.A., Boyer D.E., Anaya A.E., Nunez S.A., Laparra. E.H., Torres M.A., Lizola R. 2016. Impact of the bacteriology of diabetic foot ulcers in limb loss. *Wound Repair and Regeneration*. 24(5):923-927. doi: 10.1111/wrr.12462.

Hinojosa C.A., Boyer D.E., Anaya A.E., Núñez S.E., Laparra E.H., Lizola R. 2018. Impact of revascularization and factors associated with limb salvage in patients with diabetic foot. *Gaceta Médica de México*. 154(2):190-197. doi: 10.24875/GMM.18002772.

Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40:135-6.

Hryniewicz M.M., Garbacz K. 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)-a more common problem than expected? *Journal of Medical Microbiology*. 66(10):1367-1373. doi: 10.1099/jmm.0.000585

Hu X., Liu H., Du J., Chen Y., Yang M., Xie Y., Chen J., Yan S., Ouyang S., Gong Z. 2019. The clinical significance of plasma CFHR 1-5 in lupus nephropathy. *Immunobiology*. 224(3):339-346. doi: 10.1016/j.imbio.2019.03.005.

International Diabetes Federation. 2015. *IDF Diabetes Atlas*. 7. Brussels: International Diabetes Federation.

Islam S., Cawich S.O., Budhooram S., Harnarayan P., Mahabir V., Ramsewak S., Naraynsingh V. 2013. Microbial profile of diabetic foot infections in Trinidad and Tobago. *Primary Care Diabetes*. 7(4):303-8. doi: 10.1016/j.pcd.2013.05.001.

Jain S.K., Barman R. 2017. Bacteriological Profile of Diabetic Foot Ulcer with Special Reference to Drug-resistant Strains in a Tertiary Care Center in North-East India. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 21(5): 688–694. doi: 10.4103/ijem.IJEM_546_16

Jia M., Zhu L., Zhai Y.L., Chen P., Xu B.Y., Guo W.Y., Shi S.F., Liu L.J., Lv J.C., Zhang H. 2019. Variation in complement factor H affects complement activation in immunoglobulin A vasculitis with nephritis. *Nephrology*. doi: 10.1111/nep.13580.

Jneid J., Cassir N., Schuldiner S., Jourdan N., Sotto A., Lavigne J.P., La Scola B. 2018. Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections with Culturomics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8:282. doi:10.3389/fcimb.2018.00282

Johani K., Malone M., Jensen S., Gosbell I., Dickson H., Hu H., Vickery K. 2017. Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*. 14(6):1160-1169. doi: 10.1111/iwj.12777.

Jude E.B., Blakytyn R., Bulmer J., Boulton A.J., Ferguson M.W. 2002. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*.19(6):440-7.

Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C., Bhasker V., Gordillo G.M., Sen C.K., Roy S. 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*. 5(3):e9539. doi: 10.1371/journal.pone.0009539.

Kheiralla Z.M., Maklad S.S., Ashour S.M., El-Sayed M.E. 2012. Association of complement C3 and interleukin-1 with foot infections in diabetic patients. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2(3):220-30. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.3.8.

Kim B., Boo K., Lee J.S., Kim K.I., Kim W.H., Cho H.J., Park Y.B., Kim H.S., Baek S.H. 2010. Identification of the KAI1 metastasis suppressor gene as a hypoxia target gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 393(1):179-84.

Kim S.Y., Kim T.H., Choi J.Y., Kwon Y.J., Choi D.H., Kim K.C., Kim M.J., Hwang H.K., Lee K.B. 2018. Predictors for Amputation in Patients with Diabetic Foot Wound. *Vascular Specialist International*. 34(4):109-116. doi: 10.5758/vsi.2018.34.4.109.

Krzyszczak P., Schloss R., Palmer A., Berthiaume F. 2018. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*. 9:419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419. eCollection 2018.

Kwon K.T., Armstrong D.G. 2018. Microbiology and Antimicrobial Therapy for Diabetic Foot Infections. *Infection & Chemotherapy*. 50(1):11–20. doi:10.3947/ic.2018.50.1.11

Kyrou I., Weickert M.O., Gharanei S., Randeva H.S., Tan B.K. 2017. Fibroblast growth factors: new insights, new targets in the management of diabetes. *Minerva Endocrinológica*. 42(3):248-270. doi: 10.23736/S0391-1977.16.02536-0.

Larochelle A., Gillette J.M., Desmond R., Ichwan B., Cantilena A., Cerf A., Barrett A.J., Wayne A.S., Lippincott S.J., Dunbar C.E. 2012. Bone marrow homing and engraftment of human hematopoietic stem and progenitor cells is mediated by a polarized membrane domain. *Blood*. 119(8):1848-55. doi: 10.1182/blood-2011-08-371583.

Lavigne J.P., Sotto A., Dunyach R.C., Lipsky B.A. 2015. New Molecular Techniques to Study the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*. 4(1):38–49. doi:10.1089/wound.2014.0532

Leite J.O., Fonseca W.M., Souza D.U., Goncalves B.C., Gomes G.B., Cruz L.A., Nister N., Navarro T.P., Bath J., Dardik A. 2018. General Outcomes and Risk Factors for Minor and Major Amputations in Brazil. *Vascular*. 26, 3. 291–300, doi:10.1177/1708538117736677.

Lipsky B.A., Aragón S.J., Diggle M., Embil J., Kono S., Lavery L., Senneville É., Urbančič R.V., van Asten S., International Working Group on the Diabetic Foot., Peters E.J. 2016. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 32 Suppl 1:45-74. doi: 10.1002/dmrr.2699.

Liu L., Li Z., Liu X., Guo S., Guo L., Liu X. 2018. Bacterial distribution, changes of drug susceptibility and clinical characteristics in patients with diabetic foot infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 16(4):3094-3098.

Long M., Rojo V.M., Wen Q., Bharara M., Jiang T., Zhang R., Zhou S., Wong P.K., Wondrak G.T., Zheng H., Zhang D.D. 2016. An Essential Role of NRF2 in Diabetic Wound Healing. *Diabetes*. 65(3):780-93. doi: 10.2337/db15-0564.

Malik A., Mohammad Z., Ahmad J. 2013. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 7(2):101-7. doi: 10.1016/j.dsx.2013.02.006

Markakis K., Faris A.R., Sharaf H., Faris B., Rees S., Bowling F.L. 2018. Local Antibiotic Delivery Systems: Current and Future Applications for Diabetic Foot Infections. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 17(1):14-21. doi: 10.1177/1534734618757532.

Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. Chapter 1: Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.

McClure J.A., Conly J.M., Lau V., El-sayed S., Louie T., Hutchins W., Zhang K. 2006. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(3):1141-1144. doi: 10.1128/JCM.44.3.1141-1144.2006

Miller J., Dreyer T.F., Bächer A.S., Sinner E.K., Heinrich C., Bengel A., Gross E., Preis S., Rother J., Roberts A., Nelles G., Miteva T., Reuning U. 2018. Differential tumor biological role of the tumor suppressor KAI1 and its splice variant in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 9(5):6369-6390. doi: 10.18632/oncotarget.23968.

Molina B.A., Palomino L.J., Alonso L.S., García A.R., Díe R.E., Quero H.J. 2016. Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot syndrome. *Journal of Diabetes and its Complications*. 30(2):329-334.

Mottola C., Semedo L.T., Mendes J.J., Melo C.J., Tavares L., Cavaco S.P., Oliveira M. 2016. Molecular typing, virulence traits and antimicrobial resistance of diabetic foot staphylococci. *Journal of Biomedical Science*. 23:33. doi: 10.1186/s12929-016-0250-7

Murali T.S., Kavitha S., Spoorthi J., Bhat D.V., Prasad A.S., Upton Z., Ramachandra L., Acharya R.V., Satyamoorthy K. 2014. Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. *Journal of Medical Microbiology*. 63(Pt 10):1377-85. doi: 10.1099/jmm.0.076034-0.

Murray P.J. 2017. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*. 79:541-566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

Nageen A. 2016. The most prevalent organism in diabetic foot ulcers and its drug sensitivity and resistance to different standard antibiotics. *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 26(4):293-6. doi: 2294

Najari H.R., Karimian T., Parsa H., QasemiBarqi R., Allami A. 2019. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections in two tertiary hospitals of Iran. *Foot (Edinb)*. 40:54-58. doi: 10.1016/j.foot.2019.05.001.

Nasr R.A., AbuShadady H.M., Hussein S.H. 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13(3):269±274. [https:// doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.04.007)

Nguyen T.T., Ding D., Wolter W.R., Pérez R.L., Champion M.M., Mahasen K.V., Heseck D., Lee M., Schroeder V.A., Jones J.I., Lastochkin E., Rose M.K., Peterson C.E., Suckow M.A., Mobashery S., Chang M. 2018. Validation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Novel Target for Treatment of Diabetic Foot Ulcers in Humans and Discovery of a Potent and Selective Small-Molecule MMP-9 Inhibitor That Accelerates Healing. *Journal of Medical Chemistry*. 61(19):8825-8837. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01005.

Oliveira D.C., de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 46(7): 2155–2161. doi: 10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002

Ovalle L.O., Jiménez M.I., Rascón P.R., Gómez D.R., Valdez G.A., Gamiochipi C.M., Doubova S.V., Valladares S.A., Mondragón GR., Méndez P.A., Sánchez B.M., Cruz M., Salinas M.A., Garza S.M., Hernández R.J., González H.A., Vargas S.H., Reyes M., Borja A.V., Wacher N.H. 2019. Prevalencia de complicaciones de la diabetes y comorbilidades asociadas en medicina familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gaceta Médica de México*. 155(1):30-38. doi: 10.24875/GMM.18004486.

Papanas N., Maltezos E. 2009. The diabetic foot: a global threat and a huge challenge for Greece. *Hippokratia*. 13, 4. 199–204.

Park J.E., Barbul A. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*. 187(5A):11S-16S.

Perim M.C., Borges J.C., Celeste S.R., Orsolin E.F., Mendes R.R., Mendes G.O., Ferreira R.L., Carreiro S.C., Pranchevicius M.C. 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5):546-54. doi: 10.1590/0037-8682-0146-2015.

Pobiega M., Myjak I., Pomorska W.M., Romaniszyn D., Ziolkowski G., Chmielarczyk A., Macig J., Szczypta A., Wójkowska M.J. 2016. Virulence Potential of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Diabetic Foot Ulcers Among Patients from Southern Poland. *Current Vascular Pharmacology*. 14(6):547-551.

Pugazhendhi S., Dorairaj A.P. 2018. Appraisal of biofilm formation in diabetic foot infections by comparing phenotypic methods with the ultrastructural analysis. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 57(2):309-315. doi: 10.1053/j.jfas.2017.10.010

Qian D., Lin H.Y., Wang H.M., Zhang X., Liu D.L., Li Q.L., Zhu C. 2004. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biology of Reproduction*. 70:1822–1827.

Rahim K., Qasim M., Rahman H., Khan T.A., Ahmad I., Khan N., Ullah A., Basit A., Saleha S. 2016. Antimicrobial resistance among aerobic biofilm producing bacteria isolated from chronic wounds in the tertiary care hospitals of Peshawar, Pakistan. *Journal of Wound Care*. 25(8):480-6. doi: 10.12968/jowc.2016.25.8.480.

Reveles K.R., Duhon B.M., Moore R.J., Hand E.O., Howell C.K. 2016. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* diabetic foot infections in a large academic hospital: implications for antimicrobial stewardship. *PLoS One*. 11(8):e0161658. doi: 10.1371/journal.pone.0161658

Rezvani J., Nasr R., Shamsabadi F., Akbari E.M. 2016. Frequency of *VanA*, *VanB* and *VanH* variants amongst vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in central region of Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 9(4):308-315

Richard J.L., Sotto A., Lavigne J.P. 2011. New insights in diabetic foot infection. *World Journal of Diabetes*. 15; 2(2):24-32.

Rutz S., Ouyang W. 2016. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 941:89-116.

Salehzadeh A., Zamani H., Langeroudi M.K., Mirzaie A. 2016. Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2016; (12):1325-1330. doi: 10.22038/ijbms.2016.7919.

Saseedharan S., Sahu M., Chaddha R., Pathrose E., Bal A., Bhalekar P., Sekar P., Krishnan P. 2018. Epidemiology of diabetic foot infections in a reference tertiary hospital in India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(2):401–406. doi: 10.1016/j.bjm.2017.09.003

Scholl H.P., Charbel I.P., Walier M., Janzer S., Pollok K.B., Börncke F., Fritsche L.G., Chong N.V., Fimmers R., Wienker T., Holz F.G., Weber B.H., Oppermann M. 2008. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 3(7):e2593. doi: 10.1371/journal.pone.0002593.

Sekhar S.M., Vyas N., Unnikrishnan M.K., Rodrigues G.S., Mukhopadhyay C. 2014. Antimicrobial Susceptibility Pattern in Diabetic Foot Ulcer: A Pilot Study. *Annals of Medical and Health Science Research*. 4(5):742-745.

Shahi S.K., Kumar A. 2016. Isolation and Genetic Analysis of Multidrug Resistant Bacteria from Diabetic Foot Ulcers. *Frontiers in Microbiology*. 6:1464. doi: 10.3389/fmicb.2015.01464.

Sharma P., Lahiri K.K., Kapila K. 2011. Conventional and molecular characterization of coagulase-negative Staphylococcus in hospital isolates. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 54(1):85-9. doi: 10.4103/0377-4929.77331

Sheikh H.Q., Aqil A., Kirby A., Hossain F.S. 2015. Panton-Valentine leukocidin osteomyelitis in children: a growing threat. British Journal of Hospital Medicine (Lond). 76(1):18-24. doi: 10.12968/hmed.2015.76.1.18

Shettigar K., Bhat D.V., Satyamoorthy K., Murali T.S. 2018. Severity of drug resistance and co-existence of *Enterococcus faecalis* in diabetic foot ulcer infections. Folia Microbiológica (Praha). 63(1):115-122. doi: 10.1007/s12223-017-0547-2

Shettigar K., Jain S., Bhat D.V., Acharya R., Ramachandra L., Satyamoorthy K., Murali T.S. 2016. Virulence determinants in clinical *Staphylococcus aureus* from monomicrobial and polymicrobial infections of diabetic foot ulcers. Journal of Medical Microbiology. 65(12):1392-1404. doi: 10.1099/jmm.0.000370

Stappers M.H., Hagen F., Reimnitz P., Mouton J.W., Meis J.F., Gyssens I.C. 2015. Direct molecular versus culture-based assessment of Gram-positive cocci in biopsies of patients with major abscesses and diabetic foot infections. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 34(9):1885-92. doi: 10.1007/s10096-015-2428-4

Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Acta Patológica, Microbiológica, e Inmunológica Scandinavica. 115(8):891-9.

Soumya K.R., Philip S., Sugathan S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. 2017. Virulence factors associated with coagulase negative Staphylococci isolated from human infections. 3 Biotech. 7(2):140. doi:10.1007/s13205-017-0753-2

Takadama S., Nakaminami H., Aoki S., Akashi M., Wajima T., Ikeda M., Mochida A., Shimoe F., Kimura K., Matsuzaki Y., Sawamura D., Inaba Y., Oishi T., Nemoto O.,

Baba N., Noguchi N. 2017. Prevalence of skin infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan, particularly in Ishigaki, Okinawa. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 23(11):800-803. doi: 10.1016/j.jiac.2017.04.016

Țânțu M.M., Man G.M., Rogozea L.M., Domnariu C.D., Pleșa F.C., Trașcă D.M., Cotoi B.V., Stoica L.E., Nicolae C., Nemeș R.M. 2018. Diabetic foot-epidemiological and histopathological aspects. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 59(3):895-902.

Tardáguila G.A., García M.E., García A.M., Álvaro A.J., Molines B.J, Lázaro M.L. 2019. Metalloproteinases in chronic and acute wounds: A systematic review and meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration*. doi: 10.1111/wrr.12717.

Tascini C., Piaggese A., Tagliaferri E., Iacopi E., Fondelli S., Tedeschi A., Rizzo L., Leonildi A., Menichetti F. 2011. Microbiology at first visit of moderate-to-severe diabetic foot infection with antimicrobial activity and a survey of quinolone monotherapy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 94(1):133-9. doi: 10.1016/j.diabres.2011.07.017.

Thilakavathy P., Priyan R.M., Jagatheeswari P.A., Charles J., Dhanalakshmi V., Lallitha S., Rajendran T., Divya B. 2015. Evaluation of *Ica* gene in comparison with phenotypic methods for detection of biofilm production by coagulase negative Staphylococci in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(8):DC16-DC19. doi:10.7860/JCDR/2015/11725.6371

Tombulturk F.K., Soydas T., Sarac E.Y., Tuncdemir M., Coskunpinar E., Polat E., Sirekbasan S., Kanigur-Sultuybek G. 2019. Regulation of MMP-2 and MMP-9 expressions modulated by AP-1 (c-jun) in wound healing: improving role of *Lucilia sericata* in diabetic rats. *Acta Diabetológica*. 56(2):177-186. doi: 10.1007/s00592-018-1237-5.

Turhan V., Mutluoğlu M., Acar A., Hatipoğlu M., Önem Y., Uzun G., Ay H., Öncül O., Görenek L. 2013. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 7(10):707-712.

Uçkay I., Aragón S.J., Lew D., Lipsky B.A. 2015. Diabetic foot infections: what have we learned in the last 30 years? *International Journal of Infection Diseases*. 40:81-91. doi: 10.1016/j.ijid.2015.09.023.

Vamos E.P., Bottle A., Edmonds M.E., Valabhji J., Majeed A., Millett C. 2010. Changes in the incidence of lower extremity amputations in individuals with and without diabetes in England between 2004 and 2008. *Diabetes Care*. 33(12):2592-7.

van Asten S.A., Mithani M., Peters E.J., La Fontaine J., Kim P.J., Lavery L.A. 2017. Complications during the treatment of diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 135:58-64. doi: 10.1016/j.diabres.2017.06.002

van Netten J.J., Price P.E., Lavery L.A., Monteiro S.M., Rasmussen A., Jubiz Y., Bus S.A., International Working Group on the Diabetic Foot. 2016. Prevention of foot ulcers in the at-risk patient with diabetes: a systematic review. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 32 Suppl 1:84-98. doi: 10.1002/dmrr.2701.

Vardakas K.Z., Horianopoulou M., Falagas M.E. 2008. Factors associated with treatment failure in patients with diabetic foot infections: An analysis of data from randomized controlled trials. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 80(3):344-51. doi: 10.1016/j.diabres.2008.01.009

Vasudevan P., Nair M.K., Annamalai T., Venkitanarayanan K.S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 92(1-2):179-185. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)

Vatan A., Saltoglu N., Yemisen M., Balkan I.I., Surme S., Demiray T., Mete B., Tabak F., Study Group Cerrahpasa Diabetic Foot. 2018. Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection. *International Journal of Clinical Practice*. 72(3):e13060. doi: 10.1111/ijcp.13060

Vella L., Formosa C. 2017. Characteristics predicting the outcome in individuals with diabetic foot ulcerations. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 107(3):180-191. doi: 10.7547/15-070

Villaseñor S.A., Katahira E., Jaramillo V.A., Barajas G.M., Bryant A., Morfín O.R., Márquez D.F., Tinoco J.C., Sánchez C.J., Stevens D.L. 2012. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999-2010. *International Journal of Infectious Diseases*. 16(3):e178-81.

Viquez M.G., Aragón S.J., Pérez C.C., Murillo V.C., López V.M., Lipsky B.A. 2018. Virulence Factor Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated From Diabetic Foot Soft Tissue and Bone Infections. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 17(1):36-41. doi: 10.1177/1534734618764237.

Waaijman R., de Haart M., Arts M.L., Wever D., Verlouw A.J., Nollet F., Bus S.A. 2014. Risk factors for plantar foot ulcer recurrence in neuropathic diabetic patients. *Diabetes Care*. 37(6):1697-705. doi: 10.2337/dc13-2470.

Wang C., Fan J., Niu C., Wang C., Villaruz A.E., Otto M., Gao Q. 2010. Role of *spx* in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunology and Medical microbiology*. 59(2):152-160. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00673.x

Wang L., Li M., Dong D., Bach T.H., Sturdevant D.E., Vuong C., Otto M., Gao Q. 2008. *SarZ* is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 197(9):1254-1262. doi:10.1086/586714

Wang X., Zhong W., Bu J., Li Y., Li R., Nie R., Xiao C., Ma K., Huang X., Li Y. 2019. Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 58(5):674-685. doi: 10.1002/mc.22960.

Wetzler C., Kampfer H., Stallmeyer B., Pfeilschifter J., Frank S. 2000. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 115:245-5

Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3(2):163-75. doi: 10.1038/nprot.2007.521

Witte M.B., Barbul A. 1997. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*. 77:509–528.

Xu P., Fu X., Xiao N., Guo Y., Pei Q., Peng Y., Zhang Y., Yao M. 2017. Involvements of $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Acute and Chronic Skin Wound Repair. *Inflammation*. 40(4):1416-1427. doi: 10.1007/s10753-017-0585-6.

Yang S.L., Zhu L.Y., Han R., Sun L.L., Dou J.T. 2017. Effect of Negative Pressure Wound Therapy on Cellular Fibronectin and Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Diabetic Foot Wounds. *Foot & Ankle International*. 38(8):893-900. doi: 10.1177/1071100717704940.

Yu F., Liu Y., Lv J., Qi X., Lu C., Ding Y., Li D., Liu H., Wang L. 2015. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 19(6):614-22. doi: 10.1016/j.bjid.2015.08.006

Zhang J., Guan M., Xie C., Luo X., Zhang Q., Xue Y. 2014. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014:273475. doi:10.1155/2014/273475

Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414(6865):782-7.