

Cultivo versus metagenómica para la identificación bacteriana en pacientes con osteomielitis de pie diabético: una revisión sistemática

LEONOR DÍAZ-VELIS^{1,2,a,b}, FABIÁN ÁLVAREZ-ECHEVERRÍA^{1b},
GABINO GARRIDO^{1,b,c}

Culture and metagenomics as bacterial identification methods in patients with diabetic foot ulcers: a systematic review

Background: Diabetic foot osteomyelitis (DFO) is a serious complication of infected ulcers in a diabetic patient. The identification of the infecting microorganisms is generally by culture, which causes a bias. Recently, metagenomics has been used for microbial identification. **Aim:** To systematically review the scientific literature related to DFO in the last 10 years to evaluate if culture and metagenomics are complementary. **Material and Methods:** To carry out the systematic review, PRISMA and Rayyan were used for the selection of studies, using three databases, using the keywords diabetes, osteomyelitis, culture and microbiome. Articles in English or Spanish were included, containing information related to bacterial identification in DFO. Characteristics of the technique, patients and frequency of bacterial appearance were collected. **Results:** Twenty six articles were included, 19 used culture and 7 metagenomics. The patients were predominantly men (68%), with an average age of 61 years, 83% had type 2 diabetes and comorbidities, mainly vascular and neuropathy. The Families with the highest frequency of appearance using the culture technique were Enterobacteriaceae (29.3%) and Staphylococcaceae (28.3%) and with metagenomics Peptoniphilaceae (22.1%) and Staphylococcaceae (9.4%). Peptoniphilaceae were not identified in culture, although they were frequently identified by metagenomics. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, regularly identified by culture, was not identified using metagenomics. **Conclusions:** Comparing results, there is a certain complementarity between microbiological culture and sequencing to identify bacteria present in DFO.

(Rev Med Chile 2023; 151: 206-221)

Key words: Diabetic Foot; Metagenomics; Microbiota; Osteomyelitis.

La diabetes mellitus es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no la utiliza eficazmente¹. Se estima que en 2019 aproximadamente 463 mi-

llones de personas en el mundo presentaban esta enfermedad (9,3% de la población adulta global) y se proyecta que al 2045 aumente a 700 millones².

Los altos niveles de glicemia por un periodo prolongado de tiempo pueden originar diversas complicaciones, como el pie diabético (PD), que

¹Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte. Antofagasta, Chile.
²Centro de Salud Familiar La Higuera. Coquimbo, Chile.
^aDoctora en Farmacología.
^bQuímico Farmacéutico.
^cDoctor en Ciencias Farmacéuticas.

Trabajo no recibió financiamiento. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 1 de julio de 2022, aceptado el 6 de marzo de 2023.

Correspondencia a:
Gabino Garrido
Antofagasta, Chile.
*gabino.garrido@gmail.com

en casos de un pie ulcerado no tratado o grave se puede generar osteomielitis. Las úlceras complicadas por osteomielitis de pie diabético (OPD) a menudo requieren tratamiento quirúrgico y terapia antibiótica prolongada³. La osteomielitis generalmente se debe a úlceras que no cicatrizan y está asociada con alto riesgo de amputación mayor⁴. En la OPD se requiere un diagnóstico temprano y preciso para asegurar un tratamiento efectivo y reducir el riesgo de amputación menor y mayor⁴.

Regularmente, para determinar el foco infeccioso se utilizan técnicas de cultivo microbiano⁵; no obstante, menos del 1% de los microorganismos son cultivados⁶, y está demostrado que la OPD es una infección principalmente polimicrobiana, lo que, para microorganismos de difícil crecimiento, como bacterias anaerobias y no cultivables, implica un sesgo en identificar y definir el tratamiento antibiótico⁷. En consecuencia, determinar el tratamiento antibiótico en torno al resultado del cultivo se verá limitado, pudiendo prolongar los tiempos de tratamiento e incrementar la aparición de microorganismos multirresistentes o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina³. Asegurar un tratamiento efectivo podría reducir el fracaso terapéutico y la alta tasa de amputación en esta enfermedad. Por ello, complementar el cultivo con nuevas técnicas (metagenómica) aumentará la cobertura de identificación de los microorganismos participando de la infección⁸.

La metagenómica es una tecnología en alza, que permite el análisis de todo el microbioma, demostrando incrementar la cobertura de identificación simultáneamente de bacteria, virus, hongos y parásitos en una muestra en varios tipos de infecciones (respiratoria⁹, urinaria¹⁰ u osteomielitis¹¹), independiente del cultivo¹². A diferencia de estudios de muestras ambientales, esta es una técnica emergente en la clínica con algunas limitaciones, como la disponibilidad de réplicas de muestras, protocolos estandarizados para reclutar pacientes, criterios de selección y toma de muestra, entre otras¹³. Por lo anterior, una revisión sistemática sobre características metodológicas y sus resultados, que establezca y registre las diferencias entre ambas técnicas de identificación podría optimizar la elección de la metodología a emplear, el manejo clínico de la infección y la selección de antibióticos.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las

metodologías de cultivo y secuenciación masiva utilizadas para la identificación bacteriana en pacientes con OPD y el alcance de sus resultados. Se analizaron artículos científicos publicados entre los años 2010-2021, se identificaron variables biosociodemográficas en pacientes con OPD en los estudios incluidos, se analizaron las metodologías utilizadas para la identificación y su correlación con los resultados.

Material y Métodos

Revisión sistemática

En este trabajo de investigación se realizó una revisión sistemática de la literatura para analizar y sintetizar las técnicas de identificación bacteriana en pacientes con OPD. Se utilizaron las bases de datos: PubMed, Scopus y Web of Science, circunscribiendo los resultados obtenidos a partir del 1 de enero de 2010 hasta el 24 de mayo de 2021.

Se utilizaron las variables de los distintos términos MeSH (*Medical Subject Headings*) de PubMed para combinar los términos “pie diabético” y “osteomielitis”, “bacteria Gram positivo”, “bacteria anaeróbica”, “microbiota”, “técnicas de identificación bacteriana” y “bacterias” con los operadores booleanos AND y OR. La estrategia de búsqueda se realizó utilizando las combinaciones y operadores booleanos: (1) Osteomielitis AND pie diabético; (2) *Staphylococcus aureus* AND NGS; (3) Bacteria anaerobia OR Gram positivo OR *Corynebacterium* OR Microbioma OR NGS; (4) Osteomielitis del pie diabético AND cultivo.

La revisión sistemática se elaboró según las directrices de la declaración PRISMA (*Preferred Reporting Items of Systematic Reviews and Meta-analyses*)^{14,15}. La pregunta de investigación (P.I.C.O.) se declaró explícitamente según sus componentes. La población estuvo constituida por pacientes con OPD, la intervención estuvo determinada por la utilización de técnicas para la identificación bacteriana y la descripción de las características de los pacientes OPD, la comparación se realizó con la utilización de técnicas de identificación bacteriana y los resultados (*Outcomes*) por la existencia de complementariedad en los resultados de la identificación bacteriana entre las diferentes técnicas.

Se utilizó la herramienta *web* Rayyan, útil en la síntesis de conocimientos, acelerando la selección

y contraposición de estudios mediante criterios de inclusión y exclusión, disminuyendo el sesgo en la selección y detección de duplicados¹⁶.

Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron artículos publicados entre el 2010 y 2021, en inglés o español, con texto completo, prospectivos y retrospectivos de OPD y conteniendo técnicas de identificación bacteriana, por cultivo o metagenómica. Se excluyeron revisiones y casos únicos.

Análisis de la calidad de los artículos

Para evitar sesgos en la selección de estudios, la revisión fue realizada por pares revisores y cuando fue necesario se resolvió con opinión de un tercero. Se evaluó la calidad de los artículos seleccionados independientemente por autor utilizando AXIS, instrumento de evaluación crítica de la calidad y riesgo de sesgo de un estudio. Esta evaluación fue desarrollada a través del panel 20 componentes Delphi^{17,18,19}. Artículos con puntaje igual o superior a 12,5/20 fueron incorporados a la revisión.

Análisis de datos

Se realizó análisis estadístico cualitativo y cuantitativo básico de los indicadores sociodemográficos de los individuos e información obtenida de las técnicas, metodologías y resultados de identificación. Además, se agruparon los artículos utilizando técnicas de cultivo y técnicas metagenómicas (ARNr 16S).

Sobre los datos obtenidos a partir del cultivo y en relación con bacterias, se recopiló la frecuencia de identificación de cada bacteria por artículo.

En referencia a los datos obtenidos a partir de metagenómica, se determinó la presencia de bacterias por estudio, ejemplo, género "X" presenta 10 aislados en un total de 20 muestras en el estudio "Y". Ambos subgrupos de datos se agruparon en el taxón familia para una mejor y práctica evaluación de la información. Aquellos que no presentaban un género claro no fueron considerados.

Resultados y Discusión

Resultados de la búsqueda

La búsqueda sistemática realizada en PubMed, Web of Science y Scopus resultó en un total de 71

artículos. De la información exportada a Rayyan se excluyeron 17 duplicados, 8 revisiones de OPD o casos únicos, 19 artículos que carecían de frecuencia de aparición bacteriana y un artículo en idioma distinto del español o inglés, resultando en 26 artículos originales incluidos en este estudio (Figura 1).

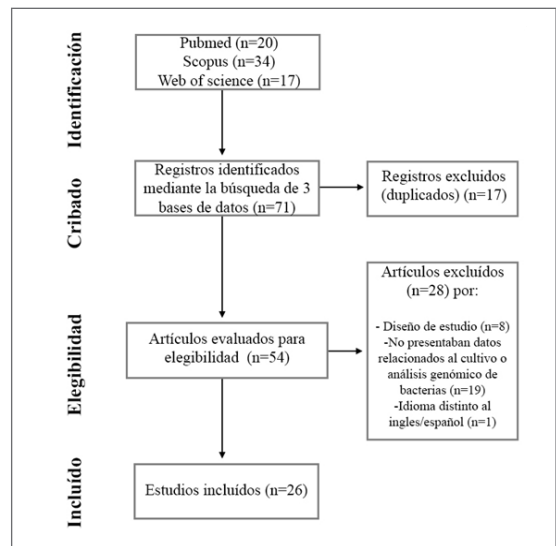


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA en cuatro niveles.

Caracterización de los pacientes OPD

La edad promedio de los pacientes fue 60,81 años (55,05-66,57 años, n = 11) (Anexo 1). En promedio, desde que los pacientes fueron diagnosticados con diabetes mellitus, esta enfermedad duraba 15,28 años (11,38-19,16 años, n = 8). En la literatura, la edad promedio de aparición de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) fue a los 45 años⁴⁵. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) puede desarrollarse a cualquier edad, las estimaciones de prevalencia o incidencia en adultos mayores fueron limitadas⁴⁶. Además, la amputación por diabetes mellitus en promedio se presentó a los 61,90 años⁴⁷.

La clasificación de la infección se especificó en 12/26 artículos y recientemente la clasificación Wagner, el sistema más utilizado históricamente⁴⁸, va siendo menos utilizado. Algunos estudios consideran que esta clasificación es lineal y simplista, conduciendo a altos niveles de imprecisión⁴⁹ y a su reemplazo paulatino por otras clasificaciones que constantemente actualizan sus criterios de clasificación, como IWGDF.

Los artículos principalmente pertenecían al continente asiático (46,15%;12/26), Europa (30,77%), Eurasia (11,54%), América (7,68%) y África (3,85%). Específicamente, India (5/26), China (4/26) e Inglaterra (4/26) presentaron más estudios (Anexo 1). Interesantemente, ningún artículo era originario de Sudamérica, considerando que la prevalencia de diabetes mellitus en el de Sur y Centro de América es del 8,00% y se espera que llegue al 9,80% en 2035⁵⁰. Además, la Federación Internacional de la Diabetes (2019) posicionó a América del Sur como la región con el mayor porcentaje de gasto total en salud en diabetes en adultos (20–79 años)⁵¹.

En 15 artículos estuvo declarado el sexo de los pacientes, siendo predominantemente masculino, representando un promedio del 68,34% (Anexo 1) y coincidente con lo encontrado por Lei et al. (2021)⁵², donde los hombres se asocian con mayor riesgo de amputación que las mujeres diabéticas. Además, el valor predictivo para los varones sobre el riesgo de amputación en pacientes diabéticos fue leve.

En 7/26 estudios hubo una alta proporción de pacientes con DM2 (Anexo 1), exceptuando Yasin et al. (2018)³⁴, donde sugieren que factores genéticos relacionados con la práctica de matrimonios consanguíneos incrementa la incidencia de DM1.

Las comorbilidades en pacientes con OPD fueron descritas en 8/26 artículos (Anexo 2). En 7/26 estuvieron relacionadas al sistema vascular, como la enfermedad vascular periférica, que disminuye el flujo de la sangre facilitando el desarrollo úlcera o gangrena en infección⁵². En 5/26 se visualizaron patologías del sistema nervioso, como neuropatía periférica prolongada, que daña los nervios disminuyendo la sensibilidad al calor, frío o dolor⁵⁴. Tanto la neuropatía periférica, como la enfermedad vascular periférica, son las causantes principales del pie diabético.

Técnicas de identificación bacteriana

El 73,07% (19/26 de los estudios incluían identificación bacteriana por cultivo microbiológico y el 26,92% (7/26) utilizó solo metagenómica. Los métodos complementarios al cultivo fueron Vitek, API, entre otros bioquímicos (Tabla 2). Para aerobios, regularmente se emplearon medios de cultivo Robertson y MacConkey y para anaerobios agar Rogosa y basal anaerobio, entre otros.

La frecuencia de aparición de los taxones

bacterianos incluyó 17/19 artículos analizados en cultivo (Figura 2). Se excluyeron Arias et al. (2019)³¹ y Shettigar et al. (2018)³⁵ por sus resultados porcentuales y no en frecuencia.

La familia Enterobacteriaceae presentó la mayor frecuencia de aparición (877 aislados), incluyó 23 especies, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, etc. Le siguieron Staphylococcaceae (848 aislados) con varios géneros *Staphylococcus*, Pseudomonadaceae (455 aislados), Enterococcaceae (259 aislados) y Streptococcaceae (202 aislados).

Jeffcoate et al. (2004)⁵⁵ afirmaron que la osteomielitis es una infección polimicrobiana, presentando dos a cinco organismos por caso y la osteomielitis es causada con mayor frecuencia por estafilococos (p.ej: *S. aureus*), pero a menudo le acompañan otros microorganismos, como cocos Gram positivo aeróbicos (*S. pneumoniae*), bacilos Gram negativo (*E. coli*) y aislados anaerobios (*C. perfringens*) hasta en 40% en algunos casos, aunque no está clara su contribución en la infección.

En 7/26 estudios se utilizó secuenciación con la tecnología Illumina para la identificación bacteriana, a excepción de Cai et al. (2019)²⁹ que no especificaron esta información.

Para la identificación bacteriana en 6/7 de los estudios (Tabla 3) se secuenciaron diversas regiones hipervariables del gen que codifica el ARNr 16S⁵⁶. En gran parte de los trabajos analizados, las regiones utilizadas para la secuenciación abarcaron V1 a V4. Los partidores 515F y 806R fueron los más utilizados para la porción V3-V4, fragmento que presenta una diversidad bacteriana mayor de la microbiota humana. Además, por su tamaño, se usa ampliamente para reducir el alto costo de las NGS^{58,59}.

En casi la totalidad de los artículos especificados (5/7), las técnicas de purificación del material genético incluyeron kits de extracción comerciales. Las bases de datos utilizadas para comparar las secuencias obtenidas fueron NCBI, Silva y Greengenes (Tabla 3).

Los resultados de la identificación bacteriana mediante secuenciación, obtenidos en 5/26 artículos (Tabla 4), no coincidieron entre ellos por lo que no fue posible consensuarlos. Sin embargo, en aquellos estudios que utilizaron el cultivo microbiológico algunos resultados coinciden con lo reportado, presentando una alta prevalencia del género *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Zou et al. (2020)²⁵ y van Asten et al. (2015)¹¹ fueron comparables y se representan en el diagrama de Sankey (Figura 4). La categoría taxonómica familia Peptoniphilaceae tuvo mayor frecuencia de aparición (78 aislados), agrupándose en cuatro géneros bacterianos: *Finegoldia*, *Anaerococcus*,

Peptoniphilus y *Helcococcus*.

En el análisis metagenómico, Zou et al. (2020)²⁵ reportaron un 39,71% de bacterias Gram positivo, mientras que van Asten et al. (2015)¹¹ identificaron el 84,56%. Mediante metagenómica (2/26) se identificó mayor proporción de bacterias Gram

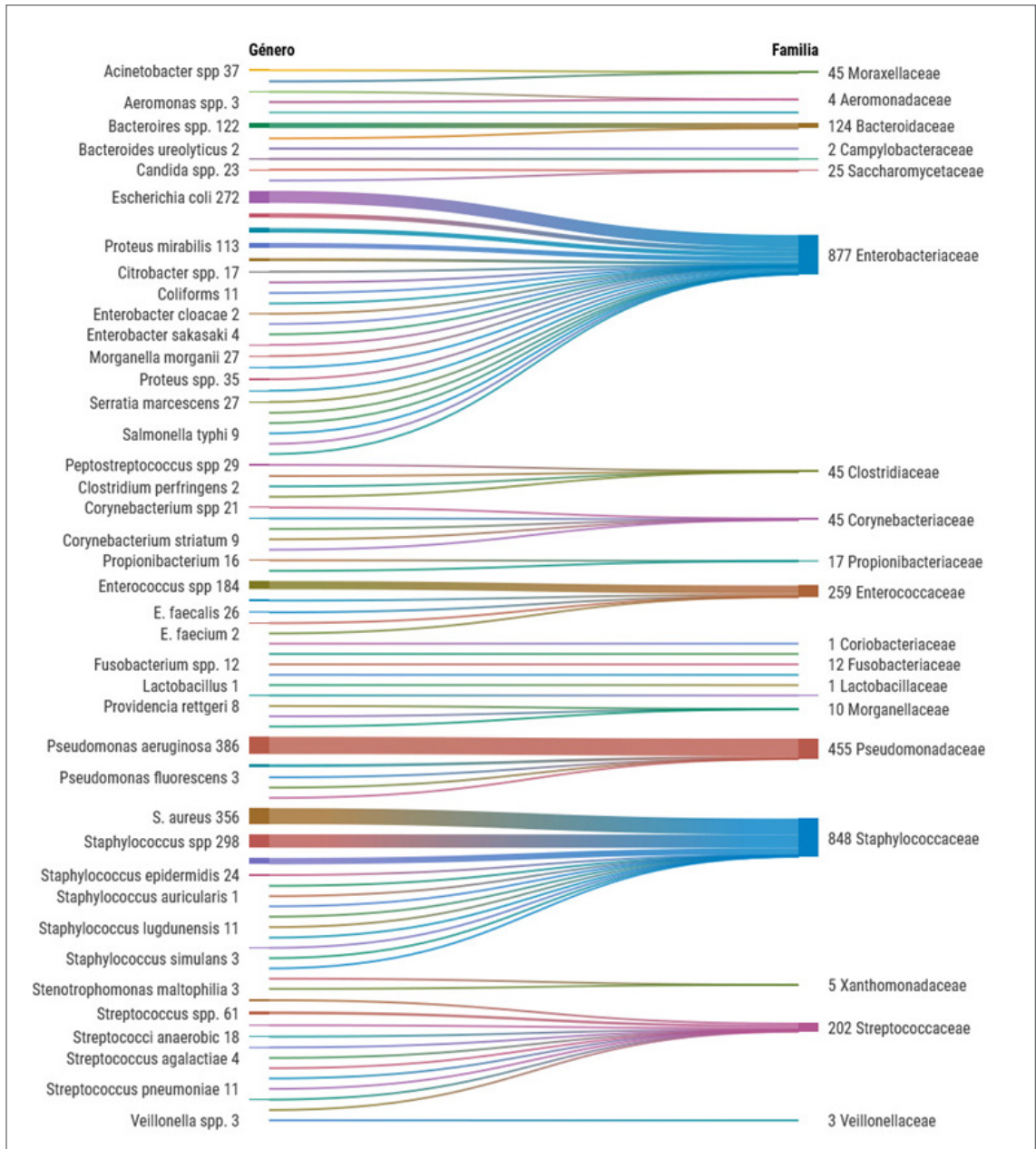


Figura 2. Distribución de géneros por cada familia taxonómica para 17/26 estudios utilizando el cultivo microbiológico. El análisis comprende un total de 2.998 aislados.

positivo (62,14%) que en aquellos estudios que utilizaron cultivo (17/26; 49,89%). Las tres familias Gram positivo identificadas en una mayor proporción por metagenómica fueron Peptoniphilaceae (36,62%), Staphylococcaceae (15,49%) y Corynebacteriaceae (13,10%) (Tabla 5). En cultivo, las tres familias de mayor proporción fueron Staphylococcaceae (59,51%), Enterococcaceae (18,18%) y Streptococcaceae (14,18%). Mediante ambas técnicas, Staphylococcaceae se detecta en un alto porcentaje respecto de otras familias, siendo la segunda más prevalente por

metagenómica, respecto del cultivo donde presenta su dominancia⁵. *S. aureus* es uno de los principales patógenos identificados en esta infección y es foco de cultivo en el diagnóstico microbiológico, resultando orientativo en la elección del tratamiento antibiótico de los pacientes⁶.

S. aureus presenta resistencia a fármacos como la meticilina (MRSA)⁶⁵. Esta cepa se identificó en 14,42% del total de géneros pertenecientes a la familia Staphylococcaceae en cultivo, pero no se registró mediante metagenómica. Interesantemente, Peptoniphilaceae presentó el mayor porcentaje en

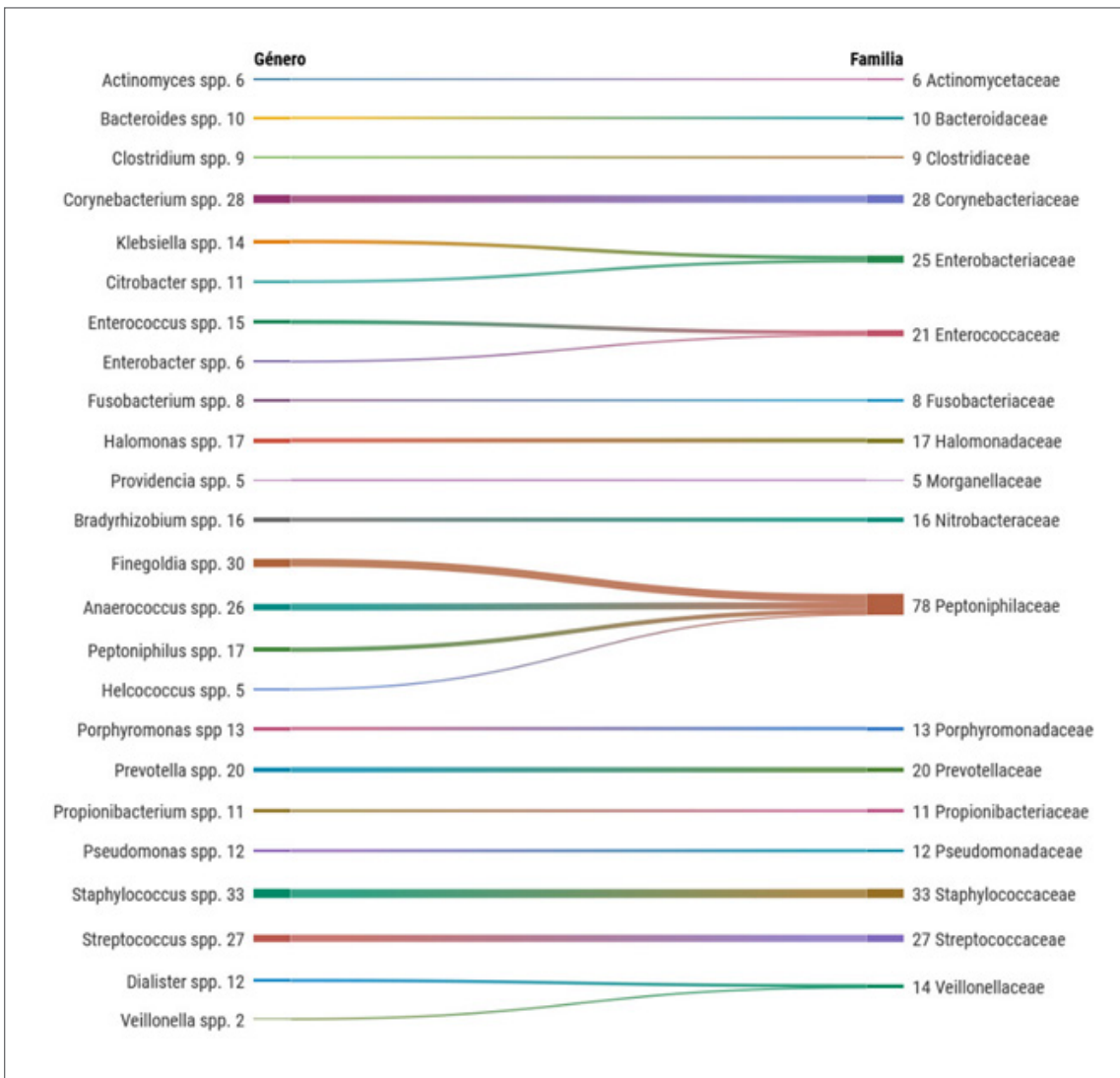


Figura 3. Distribución de géneros bacterianos dentro de las familias taxonómicas identificadas por medio de metagenómica, en los estudios de van Asten et al. (2015)¹¹ y Zou et al. (2020)²⁵ para un total 353 aislados.

Tabla 1. Artículos seleccionados que contienen información relevante relacionada con la identificación bacteriana

Artículo	Autor principal (año)	Tipo de estudio	Resumen	Bacterias en mayor proporción
In vitro activity of dalbavancin against Gram-positive bacteria isolated from diabetic foot osteomyelitis ²²	Pantel (2021)	Prospectivo	Dalbavancin exhibió una buena actividad frente G+ (incluso resistentes), MIC ₅₀ y MIC ₉₀ fue 0.047 y 0.094 mg/L, respectivamente	Bacterias G+, <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> .
Microbiological concordance in the management of diabetic foot ulcer infections with osteomyelitis, on the basis of cultures of different specimens at a Diabetic Foot Center in China ²³	Lí (2021)	Retrospectivo	Tejido blando tiene resultados cercanos al tejido óseo, aunque igualmente se debe basar la terapia en el cultivo óseo	G+, G-, <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i>
A retrospective analysis of microbiologic profile of foot infections in patients with diabetic end-stage renal disease ²⁴	Körpınar (2021)	Retrospectivo	En pacientes con enfermedad renal etapa final, la familiarización de los patógenos causantes de PD puede ayudar a la elección apropiada del tratamiento antibiótico empírico	<i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>
Analysis of the composition and functions of the microbiome in diabetic foot osteomyelitis based on 16S rRNA and metagenome sequencing technology ²⁵	Zou (2020)	Prospectivo	La diversidad microbiana fue significativamente más alta en pacientes OPD que en OPD postraumático	<i>Firmicutes</i> , <i>Prevotellaceae</i> , y <i>Prevotella</i> y en OPD post traumática <i>Proteobacteria</i> , <i>Halomonadaceae</i> , y <i>Halomonas</i> , <i>Prevotella</i>
Clinical and bacteriological profile of diabetic foot infections in a tertiary care ²⁶	Goh (2020)	Prospectivo	El PD es común entre los malayos con diabetes, presentan casos con etiología polimicrobiana con aislados multirresistentes	G-, G+, anaerobio, <i>Pseudomona</i> , <i>S. aureus</i> , especies bacteroides
Diabetic foot infection and osteomyelitis are deep-tissue cultures necessary ²⁷	Andrianaki (2020)	Prospectivo	Alta concordancia entre los cultivos de hisopo y los de biopsia en OPD	<i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Analysis of proximal bone margins in diabetic foot osteomyelitis by conventional culture, DNA sequencing and microscopy ²⁸	Malone (2019)	Prospectivo	Se identificó que hay bacterias que aún pueden residir en márgenes proximales, se demostró que la secuenciación de ADN es más sensible que cultivo	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> y <i>Stenotrophomonas</i>
[Microbiome analysis of diabetic foot osteomyelitis by metagenome sequencing technology] ²⁹	Cai (2019)	Prospectivo	Perfil microbiano en cinco pacientes con una alta obtención de anaerobios	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (69.66%) <i>Veillonella parvula</i> (36.93%) y <i>Prevotella intermedia</i> (34.19%), en OPD, dominio de anaerobios
Discordant isolates in bone specimens from patients with recurrent foot osteomyelitis ³⁰	Barshes (2019)	Prospectivo	La concordancia de los especímenes fue baja en los pacientes con osteomielitis recurrente	<i>S. aureus</i> , G-, y anaerobios son las bacterias más comunes observadas en la re-operación, mientras que <i>Enterococcus</i> spp. fue la más persistente
Retrospective analysis of diabetic foot osteomyelitis management and outcome at a tertiary care hospital in the UK ³¹	Arias (2019)	Retrospectivo	22% de las úlceras cicatrizaron sin cirugía, 60% sanaron después de una amputación menor, el 12% de los pacientes tuvo una amputación mayor. Muchos pacientes progresaron a la amputación	G+ 63%, <i>G-Paeruginosa</i> (42%), <i>E. coli</i> (13%), y <i>E. cloacae</i> (12%)
Pattern and microbiological characteristics of diabetic foot ulcers in a Nigerian tertiary hospital ³²	Anyim (2019)	Retrospectivo	Las infecciones fueron principalmente polimicrobianas con una alta sensibilidad a los antibióticos habituales (quinolonas, clindamicina, metronidazol, entre otros)	<i>S. aureus</i> Bacteroides, anaerobios 53,3%
Evidence of differential microbiomes in healing versus non-healing diabetic foot ulcers prior to and following foot salvage therapy ³⁴	MacDonald (2018)	Prospectivo	Sería posible medir el grado de la enfermedad solo analizando el microbioma. Un seguimiento de los cambios en la prevalencia de patógenos en UPD podría ser una herramienta clínica para monitorear el tratamiento invasivo	OPD sanado: actinomicetales y <i>Staphylococcaceae</i> ; OPD no sanado: Bacteroidales y Streptococcaceae

Continuación Tabla 1

Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches ²¹	Johani (2018)	Prospectivo	La presencia de biopelícula puede explicar el fracaso terapéutico	El MO más identificado fue <i>Corynebacterium</i> spp., seguido de <i>Finnegolia</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
Baseline characteristics of infected foot ulcers in patients with diabetes at a tertiary care hospital in Pakistan ³⁴	Yasin (2018)	Retrospectivo	Los predictores de amputación de extremidades inferiores fueron osteomielitis, retinopatía y neuropatía. Piperacilina / tazobactam fue un antibiótico eficaz contra gran parte de los patógenos	<i>Staphylococcus non- aureus</i> (35,48%), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (22,26%), y <i>S. aureus</i> (20,96%)
Microbiological profile of deep tissue and bone tissue in diabetic foot osteomyelitis ³⁵	Shettigar (2018)	Descriptivo	El cultivo de biopsia de hueso puede reemplazar las muestras de tejido profundo durante la amputación y desbridamiento	<i>S. aureus</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
Microbiota of purulent necrotic lesions in patients with diabetic foot syndrome ³⁶	Akshaybayeva (2017)	Prospectivo	Perfil microbiano en tejido purulento necrótico en OPD	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> y más
Isolation of bacteria from diabetic foot ulcers with special reference to anaerobe isolation by simple two-step combustion technique in candle jar ³⁷	Haldar (2017)	Prospectivo	Para el aislamiento de anaerobios en UPD, se descubrió que la técnica "candle jar" modificada es tan confiable como el sistema GasPak	Predominio de G-, <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> y bacterias coniformes
A microbiological study of diabetic foot ulcer in a south Indian tertiary care hospital ³⁸	Reghu (2016)	Retrospectivo	La alta prevalencia de infecciones polimicrobianas en el sur de India acentúa la necesidad de una terapia antimicrobiana combinada para el tratamiento inicial	G+ 38,1%, G- 54,9%, <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Escherichia coli</i> son los más aislados
The microbiome of diabetic foot osteomyelitis ¹¹	van Asten (2015)	Prospectivo	Comparar los resultados por 16S rRNA y cultivo. Los MO anaerobios y difíciles de cultivar podrían desempeñar un papel importante en los pacientes OPD	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Propionibacterium</i> spp.
Predictors for limb loss among patient with diabetic foot infections: An observational retrospective multicentric study in Turkey ³⁹	Saltoglu (2015)	Retrospectivo	Predictores de amputación, sexo masculino, duración de la diabetes > 20 años, úlcera infectada, antecedentes de enfermedad vascular periférica y retinopatía y la detección de bacilos G-	G+ cocci (54,8%), bacilos G-, lo más comunes fueron <i>Pseudomonas</i> ; <i>Escherichia coli</i>
Pedal osteomyelitis in patients with diabetes: a retrospective audit from Saudi Arabia ⁴⁰	Malone (2013)	Retrospectivo	<i>S. aureus</i> es la causa de una cantidad importante de osteomielitis en las articulaciones interfalángicas. Se da a entender que existe una asociación aparente con pacientes que presentan OPD y control glucémico subóptimo, que requieren intervención quirúrgica	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>
Conservative management of diabetic foot osteomyelitis ⁴⁰	Acharya (2013)	Retrospectivo	Presencia de MRSA se asocia a muerte, amputación y no curación	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
Gram-negative diabetic foot osteomyelitis: Risk factors and clinical presentation ⁴¹	Aragón (2013)	Retrospectivo	Se aislaron G- en casi la mitad de los casos de OPD y se asociaron con infecciones más graves, con recuentos más altos de glóbulos blancos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infection ⁴²	Parvez (2012)	Prospectivo	Las infecciones del PD en su mayoría son polimicrobianas con predominio de G-. El muestreo múltiple de tejidos superficiales y profundos, incluido el hueso, proporciona información relevante desde el punto de vista del diagnóstico y terapéutico	<i>Escherichia coli</i> (2,1%) y especies <i>Proteus</i> (15,9%). Cerca del 70% <i>S. aureus</i> aislados fueron sensibles a metilicina
[Risk factors for infections of methicillin-resistant <i>Staphylococcus</i> in diabetic foot patients] ⁴³	Ding (2012)	Retrospectivo	Factores de riesgo de MRSA: uso de antibióticos seis meses antes de la hospitalización, osteomielitis, hipertensión e hipoproteínaemia. HbA1c fue un factor de riesgo para la infección por MRSE	Las bacterias G+ presentaron una clara dominancia (57,2%, 207/362). <i>S. aureus</i> (27,1%), <i>S. epidermidis</i> (18,8%) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (15,5%)
Clinic-microbiological study and antimicrobial drug resistance profile of diabetic foot infections in North India ⁴⁴	Zubair (2011)	Retrospectivo	La población en el norte de la India presenta una prevalencia de organismos multirresistentes alarmantemente alta en los pacientes con pie diabético debido al uso indiscriminado de antibióticos	G- aerobias fueron frecuentemente aisladas (63,8%), seguido de G+ aerobias (36,1%) y anaerobios (31,4%)

Tabla 2. Método de identificación o de cultivo empleados (10/26)

Artículo	Método de cultivo, identificación y susceptibilidad
Pantel et al. (2021) ²²	Vitek ms
Li et al. (2021) ²³	Vitek 2
Goh et al. (2020) ²⁶	Agar MacConkey, agar sangre, agar chocolate
Andrianaki et al. (2020) ²⁷	Sistema API y Vitek2
Anyim et al. (2019) ³²	Medio Robertson, MacConkey, agar Rogosa y agar basal anaerobio
Yasin et al. (2018) ³⁴	Agar sangre y agar MacConkey
Shettigar et al. (2018) ³⁵	Agar chocolate, agar sangre, agar MacConkey
Haldar et al. (2017) ³⁴	Agar sangre, agar Brucella
Reghu et al. (2016) ³⁸	Clinical Laboratory Standards Institute Guidelines
Malone et al. (2013) ²⁰	Medio agar

Tabla 3. Resumen de la metodología utilizada para la identificación bacteriana en artículos que presentaban información de metagenómica

Autores	Tecnología	Secuenciador	Región	Partidores	Extracción de ADN	Base de datos
Zou et al. (2020) ²⁵	Illumina	NovaSeq sequencing systems	V3-V4	341F-806R	DNA extraction kit (YiRui, ShenZhen, China)	NCBI
Malone et al. (2019) ²⁸	Illumina	Illumina MiSeq	V4	515F y 806R	-	Silva 132
MacDonald et al. (2018) ³³	Illumina	Illumina MiSeq	V1-V3	-	ZR Fungal/Bacterial DNA Mini- Prep kit (Zymo Research).	GreenGenes
Johani et al. (2018) ²¹	Illumina	Illumina MiSeq	V3-V4	515F y 806R	DNeasy PowerBiofilm Kit	Silva 128
Akyshbayeva et al. (2017) ³⁶	Illumina	Miseq	V3-V4	-	EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit DNA (Transgenbiotech, China)	-
Van Asten et al. (2015) ¹¹	Illumina	Illumina MiSeq Personal Sequencer	-	-	Roche High Pure PCR template preparation kit	NCBI

metagenómica. Esta familia de bacterias, mayoritariamente anaerobias, no se reportó presente en cultivo (Tabla 5) aunque géneros de esta familia, como *Fingoldia magna*, son cultivables⁶⁶.

Corynebacteriaceae coloniza la piel y membranas mucosas en humanos, y se aísla frecuentemente en laboratorio clínico³². Sin embargo, en esta revisión se presentan bajos porcentajes de aislamiento en cultivo versus metagenómica (Tabla 5). Como expusieron Patel et al. (2016)⁶⁷, el rol y la importancia clínica de *C. striatum* en OPD a menudo se desconoce y es tratado como contaminación, no obstante sugieren tratarlo como patógeno cuando no se consigue cicatrización

completa y se presentan repetidamente difteroides en el cultivo, puesto que su identificación pudiera contribuir al diagnóstico. En el estudio de Johani et al. (2018)²¹, el género de mayor prevalencia fue *Corynebacterium* y se señala que *Staphylococcus* y *Streptococcus* están comúnmente involucrados en infecciones complejas de la piel y tejidos blandos en humanos y son frecuentemente identificados. Otros géneros encontrados, como *Corynebacterium* spp., *Fingoldia* spp., *Porphyromonas* spp. y *Anaerococcus* spp., se identifican con menor frecuencia, ya que no se basan en procedimientos microbiológicos convencionales.

Las familias Gram negativo detectadas por

Tabla 4. Resumen de los resultados de la identificación bacteriana mediante metagenómica para 5/26 artículos analizados

Autores	Resumen
Malone et al. (2019) ²⁸	Los microorganismos comúnmente secuenciados del hueso infectado fueron: <i>Peptostreptococcus</i> ; <i>Staphylococcus</i> spp; <i>Stenotrophomanas</i> ; <i>Streptococcus</i> spp., en promedio presentaban más del 10% del total de la abundancia relativa
Cai et al. (2019) ²⁹	22 especies dominantes, <i>Klebsiella pneumoniae</i> 69,66%; <i>Prevotella intermedia</i> 34,19%; <i>Veillonella parvula</i> 36,93%
MacDonald et al. (2018) ³³	Actinomycetales: Presencia significativa; Bacillales: Presencia significativa; Staphylococcaceae: Presencia significativa; Streptococcaceae: Baja presencia; Bacteroidales: Alta presencia
Johani et al. (2018) ²¹	De mayor a menor, 1: <i>Corynebacterium</i> sp. (<i>C. amycolatum</i> , <i>C. striatum</i> , <i>C. tuberculostearicum</i> , <i>C. jeikeium</i>), 2: <i>Finnegoldia</i> spp. (<i>F. magna</i>), 3: <i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. aureus</i> , <i>S. pettenkoferi</i> , <i>S. epidermidis</i>), 4: <i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. agalactiae</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. dysgalactiae</i>), 5: <i>Porphyromonas</i> sp. (<i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. somerae</i>), 6: <i>Anaerococcus</i> spp. (<i>A. murdochii</i> , <i>A. vaginalis</i> , <i>A. prevotii</i>)
Akyshbayeva et al. (2017) ³⁶	34 especies, 26,5% aerobias y 73,5% anaerobias, Anaerobias: <i>Actinomyces</i> spp. 7,4%; <i>Anaerococcus</i> 44,4%; <i>Bacteroides</i> 7,4%; <i>Bulleidia</i> 14,8%; <i>Enterobacter</i> 14,8%; <i>Enterococcus</i> 7,4%; <i>Escherichia</i> 7,4%; <i>Finnegoldia</i> 11,1%; <i>Fusobacterium</i> 18,5% <i>Helcococcus</i> spp. 14,8%; <i>Klebsiella</i> 7,4%; <i>Peptoniphilus</i> 18,5%; <i>Porphyromonas</i> spp. 11,1%; <i>Prevotella</i> spp. 11,1%; <i>Providencia</i> 11,1%. Aerobias: <i>Achromobacter</i> 26%; <i>Acinetobacter</i> 18,5%; <i>Campylobacter</i> 3,7%; <i>Corynebacterium</i> spp. 22,2%; <i>Macrococcus</i> 3,7%; <i>Pseudomonas</i> spp. 3,7%; <i>Staphylococcus</i> spp. 14,8%; <i>Stenotrophomanas</i> 7,4%; <i>Streptococcus</i> spp. 44,4%

secuenciación en mayor proporción fueron Enterobacteriaceae 17,86%, Prevotellaceae 14,29% y Halomonadaceae 12,14%. Por cultivo se detectó un mayor porcentaje de Enterobacteriaceae 55,75%, Pseudomonadaceae 28,93% y Bacteroidaceae 7,88%. A diferencia del cultivo, donde Enterobacteriaceae es dominante, en metagenómica se observó una leve homogeneidad en los porcentajes (Tabla 6). Prevotellaceae en cultivo se encontró únicamente en el estudio de Parvez et al. (2012)⁴² y solo se identificó en el 0,45% del total de bacterias Gram negativo cultivadas. A pesar de la existencia de métodos de cultivo desarrollados y con tan solo 48 h de incubación, no es rutinario cultivar especies que pertenecen a esta familia, en su mayoría anaerobias⁶⁶. La detección de la familia Enterobacteriaceae por cultivo supera el 50%, siendo sus principales representantes *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Enterobacter* spp. y aunque en metagenómica Enterobacteriaceae es la familia con mayor porcentaje, esta no predominó mayoritariamente, habiendo mayor heterogeneidad y cobertura bacteriana en los 2 estudios utilizando metagenómica respecto de los 17 utilizando cultivo, donde se detectaron 23 versus 18 familias distintas, respectivamente (Tabla 6).

Limitaciones del estudio

La información en los artículos de metagenó-

mica no era uniforme y se recopilaba en muy pocos estudios, considerando que estudios retrospectivos no contaban con dicha información. Algunos estudios incluyeron resultados de pacientes solo con pie diabético y de pacientes con OPD en conjunto. La emergente técnica por medio de metagenómica aún carece de prácticas estandarizadas, como: la determinación de la región hipervariable a utilizar, el sitio de toma de muestra y los criterios de inclusión de pacientes, una limitante a la hora de correlacionar alguna consistencia en los resultados que determinan la composición bacteriana de la OPD. Además, solo se pudieron identificar las bacterias hasta la clasificación taxonómica de género, sin llegar a establecer la presencia de especies relevantes mediante cultivo, como MRSA. El cultivo convencional en OPD está orientado a identificar ciertos patógenos bacterianos como *S. aureus*, sin pesquisar otros patógenos emergentes, como *Corynebacterium* u otros integrantes de las Peptoniphilaceae, como *Finnegoldia*, reduciendo la posibilidad de tratamiento antibiótico eficaz y recuperación de la OPD. Por lo anterior, no habiendo claridad respecto del patógeno y en pacientes graves, se propone complementariedad de las técnicas, utilizando cultivo en primera instancia y en paralelo o posteriormente metagenómica, para ello es necesario contar con protocolos estandarizados.

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de la categoría taxonómica familia de bacterias Gram positivo en cultivo (17/26) y metagenómica, pertenecientes a los artículos de van Asten et al. (2015)¹¹ y Zou et al. (2020)²⁵

Familia	Cultivo		Metagenómica	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Peptoniphilaceae	-	-	78	36,60
Staphylococcaceae	848	59,51	33	15,50
Enterococcaceae	259	18,18	21	9,86
Corynebacteriaceae	-	-	28	13,10
Streptococcaceae	202	14,18	27	12,70
Clostridiaceae	45	3,16	9	4,23
Corynebacteriaceae	45	3,16	-	-
Propionibacteriaceae	17	1,19	11	5,16
Peptostreptococcaceae	5	0,35	-	-
Eubacteriaceae	2	0,14	-	-
Coriobacteriaceae	1	0,07	-	-
Lactobacillaceae	1	0,07	-	-
Actinomycetaceae	-	-	6	2,82

Tabla 6. Frecuencia y porcentaje de las familias bacterias Gram negativo en cultivo (17/26) y mediante metagenómica, pertenecientes a los artículos de van Asten et al. (2015)¹¹ y Zou et al. (2020)²⁵

Familia	Cultivo		Metagenómica	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Enterobacteriaceae	877	55,75	25	17,90
Prevotellaceae	-	-	20	14,30
Pseudomonadaceae	455	28,93	12	8,57
Bacteroidaceae	124	7,88	10	7,14
Moraxellaceae	45	2,86	-	-
Saccharomycetaceae	25	1,59	-	-
Halomonadaceae	-	-	17	12,10
Nitrobacteraceae	-	-	16	11,40
Porphyromonadaceae	-	-	13	9,29
Fusobacteriaceae	12	0,76	8	5,71
Morganellaceae	10	0,64	5	3,57
Prevotellaceae	7	0,45	-	-
Xanthomonadaceae	5	0,32	-	-
Aeromonadaceae	4	0,25	-	-
Burkholderiaceae	4	0,25	-	-
Veillonellaceae	3	0,19	14	10,00
Campylobacteraceae	2	0,13	-	-

Conclusión

El análisis comparativo realizado establece cierta complementariedad entre el cultivo microbiológico y las tecnologías de secuenciación para la identificación de bacterias en la OPD. En los estudios analizados, las técnicas de cultivo no abarcaron la totalidad de posibles bacterias a identificar y microorganismos considerados contaminantes, como la familia Corynebacteriaceae, los cuales se identifican limitadamente en cultivo versus metagenómica. Si bien por microbiología convencional la familia de Peptoniphilaceae no se cultiva, en metagenómica está principalmente presente en OPD, desestimando la participación de representantes como *Finegoldia* en la infección. En metagenómica, no se identificaron perfiles de resistencia de bacterias, como MRSA, lo que es rutinario en cultivo. Lo anterior sugiere que complementar los resultados de ambas técnicas, podrá mejorar la identificación bacteriana en OPD.

Agradecimientos: Esta investigación no recibió subvención específica de agencias de financiamiento de sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Referencias

- World Health Organization. Informe mundial sobre la diabetes. World Rep Diabetes. 2016; 1-84.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2019; 157: 107843.
- Giurato L, Meloni M, Izzo V, Uccioli L. Osteomyelitis in diabetic foot: A comprehensive overview. World J Diabetes. 2017; 8(4): 135-42.
- Mutluoglu M, Sivrioglu AK, Eroglu M, Uzun G, Turhan V, Ay H, et al. The implications of the presence of osteomyelitis on outcomes of infected diabetic foot wounds. Scand J Infect Dis. 2013; 45(7): 497-503.
- Seguel G ¿Por qué debemos preocuparnos del pie diabético? Importancia del pie diabético. Rev Med Chile 2013; 141(11): 1464-9.
- Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. Curr Opin Microbiol. 2004; 7(5): 492-8.
- Barwell ND, Devers MC, Kennon B, Hopkinson HE, McDougall C, Young MJ, et al. Diabetic foot infection: Antibiotic therapy and good practice recommendations. Int J Clin Pract. 2017; 71(10): e13006.
- Chauhan NS. *Metagenome analysis and interpretation. Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Elsevier Inc.; 2019. 139-60 p.
- Yang L, Haidar G, Zia H, Nettles R, Qin S, Wang X, et al. Metagenomic identification of severe pneumonia pathogens in mechanically-ventilated patients: a feasibility and clinical validity study. Respir Res. 2019; 20(1): 265.
- Moustafa A, Li W, Singh H, Moncera KJ, Torralba MG, Yu Y, et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. Sci Rep. 2018; 8(1): 4333.
- Van Asten SA V, La Fontaine J, Peters EJG, Bhavan K, Kim PJ, Lavery LA. The microbiome of diabetic foot osteomyelitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016; 35(2): 293-8.
- Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. Nat Rev Genet. 2019; 20(6): 341-55.
- Schmidt BM, Erb-Downward J, Ranjan P, Dickson R. Metagenomics to identify pathogens in diabetic foot ulcers and the potential impact for clinical care. Curr Diab Rep. 2021 Jun 21; 21(8): 26.
- Urrútia G, Bonfill X. La declaración prisma: Un paso adelante en la mejora de las publicaciones de la Revista Española de Salud Pública. Rev Esp Salud Publica. 2013; 87(2): 99-102.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Altman D, Antes G, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. PLoS Med. 2009; 339: b2535.
- Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan - a web and mobile app for systematic reviews. Syst Rev. 2016; 5: 210.
- Downes M, Brennan M, Williams H, Dean R. Development of a critical appraisal tool to assess the quality of cross-sectional studies (AXIS). BMJ Open. 2016; 6(12): e011458.
- Mat Sharil AT, Basma Ezzat M, Widya L, Amri Nurhahkim MH, Nor Hikmah AR, Nabilah Zafira Z, Haris MS. Systematic review of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract and formulation in wound healing. J Pharm Pharmacogn Res. 2022;10(1): 1-12.
- Pérez-Loyola M, Valdés-González M, Garrido G. Pectinas modificadas con actividad contra el cáncer de colon: Una revisión sistemática de 2010-2021. J Pharm Pharmacogn Res. 2022; 10(4): 616-51.
- Malone M, Gannass A, Descallar J, Bowling FL, Dickson HG. Pedal osteomyelitis in patients with diabetes: A retrospective audit from Saudi Arabia. J Wound Care.

- 2013; 22(6): 318-23.
21. Johani K, Fritz BG, Bjarnsholt T, Lipsky BA, Jensen SO, Yang M, et al. Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(3): 332-9.
 22. Pantel A, Nachar O, Boudet A, Loubet P, Schuldiner S, Cellier N, et al. In vitro activity of dalbavancin against Gram-positive bacteria isolated from diabetic foot osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76(8): 2057-60.
 23. Li X, Cheng Q, Du Z, Zhu S, Cheng C. Microbiological concordance in the management of diabetic foot ulcer infections with osteomyelitis, on the basis of cultures of different specimens at a diabetic foot center in China. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021; 14: 1493-503.
 24. Körpınar Ş. A retrospective analysis of microbiologic profile of foot infections in patients with diabetic end-stage renal disease. *Int J Low Extrem Wounds.* 2021; 20(1): 15-21.
 25. Zou M, Cai Y, Hu P, Cao Y, Luo X, Fan X, et al. Analysis of the Composition and Functions of the Microbiome in Diabetic Foot Osteomyelitis Based on 16S rRNA and Metagenome Sequencing Technology. *Diabetes.* 2020; 69(11): 2423-39.
 26. Goh TC, Goh TC, Bajuri MY, C. Nadarajah S, Abdul Rashid AH, Baharuddin S, et al. Clinical and bacteriological profile of diabetic foot infections in a tertiary care. *J Foot Ankle Res.* 2020; 13: 36.
 27. Andrianaki AM, Koutserimpas C, Kafetzakis A, Tavlas E, Maraki S, Papadakis JA, et al. Diabetic foot infection and osteomyelitis. Are deep-tissue cultures necessary? *Germes.* 2020; 10(4): 346-55.
 28. Malone M, Fritz BG, Vickery K, Schwarzer S, Sharma V, Biggs N, et al. Analysis of proximal bone margins in diabetic foot osteomyelitis by conventional culture, DNA sequencing and microscopy. *APMIS.* 2019; 127(10): 660-70.
 29. Cai YL, Cao Y, Fan XZ, Luo XR, Meng JF, Xue YM, et al. [Microbiome analysis of diabetic foot osteomyelitis by metagenome sequencing technology]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2019; 99(26): 2057-61.
 30. Barshes NR, Mindru C, Trautner BW, Rodriguez-Barradas MC. Discordant isolates in bone specimens from patients with recurrent foot osteomyelitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38(4): 767-9.
 31. Arias M, Hassan-Reshat S, Newsholme W. Retrospective analysis of diabetic foot osteomyelitis management and outcome at a tertiary care hospital in the UK. *PLoS One.* 2019; 14(5): e0216701.
 32. Anyim O, Okafor C, Young E, Obumneme-Anyim I, Nwatu C. Pattern and microbiological characteristics of diabetic foot ulcers in a Nigerian tertiary hospital. *Afr Health Sci.* 2019; 19(1): 1617-27.
 33. MacDonald A, Brodell JD, Daiss JL, Schwarz EM, Oh I. Evidence of differential microbiomes in healing versus non-healing diabetic foot ulcers prior to and following foot salvage therapy. *J Orthop Res.* 2019; 37(7): 1596-603.
 34. Yasin M, Zafar S, Rahman H, Khan TA, Nazir S, Shah S, et al. Baseline characteristics of infected foot ulcers in patients with diabetes at a tertiary care hospital in Pakistan. *J Wound Care.* 2018; 27(Sup10): S26-32.
 35. Shettigar S, Shenoy S, Bhat S, Rao P. Microbiological profile of deep tissue and bone tissue in diabetic foot osteomyelitis. *J Clin Diagnostic Res.* 2018; 12(6): DC20-2.
 36. Akyshbayeva K, Ramazanova B, Bissekenova A, Nakisbekov N, Smagul A, Sarniyaziyova C, et al. Microbiota of purulent necrotic lesions in patients with diabetic foot syndrome. *Ad Alta-Journal Interdiscip Res.* 2018; 8: 139-44.
 37. Haldar J. Isolation of bacteria from diabetic foot ulcers with special reference to anaerobe isolation by simple two-step combustion technique in candle jar. *Indian J Med.* 2017; 145: 97-101.
 38. Reghu R, Padma UD, Sasankan V, Puthur S, Jose J. A microbiological study of diabetic foot ulcer in a south Indian tertiary care hospital. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2016; 37(1): 167-70.
 39. Saltoglu N, Yemisen M, Ergonul O, Kadanali A, Karagoz G, Batirel A, et al. Predictors for limb loss among patient with diabetic foot infections: an observational retrospective multicentric study in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(7): 659-64.
 40. Acharya S, Soliman M, Egun A, Rajbhandari SM. Conservative management of diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 101(3): e18-20.
 41. Aragón-Sánchez J, Lipsky BA, Lázaro-Martínez JL. Gram-negative diabetic foot osteomyelitis: risk factors and clinical presentation. *Int J Low Extrem Wounds.* 2013; 12(1): 63-8.
 42. Parvez N, Dutta P, Ray P, Shah VN, Prakash M, Khandelwal N, et al. Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infections. *Diabetes Technol Ther.* 2012; 14(8): 669-74.
 43. Ding Q, Li D, Wang P, Chu Y, Meng S, Sun Q. [Risk factors for infections of methicillin-resistant Staphylococci in diabetic foot patients]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2012; 92(4): 228-31.
 44. Zubair M, Malik A, Ahmad J. Clinico-microbiological study and antimicrobial drug resistance profile of dia-

- betic foot infections in North India. *Foot (Edinb)*. 2011; 21(1): 6-14.
45. Pippitt K, Li M, Gurgle HE. Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis. *Am Fam Physician*. 2016; 93(2): 103-9.
 46. Menke A. The Prevalence of Type 1 Diabetes in the United States. *Epidemiology*. 2013; 24(5): 1773-4.
 47. Singh G, Chawla S. Amputation in diabetic patients. *Med J Armed Forces India*. 2006; 62(1): 36-9.
 48. Monteiro-Soares M, Boyko EJ, Jeffcoate W, Mills JL, Russell D, Morbach S, et al. Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020; 36(S1): e3272.
 49. Wiley J. Classification of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014; 32(30): 13-23.
 50. Aschner P, Aguilar-Salinas C, Aguirre L, Franco L, Gagliardino JJ, de Lapertosa SG, et al. Diabetes in South and Central America: An update. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103(2): 238-43.
 51. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels, Belgium. Atlas de la Diabetes de la FID. 2019. 1-169 p.
 52. Fan L, Wu XJ. Sex difference for the risk of amputation in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021; 16(3): e0243797.
 53. Ikem R, Ikem I, Adebayo O, Soyoye D. An assessment of peripheral vascular disease in patients with diabetic foot ulcer. *Foot*. 2010; 20(4): 114-7.
 54. Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and diabetic foot syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(6): 917.
 55. Jeffcoate WJ, Lipsky BA. Controversies in diagnosing and managing osteomyelitis of the foot in diabetes. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(SUPPL. 2): 115.
 56. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 5029.
 57. Graspentner S, Loeper N, Künzel S, Baines JF, Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4-10.
 58. Fadrosh DW, Bing Ma PG, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. 2014; 2(6): 6.
 59. Jeong J, Yun K, Mun S, Chung WH, Choi SY, Nam Y do, et al. The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 1727.
 60. FDA. Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth. 2001; 1-36.
 61. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011; 52(4): 413-35.
 62. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(23): 7537-41.
 63. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*. 2012; 21(8): 1794-805.
 64. Jordano-Montañez Q, Muñoz-Tatay M, Viadé-Julíà J, Jaen-Manzanera A, Royo-Serrando J, Cuchí-Burgos E, et al. Osteomielitis de pie diabético: ¿es posible un manejo conservador? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(9): 555-9.
 65. Ochoa V, Guzman AR, Caicedo Y. Infección por *S. aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Rev Gastrohnp* 2012; 14(1): S46-S67.
 66. Söhngen C, Bunk B, Podstawka A, Gleim D, Overmann J. BacDive - The Bacterial Diversity Metadatabase. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(D1).
 67. Patel SA, Iacovella J, Cornel RS. *Corynebacterium Striatum*: A Concerning Pathogen of Osteomyelitis in the Diabetic Patient. *J Am Podiatr Med Assoc* 2016; 106(sp1): 9.

Anexo 1. Caracterización de los pacientes por estudio

Autor principal	Año de publicación	Región	Edad paciente	Clasificación PD	% de pacientes hombres	% de pacientes con DM2	Duración DM (años ± SD)
Pantel ²²	2021	Francia	-	IWGDF	-	-	-
Li ²³	2021	China	62,50	IWGDF	75,00%	-	11,06 ± 8,75
Körpınar ²⁴	2021	Turquía	-	Wagner	69,15%	88,80%	20,64 ± 7,91
Zou ²⁵	2020	China	60,59	-	57,14%	-	-
Goh ²⁶	2020	Malaysia	-	Texas U. y Wagner	61,00%	98,20%	-
Andrianaki ²⁷	2020	Grecia	72,00	IDSA	62,65%	-	18,40 ± 11,20
Malone ²⁸	2019	Inglaterra	-	IDSA	-	-	-
Cai ²⁹	2019	China	55,80	-	60,00%	-	-
Barshes ³⁰	2019	Europa	-	-	-	-	-
Arias ³¹	2019	Inglaterra	-	-	-	-	-
Anyim ³²	2019	Nigeria	63,80	Wagner	-	-	11,50
MacDonald ³³	2018	EE. UU.	52,08	-	82,61%	-	-
Johani ²¹	2018	Inglaterra	-	IDSA	-	-	-
Yasin ³⁴	2018	Pakistán	-	IWGDF/IDSA	62,62%	23,80%	-
Shettigar ³⁵	2018	India	-	-	-	-	-
Akyshbayeva ³⁶	2017	Kazakstán	63,80	Wagner	64,60%	96,40%	14,60
Haldar ³⁷	2017	India	-	-	-	-	-
Reghu ³⁸	2016	India	63,60	-	73,30%	-	16,20
van Asten ¹¹	2015	EE. UU.	-	IDSA	-	-	-
Saltoglu ³⁹	2015	Turquía	61,00	-	68,00%	-	-
Malone ²⁰	2013	Arabia Saudita	-	-	67,00%	98,00%	-
Acharya ⁴⁰	2013	Inglaterra	-	-	66,90%	80,00%	-
Aragón ⁴²	2013	España	65,00	-	66,86%	-	19,00
Parvez ⁴²	2012	India	52,60	Wagner	88,30%	93,30%	10,80 ± 7,00
Ding ⁴³	2012	China	-	-	-	-	-
Zubair ⁴⁴	2011	India	-	-	-	-	-

IWGDF: International Working Group on the Diabetic Foot, Texas U.: clasificación de "Texas University", IDSA: The Infectious Diseases Society of America. DM2: Diabetes mellitus tipo 2. SD: Desviación estándar.

Anexo 2. Tabla de enfermedades declaradas en los artículos (n = 8)

Autor	Enfermedad
Pantel et al. (2021) ²²	Enfermedad arterial periférica (98,8%), neuropatía diabética (96,4%), enfermedad cardiovascular (63,9%), enfermedad renal crónica (26,5%)
Körpınar et al. (2021) ²⁴	Enfermedad renal crónica etapa final (100), hemodiálisis (91), diálisis peritoneal (1), trasplantes renales durante el último año (2,0), hipertensión arterial (80,8%), enfermedad isquémica (54,2%), falla congestiva del corazón (18,0%), accidente cerebrovascular (6,3%) enfermedad vascular periférica (93,6%) retinopatía diabética (70,2%), anemia (70,2%), dislipidemia (70,2%), tabaquismo (67,0%)
Akylshbayeva et al. (2017) ³⁶	Angiopatía (88,2%), polineuropatía (76,5%), retinopatía (35,3%), nefropatía (50,0%), encefalopatía (11,8%)
Reghu et al. (2016) ³⁸	La mayoría de los pacientes presentaban 3 comorbilidades (27,3%). hipertensión arterial (74,7%), neuropatía periférica 109 pacientes, enfermedad vascular periférica oclusiva 51
Malone et al. (2013) ²⁰	Coexistiendo con OPD, celulitis (26%) abscesos (26,0%) gangrena gaseosa (3,0%) gangrena (6,1%)
Acharya et al. (2013) ⁴⁰	Enfermedad vascular periférica 46,9%
Aragón et al. (2013) ⁴¹	Enfermedad isquémica (33,7%), nefropatía diabética (19,1%), hipertensión arterial (68,6%), tabaquismo (21,1%), hemodiálisis (2,6%), retinopatía (64,0%), accidente cerebrovascular anterior (11,1%), previa ulcera del pie o amputación (60,4%)
Parvez et al. (2012) ⁴²	Neuropatía periférica 90,0%, enfermedad vascular periférica 31,6%