

WORLD UNION  
OF  
WOUND HEALING SOCIETIES



UNIÓN MUNDIAL DE SOCIEDADES DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

DOCUMENTO DE POSICIÓN

# TRATAMIENTO DEL BIOFILM

---

Papel del biofilm en el retraso  
en la cicatrización de las heridas

---

Tratamiento del biofilm en la práctica

---

Cómo la investigación está mejorando  
la comprensión del biofilm



**EDITORA**

Clare Bates

**DIRECTOR GENERAL**

Rob Yates



[www.wuwhs.net](http://www.wuwhs.net)

**Cómo citar este documento**

Unión Mundial de Sociedades de Cicatrización de Heridas (World Union of Wound Healing Societies, WUWHS), Congreso de Florencia, Documento de Posición. *Tratamiento del biofilm*. Wounds International 2016



Con el apoyo de una beca de formación de B Braun

Las opiniones expresadas en esta publicación son las de sus autores y no necesariamente reflejan las de B Braun

Producido por

Wounds International, una división de Omnia-Med Ltd  
1.01 Cargo Works, 1-2 Hatfields, Londres, SE1 9PG

Reservados todos los derechos ©2016. No puede hacerse ninguna reproducción, copia o transmisión de esta publicación sin permiso por escrito.

No se puede reproducir, copiar o transmitir ningún párrafo de esta publicación, salvo con permiso por escrito o de acuerdo con las disposiciones de la Ley de Derechos de autor, Diseños y Patentes de 1988 o bajo los términos de cualquier licencia que permita una copia limitada emitida por la Agencia de Licencias de Derechos de autor (Copyright Licensing Agency), 90 Tottenham Court Road, Londres, W1P 0LP

La resistencia antimicrobiana y la multirresistencia se asocian en gran medida al panorama sanitario mundial, en especial, en el tratamiento de las heridas crónicas de difícil cicatrización, donde las cifras actuales sitúan la presencia de biofilms entre el 60 % y el 100 % de las heridas no cicatrizadas. Si bien el conocimiento del papel que desempeñan los biofilms en la cronicidad de las heridas todavía se encuentra en sus primeras fases, se empieza a aceptar ampliamente que las heridas de difícil cicatrización contienen biofilms y que, de algún modo, su presencia retrasa o impide la cicatrización.

El tratamiento de los biofilms en las heridas crónicas se está convirtiendo rápidamente en un objetivo principal del tratamiento de las heridas. Sin embargo, el tratamiento de los biofilms es una tarea de una complejidad innegable. Más allá de los pasos básicos de la prevención inicial (uso de fármacos para evitar la formación de biofilms), eliminación (desbridamiento, eliminación de esfácenos) y prevención de nueva formación (uso de antimicrobianos), existe un gran número de parámetros del paciente, así como ambientales y clínicos que se deben considerar cuando se identifica una solución a medida.

La detección y la localización de los biofilms en heridas crónicas proporciona información clínica útil que ayuda a evaluar y dirigir la eficacia del desbridamiento. Sin embargo, se mantienen deficiencias en la base del conocimiento respecto a la detección y la localización del biofilm. Si bien las directrices existentes (por ejemplo, ESCMID 2015) ofrecen orientación en el diagnóstico y tratamiento de la infección del biofilm, hay preguntas que siguen sin respuesta, incluida la posible existencia de signos visuales que podrían ser útiles para decidir si se toma o no una biopsia.

A medida que va ganando importancia el debate acerca de si los biofilms se pueden ver a simple vista y se descubren nuevas técnicas (por ejemplo, el 'mapa del biofilm en la herida' de Nagakami y colaboradores), sigue siendo muy necesario disponer de un detector de biofilms en forma de 'análisis diagnóstico inmediato' que pueda detectar la presencia de biofilms en minutos, no en horas o días.

Si bien se han hecho progresos significativos en la prevención, detección y tratamiento de los biofilms, se necesita más investigación para reducir su impacto en los pacientes y en los sistemas de salud por igual.

En este Documento de Posición, los principales médicos examinan el papel que desempeña el biofilm en el retraso de la cicatrización de las heridas, el tratamiento del biofilm en la práctica y cómo la investigación (la actual y la futura) proporcionará un mayor conocimiento de estas comunidades bacterianas.

### **Autores**

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Departamento de Inmunología y Microbiología, Facultad de la Salud y Ciencias Médicas, Universidad de Copenhague, Dinamarca; Departamento de Microbiología Clínica, Rigshospitalet, Dinamarca

**Rose Cooper**, Facultad de Ciencias de la Salud de Cardiff, Universidad Metropolitana de Cardiff, Cardiff, Reino Unido

**Jacqui Fletcher**, Consultora de Enfermería Independiente, Reino Unido

**Isabelle Fromantin**, Experta en heridas y cicatrización, Institut Curie, Francia

**Klaus Kirketerp-Møller**, Centro de cicatrización de heridas de Copenhague, Hospital Universitario de Bispebjerg, Copenhague, Dinamarca

**Lic. Matthew Malone**, estudiante de doctorado, profesional del cuidado respiratorio y miembro de la Facultad de Farmacia (Glasg), Jefe del Departamento de Medicina Pediátrica, Servicio de Pie de Alto Riesgo, miembro de investigación del Hospital de Liverpool, LIVE DIAB CRU, Instituto Inghams de Investigación Médica Aplicada, Sydney, Australia

**Greg Schultz**, Instituto de Investigación de las Heridas, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Florida, EE. UU.

**Randall D Wolcott**, Presidente, Asociación Profesional y Laboratorio de Investigación y Pruebas de las Llanuras del Sur, Texas, EE. UU.

# Papel de los biofilms en el retraso en la cicatrización de las heridas

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Departamento de Inmunología y Microbiología, Facultad de la Salud y Ciencias Médicas, Universidad de Copenhague, Dinamarca; Departamento de Microbiología Clínica, Rigshospitalet, Dinamarca; **Greg Schultz**, Instituto de Investigación de las Heridas, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Florida, EE. UU.; **Klaus Kirketerp-Møller**, Centro de cicatrización de heridas de Copenhague, Hospital Universitario de Bispebjerg, Copenhague, Dinamarca; **Jacqui Fletcher**, Consultora de Enfermería Independiente, Reino Unido y **Lic. Matthew Malone**, estudiante de doctorado, profesional del cuidado respiratorio y miembro de la Facultad de Farmacia (Glasg), Jefe del Departamento de Medicina Pediátrica, Servicio de Pie de Alto Riesgo, miembro de investigación del Hospital de Liverpool, LIVE DIAB CRU, Instituto Inghams de Investigación Médica Aplicada, Sydney, Australia

Las bacterias se suelen ver como células independientes que se multiplican rápidamente cuando se encuentran en crecimiento exponencial y son susceptibles a los antibióticos si no presentan resistencia intrínseca. La resistencia antimicrobiana y la resistencia a múltiples fármacos son un problema creciente en todo el mundo, así como un tema candente sujeto a un intenso debate. La mayoría de los médicos implicados en el tratamiento de las heridas utilizarán los patrones de susceptibilidad que reciben del laboratorio de microbiología clínica como guía para determinar qué antibióticos necesita el paciente. Estas decisiones suelen recibir la ayuda de las directrices internacionales de consenso, que son suficientes al tratar las infecciones agudas<sup>[1,2,3,4]</sup>. Sin embargo, en casos de infección crónica, como las que vemos en los dispositivos médicos implantables, infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (FQ) y en heridas crónicas no cicatrizantes, estas directrices pueden no ser adecuadas. ¿A qué se debe esto? ¿Cómo podemos explicar la rápida resolución de los síntomas de la infección utilizando antimicrobianos en pacientes con heridas agudas en comparación con la respuesta letárgica, o la ausencia de la misma, que se suele observar en las heridas crónicas no cicatrizantes?

La respuesta es complicada y, al mismo tiempo, sencilla (Cuadro 1, página 7). Las bacterias pueden existir en al menos dos formas de crecimiento fenotípicamente diferentes: la primera, es en forma de células independientes y de crecimiento rápido, es decir, la forma planctónica; la segunda es en forma de comunidades agregadas de células de crecimiento lento en forma de biofilm. Toda la microbiología clásica y el desarrollo de los antimicrobianos se ha basado únicamente en paradigmas planctónicos, mediante métodos desarrollados a principios del siglo XIX. Es considerablemente más fácil hacer crecer bacterias utilizando estos métodos, mediante cultivos en agitación o untándolas en una placa de agar, y es como se cree que se presentan las bacterias durante las infecciones agudas. Estos métodos siguen estando ampliamente aceptados como métodos de referencia para representar los patógenos de las infecciones agudas.

Sin embargo, la imagen de las infecciones crónicas es completamente opuesta. En este caso, una cantidad importante de las bacterias reside en biofilms, donde se encuentran rodeadas por una matriz densa de polisacáridos, ADN libre (ADNe) procedente de las bacterias y del hospedador, y proteínas que se unen firmemente a la comunidad y a las estructuras del biofilm, protegiéndolas de ser engullidas y destruidas por neutrófilos y macrófagos. Además, muchas de las bacterias no se encuentran en división ni presentan un metabolismo rápido, lo que hace que se vuelvan tolerantes. Prácticamente todos los antibióticos destruyen solamente las bacterias metabólicamente activas al inhibir enzimas bacterianas críticas. Es importante darse cuenta de que la mayoría de las heridas crónicas infectadas albergan diferentes especies bacterianas que hacen necesarios diferentes tratamientos, como los antibióticos<sup>[5,6,7]</sup>. Sin embargo, las diferentes especies no se encuentran necesariamente en el biofilm sino dispersas en pequeñas islas en las que solamente se encuentra una sola especie<sup>[8,9,10]</sup>.

En este estudio exploraremos las implicaciones de los biofilms en las heridas humanas crónicas y no cicatrizantes, presentando pruebas o hipótesis acerca de cómo los biofilms retrasan la cicatrización de las heridas. También abordaremos el enigma clínico de cómo diagnosticar el biofilm dentro de las heridas y los mejores métodos para su tratamiento.

## DEFINICIÓN DE BIOFILM

Los biofilms se suelen definir de acuerdo con observaciones *in vitro*. Las definiciones clásicas suelen describir los biofilms como bacterias ancladas a superficies, encapsuladas en una matriz extracelular producida por las propias bacterias y tolerante a agentes

**“La resistencia antimicrobiana y la resistencia a múltiples fármacos son un problema creciente en todo el mundo, así como un tema candente sujeto a un intenso debate”**

antimicrobianos (esto incluye los antibióticos y los antimicrobianos). Además, el desarrollo del biofilm suele describirse como un escenario de entre tres y cinco etapas, empezando con células individuales que se adhieren a una superficie, maduración del biofilm y, por último, dispersión de las bacterias a partir del biofilm<sup>[11,12,13]</sup>. Las observaciones *in vitro* basadas en modelos celulares de flujo utilizando superficies de vidrio y medios de cultivo frescos oxigenados que fluyen continuamente sobre las bacterias difieren enormemente cuando se comparan con las condiciones presentes en las infecciones de heridas crónicas<sup>[14]</sup>. Aquí, las bacterias no se ven expuestas a un flujo continuo de medio fresco y no se encuentran adheridas a una superficie de vidrio (de hecho, no se encuentran adheridas a ninguna superficie)<sup>[6,10]</sup>. Los biofilms de heridas crónicas *in vivo* suelen estar encapsulados en una matriz, que incluye material del hospedador, haciendo que la dispersión sea problemática.

Por tanto, el uso de observaciones *in vitro* para definir, diagnosticar y tratar los biofilms en infecciones crónicas puede proporcionar una impresión equivocada<sup>[15]</sup>. No obstante, existen puntos en común entre las pruebas *in vitro* e *in vivo* que pueden ayudar a proporcionar una definición de biofilm. Estos incluyen:

- Agregados de bacterias.
- Algún tipo de matriz no formada estrictamente por materiales producidos por las propias bacterias, ya que también pueden estar originados por el hospedador.
- Tolerancia y protección extremas frente a la mayoría de los antimicrobianos y frente a las defensas del hospedador.

Sugerimos seguir esta definición simplificada para definir los biofilms en las infecciones crónicas: *agregado de bacterias tolerante al tratamiento y a las defensas del hospedador*.

#### **¿CÓMO LAS COMUNIDADES DE BIOFILM DIFIEREN DE LAS BACTERIAS PLANCTÓNICAS?**

Todas las bacterias planctónicas son células individuales que suelen presentar un crecimiento rápido y que rara vez se suelen observar directamente en infecciones, excepto en trastornos graves como la septicemia<sup>[14]</sup>. No obstante, suponemos que durante las infecciones agudas las bacterias son del fenotipo planctónico, ya que son susceptibles a los antimicrobianos con tratamientos focalizados que causan una resolución repentina de los síntomas.

Las pruebas *in vivo* han sugerido que los fenotipos del biofilm difieren notablemente tanto en su fisiología como en su actividad en comparación con las células planctónicas. Las bacterias se encuentran agregadas y son difíciles, si no imposibles, de tratar eludiendo de algún modo las defensas del hospedador<sup>[3,14]</sup>. A menudo, las bacterias se encuentran embebidas en una matriz que puede estar producida por las bacterias o tener su origen en el hospedador. La composición exacta de la sustancia polimérica extracelular (SPE) varía según los microorganismos que se encuentran presentes, pero suele comprender polisacáridos, proteínas, glucolípidos y ADN extracelular (ADNe)<sup>[16, 17, 18]</sup>.

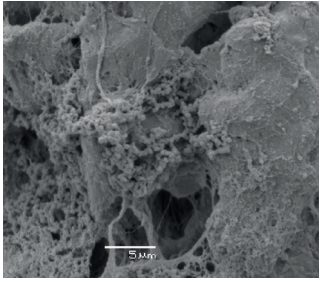
Estudios de microelectrodos han identificado regiones anóxicas en el biofilm, dando lugar a una baja actividad metabólica bacteriana<sup>[19,20,21]</sup>. Esto contribuye en parte a la resistencia inherente de los biofilms a los tratamientos con antibióticos.

#### **PREVALENCIA DE LOS BIOFILMS EN LAS HERIDAS CRÓNICAS**

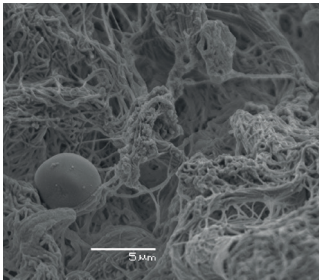
Menos de 10 estudios han visualizado biofilms en heridas crónicas no cicatrizantes utilizando enfoques aceptados de microscopía con o sin análisis molecular<sup>[6, 9,10,21-24]</sup>. Estos estudios han identificado la presencia de biofilms en entre el 60 % y el 100 % de las muestras. A la luz de la heterogeneidad y de la distribución espacial de los biofilms en las heridas crónicas, la incapacidad de las técnicas de muestreo para capturar el biofilm alojado en el tejido podría impedir ver una prevalencia "real" más cercana al 100 %<sup>[7,10]</sup>.

#### **DETECCIÓN DE LOS BIOFILMS EN LAS HERIDAS CRÓNICAS**

Hemos abordado estas cuestiones a la inversa, el motivo por el cual lo hemos hecho se hará evidente. Los métodos aceptados en la actualidad para visualizar los biofilms procedentes de muestras de tejido se han limitado principalmente al uso, por parte de los investigadores, de potentes microscopios (microscopía electrónica de barrido [scanning electron microscopy, SEM], microscopía confocal láser de barrido [confocal laser scanning microscopy, CLSM] de manera individual o en combinación con técnicas moleculares de secuenciación del ADN que utilizan sondas fluorescentes para determinar la presencia o ausencia de las bacterias, así como su localización. Incluso estos enfoques tienen limitaciones, en concreto,



**Imagen 1:** Biopsia tisular de una úlcera de pie diabético crónica y no cicatrizante, complicada por un biofilm y vista al microscopio electrónico de barrido. Se pueden observar los agregados de células microbianas con la producción de sustancia polimérica extracelular (SPE) que parece una malla o una tela de araña.



**Imagen 2:** Vista mediante microscopía electrónica de barrido de una úlcera de pie diabético con biofilm. Los microorganismos cocoides están rodeados por SPE que parece una red mallada.

la distribución homogénea de las bacterias en una herida. Esto hace que la elección del muestreo de la herida sea compleja. Una biopsia tisular es una prueba de referencia pero solamente recogerá bacterias de una zona pequeña, incrementando de manera significativa las posibilidades de que algunas bacterias de interés se pasen completamente por alto<sup>[7]</sup>. En comparación, utilizando hisopos superficiales con la técnica de Levine se pueden tomar muestras de una zona mayor pero solamente se recogerán las bacterias que se encuentran en la superficie de la herida, y esto puede no reflejar de manera necesaria la microbiota<sup>[25,26]</sup>.

Ha habido un intenso debate sobre si los biofilms, que son de naturaleza microscópica, se pueden observar a simple vista. En diferentes condiciones de salud y enfermedad en los seres humanos, cuando se dejan crecer los biofilms, pueden mostrar signos a nivel macroscópico, como por ejemplo la placa oral<sup>[27]</sup>. Sin embargo, la imagen es menos clara en las heridas crónicas. Algunos médicos han utilizado la retórica para promover lo que creen son 'señales clínicas' de la presencia de biofilms mediante observaciones a simple vista, que carecen de rigor científico<sup>[2,28,29]</sup>. Dichos signos incluyen una capa brillante, translúcida y babosa sobre la superficie de la herida no cicatrizante<sup>[28,29]</sup>, o presencia de escaras o fibrina y material gelatinoso que se vuelve a formar rápidamente tras su eliminación, en contraposición con escaras y otro tejido desvitalizado que necesita más tiempo para volver a formarse<sup>[29,30,31]</sup>.

En la actualidad, no hay una prueba diagnóstica de referencia que defina la presencia de biofilm en las heridas y no se dispone de biomarcadores cuantificables. Esto puede suponer una dificultad clínica significativa dado que la distinción entre la patogenia del fenotipo planctónico o en biofilm en la infección de heridas crónicas es una barrera de gran importancia para un tratamiento eficaz.

De acuerdo con nuestra afirmación anterior de que "todas las heridas crónicas no cicatrizantes pueden albergar biofilms", no es necesario basarse en signos visuales anecdóticos. Proponemos que los médicos deben "suponer que todas las heridas crónicas no cicatrizantes y que no han respondido al tratamiento de referencia tienen biofilm" y, por tanto, los tratamientos se deben dirigir en este sentido. Sugerimos que la sospecha médica de la presencia de biofilm se plantee en aquellos pacientes en los que las infecciones de heridas crónicas no han respondido de manera adecuada a los antimicrobianos ni al tratamiento estándar de las heridas, o en los que las infecciones de heridas crónicas experimenten periodos de quiescencia que alternan con episodios agudos<sup>[32]</sup>. Estos signos y síntomas se basan en pruebas actuales que identifican que los biofilms no se pueden erradicar con el uso de antimicrobianos, por lo que es justo suponer que una herida crónica no cicatrizante contiene bacterias con el fenotipo de biofilm.

### ¿CÓMO INHIBEN LOS BIOFILMS LA CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS?

Los mecanismos exactos mediante los cuales el biofilm altera los procesos de cicatrización de las heridas siguen siendo ambiguos. Los datos actuales sugieren que la herida se mantiene en un estado inflamatorio en forma de círculo vicioso que impide que se produzcan los ciclos normales de cicatrización de las heridas. Las vías que subyacen a este hecho no están claras, pero diferentes factores sistémicos y locales contribuyen a la aparición y mantenimiento de una herida crónica. A nivel sistémico, los factores fisiológicos incluyen diabetes mellitus, insuficiencia venosa, malnutrición, neoplasia maligna, edema, traumatismo repetitivo en el tejido y alteración de la respuesta del hospedador. La mayoría de las heridas crónicas cicatrizarán si los factores predisponentes se tratan de manera adecuada. Por ejemplo, reducción del edema en las úlceras venosas de las piernas, descargas de úlceras de pie diabético y úlceras por presión, junto con principios de cicatrización de heridas húmedas.

A nivel local, las bacterias colonizan todas las heridas crónicas. Las que se han notificado con mayor frecuencia son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, dos renombradas formadoras de biofilms. En un artículo de Gjødsbølk et al.,<sup>[33]</sup> el 93,5 % de las úlceras crónicas de las piernas contenían *S. aureus* y el 52,2 % albergaban *P. aeruginosa*, pero solamente las úlceras con *P. aeruginosa* se caracterizaban por un mayor tamaño de la herida y una menor velocidad de cicatrización. Esto se podría explicar por la capacidad de la *P. aeruginosa* para eliminar los leucocitos polimorfonucleares (PMN) secretando ramnolípido<sup>[34]</sup>. Este glucolípido se controla mediante el sistema de detección de quórum y es probablemente uno de los principales mecanismos tras la no erradicación de la *P. aeruginosa* en heridas crónicas.

En la ampliación del papel de los PMN, Ennis et al., (2000)<sup>[26]</sup> afirmaron que las heridas

*“Proponemos que los médicos deben ‘suponer que todas las heridas crónicas no cicatrizantes y que no han respondido al tratamiento de referencia tienen biofilm’ y, por tanto, los tratamientos se deben dirigir en este sentido”*

#### **Cuadro 1 Biofilms: desafiando las prácticas actuales de tratamiento de las heridas**

Los Biofilms presentan diferentes retos para el tratamiento tradicional de las heridas y su cicatrización. En primer lugar, localizar los biofilms en el lecho de la herida puede ser difícil y los médicos suelen limitarse a desbridar las zonas que tienen signos secundarios de biofilms, lo que es el material necrótico de la herida y otros signos superficiales de inflamación local.

En segundo lugar, el muestreo óptimo de las regiones superficial y subsuperficial del lecho de la herida es difícil y las bacterias se distribuyen de manera muy heterogénea. Por tanto, la identificación de las bacterias que componen el biofilm es un reto porque el laboratorio de microbiología clínica estándar no es consciente de la naturaleza más compleja de los biofilms y no procesa las muestras de las heridas para dispersar de manera adecuada los biofilms a fin de que las bacterias se puedan cultivar en ensayos estándar de crecimiento en placa.

Los biofilms interfieren con la cicatrización normal de las heridas al bloquear el lecho de la herida en un estado inflamatorio crónico que da lugar a niveles elevados de proteasas (metaloproteasas de la matriz y elastasas de neutrófilos) y de especies reactivas del oxígeno (ROS) que dañan las proteínas y las moléculas esenciales para la cicatrización. Un gran porcentaje de las bacterias en las comunidades de los biofilms son metabólicamente latentes, lo que genera tolerancia a los antibióticos. Las moléculas desinfectantes con una alta reactividad química reaccionan con frecuencia con los componentes de la matriz exopolimérica del biofilm, reduciendo su concentración e impidiendo su penetración hacia dentro de la matriz del biofilm.

crónicas se encontraban "encalladas en la fase inflamatoria de la cicatrización". En las vías normales de cicatrización de las heridas, esta fase vendría seguida por una fase proliferativa, en la que la función de los PMN se sustituiría de forma gradual por los macrófagos, y los fibroblastos comenzarían a reconstruir el tejido<sup>[26]</sup>.

Por tanto, las consecuencias de la necrosis sostenida *in situ* por las células bacterianas podría explicar tanto la llegada constante de PMN a las heridas crónicas con *P. aeruginosa* como la resultante liberación localizada de enzimas proteolíticas que son proinflamatorias<sup>[35]</sup>. Por desgracia, no podemos postular el mecanismo responsable de este fenómeno en las heridas que no están infestadas por *Pseudomonas*<sup>[36]</sup>.

En 2015, Marano et al.,<sup>[37]</sup> identificaron que la migración y proliferación de los queratinocitos epidérmicos humanos se encontraba reducida debido a derivados de los biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Empleando el análisis proteómico, Marano et al. pudieron mapear la actividad del *S. aureus* a una proteína, mientras que la actividad de la *P. aeruginosa* se podía deber con mayor probabilidad a una pequeña molécula<sup>[37]</sup>. Las diferentes proteínas reveladas mediante análisis proteómico tienen vínculos cuestionables con el retraso en la cicatrización de las heridas. Estas incluían la  $\alpha$ -hemolisina, alcohol deshidrogenasa, fructosa-bisfosfato aldolasa, lactato deshidrogenasa y el inhibidor de la diferenciación de las células epidérmicas.

Una segunda área de investigación de interés ha sugerido que los biofilms bacterianos infecciosos contribuyen a una tensión baja de oxígeno localizada en la herida. Los primeros estudios *in vitro* con microelectrodos identificaron zonas discretas de reducción significativa del oxígeno en los biofilms<sup>[38]</sup>. Estudios adicionales con microelectrodos con CLSM identificaron microdominios con diferentes zonas del biofilm que albergaban entornos bioquímicos alternativos, incluidas alteraciones en el pH y en el oxígeno<sup>[39]</sup>. La creación de zonas anóxicas en el biofilm puede explicar la presencia de anaerobios en biofilms con mezcla de especies. Las condiciones anóxicas también se han observado en infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ<sup>[40]</sup>. En un pulmón con FQ con infección crónica, se ha observado que los PMN consumen principalmente el oxígeno, dando lugar a una reducción del mismo que ahoga a las bacterias, lo que ocasiona una menor actividad metabólica<sup>[19,20]</sup>.

En datos de 2016 de James y colaboradores se proporcionan más pruebas que apoyan un concepto de tensiones bajas de oxígeno localizadas que contribuyen a la cronicidad de las heridas<sup>[21]</sup>. Mediante el uso de microsensores de oxígeno y transcriptómica (examinando las actividades metabólicas de los microorganismos) para estudiar los biofilms *in situ*, James y colaboradores identificaron gradientes pronunciados de oxígeno y respuestas de estrés inducidas por la limitación de oxígeno en las bacterias. Tomados de forma conjunta, estos datos respaldan el concepto de que el biofilm ayuda a mantener tensiones bajas de oxígeno localizadas en la herida, contribuyendo así a la cronicidad<sup>[21]</sup>.

La presencia de biofilms altamente persistentes da lugar a un estado inflamatorio crónico en el lecho de la herida que puede dar lugar a niveles elevados de proteasas (metaloproteasas de la matriz y elastasa de neutrófilos) y de especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species, ROS) que dañan las proteínas y las moléculas vitales para la cicatrización<sup>[41]</sup>. Al bloquear el lecho de la herida en un estado inflamatorio crónico, los biofilms alteran la cicatrización normal de la herida.

Nuestra comprensión actual de cómo los biofilms inhiben la cicatrización sigue siendo limitada, pero los dos ejemplos anteriores postulan cómo se puede retardar la cicatrización de las heridas. También es evidente que los factores sistémicos contribuyen a una situación actual paradójica. Es posible que, en algunos casos, el biofilm bacteriano sea el inhibidor principal de la cicatrización de la herida. Sin embargo, en otras circunstancias, algunas de estas heridas cicatrizarán si se trata la causa original de la herida (p. ej., tratamiento de compresión para una úlcera venosa en la pierna o descargas de úlceras de pie diabético). De todos modos, algunas heridas crónicas no cicatrizarán a pesar del tratamiento adecuado de la alteración local. Puesto que pueden tener un contenido bacteriano especialmente virulento.

El esquema circular de la herida (Figura 1) ilustra esta paradoja. La fuerza que impulsa el movimiento en sentido horario es la suma de la virulencia de las bacterias, mientras que la figura del centro que impulsa el movimiento en sentido antihorario representa la suma de la capacidad de cicatrización del paciente. Cuanto más sano está el paciente (de manera local y sistémica), más virulenta tiene que ser la bacteria para impedir o detener la cicatrización. Esto implica que los pacientes "débiles" sufrirán incluso las infecciones más oportunistas. El tratamiento actual de las heridas crónicas pretende reducir la alteración local mediante modalidades como la compresión, la descarga y los apósitos de heridas húmedas. Además, las deficiencias sistémicas se tratan mediante la corrección del paciente malnutrido o mediante el ajuste de los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c).

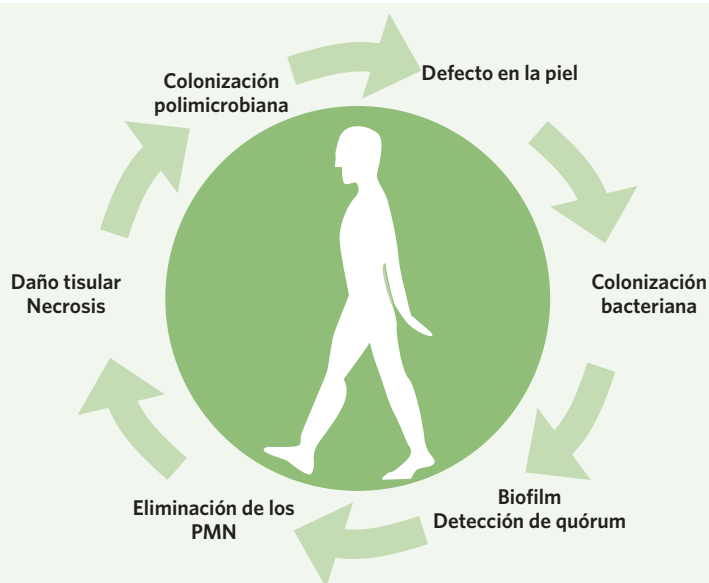
### CONCLUSIÓN

En este estudio se hace evidente que el diagnóstico, el tratamiento y la comprensión del papel que desempeñan los biofilms en la cronicidad de las heridas se encuentra aún en sus fases iniciales. El esfuerzo científico en este nicho está cogiendo ritmo a medida que aumentan las pruebas que sugieren que estamos en el camino correcto. Cada vez se acepta más que las heridas crónicas no cicatrizantes contienen biofilms y que estas retrasan o evitan de algún modo la cicatrización de las heridas. Una investigación más centrada que garantice la estandarización entre las metodologías de estudio, como las técnicas de muestreo óptimo, garantizará la comparabilidad entre los estudios. Son necesarios nuevos paradigmas de tratamiento, pero para ello se necesita el desarrollo de modelos *in vitro* que imiten el ambiente real de las heridas.

Por último, se necesitan más colaboraciones interdisciplinarias entre los médicos de primera línea y los científicos encargados de la investigación básica para cerrar la brecha entre lo que es clínicamente importante para los pacientes que sufren las complicaciones relacionadas con los biofilms.

**Figura 1 | Esquema circular de la herida**

El esquema circular de la herida (Figura 1) ilustra la paradoja de las heridas crónicas: ¿por qué algunos pacientes desarrollan heridas crónicas y otros no? La persona del centro está forzando a que la rueda gire en sentido antihorario y la fuerza impulsora de la rueda externa es la virulencia combinada de las bacterias. Por tanto, cuanto más fuerte sea la persona, más virulencia se necesita para que las bacterias impidan la cicatrización. Consulte el texto para obtener una explicación más detallada.





## BIBLIOGRAFÍA

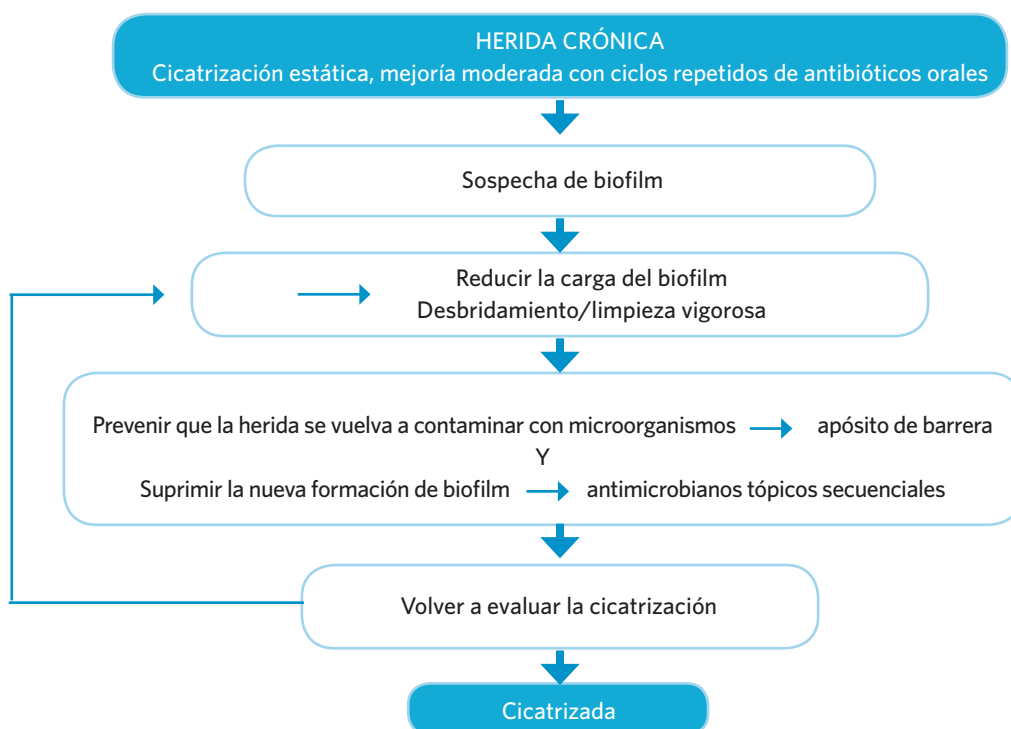
1. Gottrup F, Apostoli J, Bjarnsholt T et al (2013). EWMA documento: Antimicrobials and non-healing wounds. Evidence, controversies and suggestions. *J Wound Care* 2012; 22(5 Suppl): S1-89.
2. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. *J Wound Care* 2014; 23(3): 137-2.
3. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21 Suppl 1: S1-25.
4. Lipsky BA, Aragon-Sanchez J, Diggle M et al. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2015; 32(Suppl 1): 45-74.
5. Dowd SE, Sun Y, Secor PR et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):1.
6. James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 37-44.
7. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB et al. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1): 38-49.
8. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli et al. Biofilms in chronic infections — a matter of opportunity — monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59(3): 324-36.
9. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K et al. Non-Random Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12): 4084-9.
10. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2717-22.
11. Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-22.
12. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184(4): 1140-54.
13. Klausen M, aes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 50(1): 61-8.
14. Bjarnsholt T, Alhede, M, Eckhardt-Sorensen SR et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol* 2013; 21(9): 466-74.
15. Roberts AE, Kragh KN, Bjarnsholt T, Diggle SP. The Limitations of in vitro experimentation in understanding biofilms and chronic infection. *J Mol Biol* 2015; 427(23): 3646-61.
16. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147(Pt 1): 3-9
17. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11(7): 1034-43
18. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007; 189(22): 7945-47
19. Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; 65(1): 57-62.
20. Kragh KN, Alhede M, Jensen PØ et al. Polymorphonuclear leukocytes restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 2014; 82(11): 4477-86.
21. James GA, Zhao AG, Usui M et al (2016). Microsensor and transcriptomic signatures of oxygen depletion in biofilms associated with chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2016; doi: 10.1111/wrr.12401.
22. Han A, Zenilman JM, Melendez JH et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2011; 19(5): 532-41.
23. Neut D, Tjeldens-Creusen EJ, Bulstra SK et al. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers — a study of 2 cases. *Acta Orthop* 2011; 82(3): 383-385.
24. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, et al (2014). The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *J Diabetes Res* 2014, 153586.
25. Levine NS, Lindberg RB, Mason Jr AD, Pruitt Jr BA. The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *J Trauma* 1976; 16(2): 89-94.
26. Ennis WJ, Meneses P. Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy Wound Manage* 2000; 46(1A Suppl): 39S-48S.
27. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15(3): 169-75.
28. Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *J Wound Care* 2011; 20(11): 534, 536-34, 539.
29. Hurlow J, Bowler PG. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care* 2012; 21(3): 109-10, 112, 114.
30. Phillips P L, Fletcher J, Shultz G S. *Biofilms Made Easy*. Wounds International 2010; 1(3): 1-6.
31. Hurlow J, Bowler PG. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series. *Ostomy Wound Manage* 2009; 55(4): 38-49.
32. Costerton W, Veeh R, Shirliff M et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1466-77.
33. Gjødsbølk K, Christensen JJ, Karlsmark T et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; 3(3):225-31.
34. Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2007; 153(Pt 5): 1329-38.
35. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd S E. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care* 2008; 17(8): 333-41.
36. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 2-10.
37. Marano RJ, Wallace HJ, Wijeratne D et al. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Scientific Rep* 2015; 17;5: 13296.
38. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43(11): 1131-8.
39. Lawrence JR, Swerhone GD, Kuhlicke U, Neu TR. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can J Microbiol* 2007; 53(3): 450-8.
40. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109(3): 317-325.
41. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4):41-20.

# Tratamiento del biofilm en la práctica

La prevención y el tratamiento de los biofilms en las heridas crónicas se está convirtiendo rápidamente en un objetivo principal en el tratamiento de las heridas, habiéndose aceptado la presencia de los biofilms como la causa principal del retraso en la cicatrización de las heridas<sup>[1-4]</sup>.

La Figura 1 ilustra los principios básicos del tratamiento de las heridas para los casos en los que estas se han estancado durante la cicatrización a pesar del tratamiento repetido con antibióticos y, por lo tanto, se puede sospechar la presencia de biofilm. Este artículo examina cuándo tratar la sospecha de un biofilm, las diferentes estrategias para su prevención y tratamiento, cómo se pueden combinar estas estrategias para obtener el mejor éxito posible y los principios para supervisar este éxito.

**Figura 1 |**  
Principios básicos del tratamiento de las heridas<sup>[5]</sup>



**Jacqui Fletcher,**  
Consultora de Enfermería  
Independiente, Reino Unido;

**Randall D Wolcott,**  
Presidente, Asociación  
Profesional y Laboratorio  
de Investigación y Pruebas  
de las Llanuras del Sur,  
Texas, EE. UU. y **Isabelle  
Fromantin,** Experta en  
heridas y cicatrización,  
Institut Curie, Francia

Mientras las infecciones agudas tienden a producir los signos y síntomas clásicos de la infección de las heridas, como inflamación, dolor, calor, enrojecimiento e inflamación<sup>[6]</sup>, los microorganismos que crecen en forma de biofilm producen un patrón distintivamente diferente, que se suele reconocer como infección crónica<sup>[7]</sup>.

Se necesitan estrategias de tratamiento sistémico para las heridas crónicas infectadas, mientras que en las heridas no infectadas en las que la presencia del biofilm impide la cicatrización se pueden adoptar estrategias para romper el biofilm. De forma alternativa, se puede intentar impedir la formación del biofilm inicial en pacientes o heridas que se consideren en alto riesgo<sup>[8]</sup>.

Se pueden utilizar tratamientos focalizados para mejorar la cicatrización en los casos en que el biofilm microbiano sea un componente causal de las heridas crónicas, a diferencia de una colonización no patógena, por ejemplo:

- Uso temprano de antibióticos sistémicos dirigidos a las bacterias planctónicas.
- Estrategias exclusivas para hacer que los microorganismos sean más susceptibles a los antimicrobianos, para que el sistema inmunitario del hospedador los elimine.
- Tratamientos dirigidos a impedir un componente inflamatorio prolongado de la cicatrización de las heridas<sup>[9]</sup>.

Con esto en mente, es importante que se desarrollen nuevas estrategias para impedir la formación de biofilms y mejorar su tratamiento<sup>[3]</sup>, que incluyen:

- Acción preventiva, que interfiera con la adhesión microbiana o con los procesos implicados en la maduración del biofilm, o la eliminación y/o desorganización del biofilm maduro.
- Acción contra el biofilm existente, eliminación o rompimiento del biofilm y prevención de su nueva formación.

### CUÁNDO TRATAR UN BIOFILM

La experiencia en el tratamiento de las heridas crónicas, en especial en las estrategias para tratar las heridas infectadas y reconocer el biofilm, es esencial para garantizar que los pacientes reciban el tratamiento óptimo. La puntuación de las heridas en riesgo (Wounds at Risk, WAR) se ideó para ayudar en la toma de decisiones sobre el uso de antimicrobianos (específicamente de la polihexanida) cuando no había con anterioridad ningún método para predecir de forma precisa el riesgo de infección de las heridas crónicas. El sistema de puntuación considera la cantidad y la virulencia de la carga biológica de una herida y la competencia inmunitaria del paciente, pero no proporciona apoyo para el reconocimiento del biofilm ni sugerencias para el desbridamiento. La existencia de diagnósticos para apoyar la detección del biofilm puede hacer que la puntuación WAR sea más útil<sup>[10]</sup>.

La identificación real del biofilm requiere técnicas sofisticadas de laboratorio, como microscopía confocal láser de barrido (CLSM), microscopía electrónica de barrido (SEM) o técnicas moleculares para su definición<sup>[11]</sup>. Los procedimientos estándar de cultivo microbiológico solamente detectan bacterias planctónicas, por lo que debe utilizarse un proceso diferente para detectar las bacterias de los biofilms. Por lo general, las muestras se tratan inicialmente para matar todas las bacterias planctónicas, luego se dispersa físicamente el biofilm con energía ultrasónica y se cultiva en placas de agar con nutrientes para determinar el grado de presencia del biofilm<sup>[5]</sup>.

La identificación del biofilm en la práctica clínica también es difícil y solamente se dispone de unas cuantas directrices para facilitar su reconocimiento. Keast et al. (2014)<sup>[5]</sup> proponen cuatro características principales que pueden incrementar la sospecha de la presencia del biofilm:

1. Fracaso de los antibióticos.
2. Infección con una duración >30 días.
3. Tejido de granulación friable.
4. Se puede eliminar con facilidad material gelatinoso de la superficie de la herida que se vuelve a formar con rapidez.

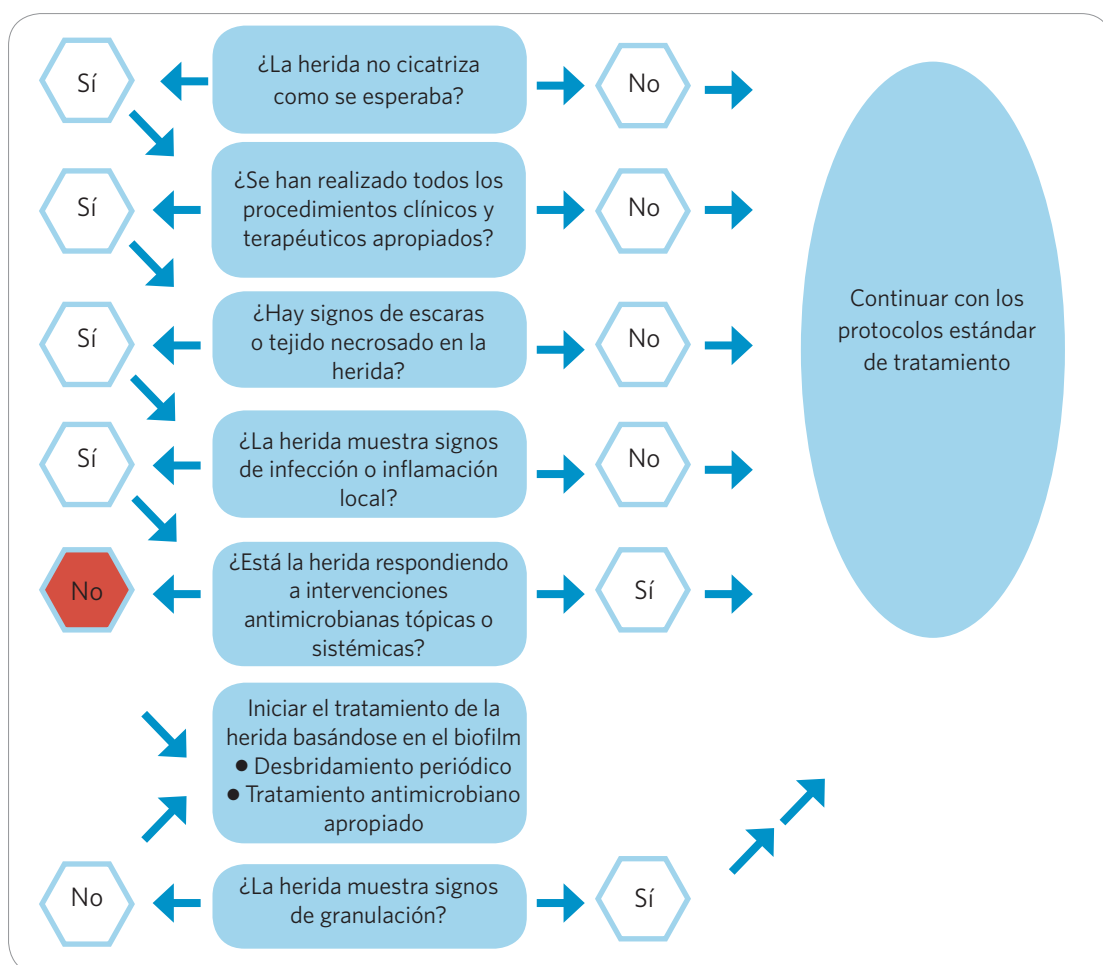
Un estudio reciente que recopiló datos actuales referentes al aspecto, comportamiento e indicadores clínicos asociados con el biofilm sugirió que, en ocasiones, pueden haber pistas visuales que sugieran la presencia de biofilm en el lecho de la herida. También se identificaron diversas pistas clínicas no visuales: signos de infección local, fracaso de los antimicrobianos, hisopos con resultado negativo en el cultivo o recalcitrancia de la herida a pesar de haberse abordado todos los demás factores. Los autores sugirieron que un algoritmo que incorporase tanto las pistas visuales como las no visuales podría facilitar un tratamiento más eficaz de la herida más con biofilm<sup>[12]</sup>.

Sin embargo, hasta la fecha no hay pruebas de que el biofilm tenga un aspecto de "capa babosa" en la superficie de la herida, de modo que Percival et al. (2015)<sup>[13]</sup> argumentan que, en ausencia de cualquier prueba científica de este tipo, la manifestación de una capa

translúcida con un aspecto baboso puede ser un marcador visual rudimentario y, con frecuencia, engañoso. Proponen un enfoque para la identificación de los biofilms similar al de Keast et al.<sup>[5]</sup>, basado en las preguntas jerárquicas siguientes. Cuando la respuesta es "no", se debe seguir con el tratamiento estándar, y cuando la respuesta es "sí", se pasa a la siguiente pregunta. Si la respuesta a la pregunta 5 es "no", se debe iniciar el tratamiento de la herida basándose en el biofilm (Figura 2)<sup>[13]</sup>.

1. ¿La herida no cicatriza como se esperaba?
2. ¿Se han realizado todos los procedimientos clínicos y terapéuticos apropiados?
3. ¿Hay signos de escaras o tejido necrosado en la herida?
4. ¿La herida muestra signos de infección o inflamación local?
5. ¿Está la herida respondiendo a intervenciones antimicrobianas tópicas o sistémicas?

**Figura 2 |**  
**Algoritmo**  
**para detectar**  
**la presencia de**  
**biofilm<sup>[13]</sup>**



### CÓMO TRATAR UN BIOFILM

#### Estrategias para la prevención y tratamiento del biofilm

Una vez se establece la probabilidad de la presencia del biofilm, se debe determinar una estrategia de tratamiento apropiada, teniendo en cuenta que existen diferentes etapas en la formación del biofilm. Un enfoque proactivo para el tratamiento reconoce que no existe una solución en un solo paso para tratar el biofilm, sino que el objetivo es reducir la carga y evitar que se vuelva a formar<sup>[14]</sup>.

Wolcott (2015)<sup>[15]</sup> afirma que: 'El tratamiento de las heridas con biofilm se basa en el uso de múltiples estrategias de tratamiento diferentes de manera simultánea, incluidos antibióticos, fármacos contra los biofilms, antimicrobianos selectivos y desbridamiento frecuente'. Asimismo, Hurlow et al. (2015)<sup>[16]</sup> advierten que aunque es primordial centrar la actividad

Tabla 1: Posibles agentes contra la formación de biofilms		
Modo de acción	Ejemplos	Más información
Interferencia con la adhesión a la superficie del biofilm	Lactoferrina Ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) Xilitol Miel	Como parte del mecanismo de respuesta humano innato, la lactoferrina se une a las paredes de las células provocando su desestabilización, filtración y, en última instancia, la muerte de la célula <sup>[17]</sup> . El EDTA se ha utilizado como un permeabilizante y sensibilizante para los trastornos causados por los biofilms en odontología y en otros campos <sup>[18]</sup> . También se ha observado que el xilitol (un edulcorante artificial) y la miel bloquean la adhesión <sup>[17]</sup>
Interferencia con la detección de quórum, un mecanismo de señalización química o comunicación entre las células del biofilm	Farnesol Iberina Ajoeno Miel de Manuka	Diversos agentes bloquean o interfieren con la detección de quórum, incluidos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Farnesol</li> <li>• Iberina (del rábano picante)</li> <li>• Ajoeno (del ajo)</li> </ul> También se ha observado que la miel de Manuka inhibe 3 de los 4 genes responsables del proceso de detección de quórum <sup>[17]</sup>
Rompimiento de la sustancia polimérica extracelular (SPE), una matriz protectora secretada por el biofilm y que rodea al mismo	EDTA	El EDTA es compatible con los antimicrobianos tópicos y potencia su acción al desorganizar la SPE en la que los microorganismos se encuentran encerrados <sup>[18]</sup> . También existen productos patentados que afirman que, entre otras acciones, son capaces de romper la SPE <sup>[19]</sup>
Metabolitos falsos	Galio, xilitol	Se ha observado que dosis bajas de galio y xilitol interfieren con la formación del biofilm <sup>[20]</sup>
Rompimiento del biofilm existente	Betaína (combinación de PHMB y betaína)	Las soluciones actuales que favorecen el rompimiento del biofilm contienen tensioactivos, como la betaína, que reducen la tensión superficial del medio en el que se encuentran disueltos lo que permite que se puedan desprender los restos y suspenderse en la solución <sup>[21,22]</sup>

frente al biofilm, también se debe abordar la maximización de la respuesta del hospedador prestando atención a todas las causas locales y subyacentes que retrasen la cicatrización de la herida.

#### *Posibles agentes contra la formación de biofilms*

En la práctica, la alteración física del biofilm en forma de desbridamiento y/o limpieza, seguida del uso de antimicrobianos (como PHMB o plata) para evitar que se vuelva a formar es la opción principal para combatir el biofilm de la que disponen los médicos en la actualidad. Esto se trata con mayor detalle a continuación<sup>[4]</sup>. No obstante, se han investigado diferentes posibles fármacos contra los biofilms que interfieren con los elementos necesarios para su formación o soporte y que potencian el efecto de los antimicrobianos. Estos se resumen en la Tabla 1, clasificados por sus modos de acción. Cuando se elige un fármaco de este tipo, esta elección debe basarse en factores que incluyen la capacidad biocida y la duración de la actividad del fármaco activo, así como la capacidad del vendaje portador para tratar los síntomas que se presenten, tales como un aumento del exudado.

#### *La importancia de la preparación del lecho de la herida*

La preparación del lecho de la herida, incluida la limpieza y el desbridamiento, son principios importantes del tratamiento de la herida, puesto que las heridas deben estar limpias para que cicatricen<sup>[23]</sup>. El concepto de TIME (tejido, infección/inflamación, humedad, borde de la herida, por sus siglas en inglés [Tissue, Infection/Inflammation, Moisture, Edge of wound]) es un estándar ampliamente aceptado para el tratamiento de las heridas. En los últimos 10 años se han producido avances importantes, incluida la comprensión de la presencia del biofilm (y la necesidad de un diagnóstico sencillo), la importancia del reconocimiento clínico de la infección y el valor en el desbridamiento repetitivo y de mantenimiento, así como la limpieza de las heridas, que es primordial<sup>[11]</sup>.

En los casos en los que se observen escaras o necrosis en una herida, este tejido no viable se debe eliminar, ya que puede facilitar la adhesión y desarrollo del biofilm<sup>[24]</sup>. La velocidad de la eliminación del tejido se debe realizar de acuerdo con la capacidad del paciente de someterse al procedimiento, la habilidad y competencia del profesional sanitario y la seguridad del entorno en el que se va a realizar la técnica<sup>[25]</sup>. Recientemente se ha hecho una distinción entre la eliminación de las escaras (eliminación de esfáculos)<sup>[24]</sup> y la eliminación

del tejido necrótico (desbridamiento). Para garantizar la efectividad se ha propuesto que no se realice ninguno de los dos tratamientos en solitario, sino que se recomienda tanto el desbridamiento de mantenimiento como la eliminación de esfacelos.

Hay disponibles varias técnicas de desbridamiento, desde quirúrgicas (realizadas en quirófano, en las que se vuelve al tejido con sangrado sano) y autolíticas (uso de apósitos para facilitar la eliminación de tejido necrótico<sup>[23-24]</sup>) mediante gasas y paños de desbridamiento<sup>[26,27]</sup>. Las soluciones de limpieza actuales que favorecen el rompimiento del biofilm contienen tensioactivos, que reducen la tensión superficial del medio en el que están disueltos, facilitando el desprendimiento de la suciedad o de los restos y su suspensión en la solución, para evitar que la herida se vuelva a contaminar<sup>[21,22]</sup>. Se pueden añadir soluciones directamente a la herida, utilizadas como paños o gasas o utilizadas como parte de una instilación junto con tratamiento de las heridas con presión negativa<sup>[28]</sup>.

De acuerdo con la bibliografía actual, se ha identificado que la combinación de polihexanida y betaína, un tensioactivo, es eficaz para el desbridamiento autolítico de la herida. En un ensayo aleatorizado y controlado realizado en seis centros italianos (de junio de 2010 a diciembre de 2013), se observó que la solución promovía la preparación del lecho de la herida, reducía los signos de la inflamación y aceleraba la cicatrización de las úlceras vasculares en las piernas, así como también tenía un efecto de barrera duradero. De hecho, en comparación con la solución salina normal, la solución era superior de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) en términos de mejora de la herida y reducción de los signos de la inflamación<sup>[23]</sup>.

#### *Uso de antimicrobianos tras el desbridamiento para evitar que el biofilm se vuelva a formar*

Una vez la herida se ha limpiado de manera adecuada y se ha eliminado el máximo de tejido no viable según tolere el paciente, se sugiere que se utilice un producto antimicrobiano para evitar que se vuelva a formar el biofilm (Figura 1)<sup>[5]</sup>. Por ejemplo, apósitos contra el biofilm que contengan antimicrobianos como PHMB, plata o un tensioactivo<sup>[29]</sup>. Se han relacionado con el tratamiento de los biofilms diferentes fármacos antimicrobianos:

- Ácido acético<sup>30]</sup>
- Miel<sup>[3,31]</sup>
- Yodo<sup>[18,32-34]</sup>
- PHMB<sup>[18,35]</sup>
- Plata<sup>[18,33-36]</sup>.

Es importante destacar que estos deben usarse después del rompimiento físico del biofilm mediante limpieza (es decir, con una solución que contenga un tensioactivo combinado con un antimicrobiano, tal como PHMB con betaína) y del desbridamiento, con el fin de asegurar la eficacia antimicrobiana (Figura 1). Asimismo, otros productos sin antimicrobiano activo han demostrado una actividad contra los biofilms, como los productos que actúan uniendo las bacterias a apósitos recubiertos con cloruro de dialquilcarbamoilo (DACC)<sup>[37]</sup>. Los microorganismos se eliminan junto con el apósito y no quedan restos de células en la herida<sup>[38]</sup>.

#### **CÓMO SUPERVISAR EL ÉXITO**

No es posible decir de manera definitiva cuándo se ha eliminado un biofilm, puesto que no existen signos categóricos ni análisis para su identificación. Como tal, los médicos deben utilizar la progresión de la cicatrización como un marcador del éxito, teniendo en cuenta también la reducción de otros parámetros como los niveles de escaras y la producción de exudado<sup>[14]</sup>. De hecho, al medir el resultado del tratamiento de la herida con biofilm, se deben revisar los factores primarios que dan lugar a la sospecha inicial de biofilm:

- ¿La herida no cicatriza a pesar del tratamiento apropiado?
- ¿La herida muestra signos y síntomas de infección que no se resuelven con los antimicrobianos apropiados?
- ¿Hay presente material gelatinoso en la superficie de la herida y que no desaparece?

Si estos se han resuelto, se puede asumir que el plan de tratamiento ha sido satisfactorio.

Cualquier producto seleccionado se debe utilizar durante un periodo de tiempo apropiado y de manera continua durante un mínimo de entre 7 y 10 días antes de que se tome una decisión acerca de seguir con el uso del mismo o interrumpirlo. Un consenso reciente recomendó utilizar una exposición de 2 semanas para determinar la eficacia de un antimicrobiano (específicamente apósitos de plata). Tras 2 semanas se debe determinar si la herida ha mejorado y si sigue presente algún signo de infección<sup>[5]</sup>.

Se sugiere que una herida en la que se sospeche la presencia de biofilm se debe desbridar y limpiar de manera regular, ya que es difícil eliminar todo el biofilm, y este tiene la capacidad de volver a crecer y formar biofilm maduro en unos pocos días. Si una herida no progresa tras su tratamiento regular, puede ser necesario un enfoque más agresivo para eliminar el biofilm, con derivación a un especialista según sea necesario<sup>[39]</sup>.

### CONCLUSIÓN

El tratamiento apropiado del biofilm es sin duda una tarea compleja, con diferentes soluciones, geles y apósitos para su tratamiento, apoyados por la bibliografía y por la experiencia clínica. Los pasos básicos de prevención inicial (con fármacos contra la formación de biofilm), eliminación (limpieza, eliminación de esfáclos, desbridación) y prevención de la nueva formación (uso de un antimicrobiano) proporcionan un marco para el tratamiento del biofilm. Más allá de ello, se debe considerar un gran número de parámetros de pacientes, así como parámetros ambientales y clínicos para lograr una solución adaptada para cada paciente<sup>[40]</sup>.

Se puede utilizar la combinación de fármacos contra la formación de biofilm y de antimicrobianos para el tratamiento del biofilm en el mismo apósito o se pueden utilizar de manera sinérgica sus acciones al cambiar el apósito (por ejemplo, utilizando solución Prontosan/gel y Calgitrol Ag). Comprender y mantenerse al día con pruebas puede ser complejo, pero es una parte esencial de cualquier función médica para proporcionar un cuidado óptimo de las heridas al tiempo que se tiene en mente el tratamiento del biofilm. También es importante el tratamiento integral del paciente y abordar cualquier problema sistémico, fisiológico o psicosocial subyacente para apuntalar un tratamiento de referencia.

### BIBLIOGRAFÍA

1. James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 37-44.
2. Percival S, McCarty S and Lipsky B. Biofilms and wounds: *An overview of the evidence Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 373-381.
3. Cooper R, Bjarnsholt T and Alhede M. Biofilms in wounds: A review of present knowledge. *Journal of Wound Care* 2014 23(11): 570-582.
4. Thomson CH. Biofilms: do they affect wound healing? *Int W J* 2011; Feb 8(1):63-7. doi: 10.1111/j.1742-481X.2010.00749.x. Publicación electrónica en diciembre de 2010.
5. Keast D, Swanson T, Carville K, Fletcher J, Schultz G and Black J. Top Ten Tips: Understanding and managing wound biofilm. *Wound International* 2014; 5(20): 1-4.
6. Swanson T, Grothier L, Schultz G. *Wound Infection Made Easy*. Wounds International 2014. Disponible en: [www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com).
7. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe* 2010; 8(1):20-35.
8. Zhoa GE, Usui ML, Lippmann SI, et al. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; Sep 2(7): 389-399.
9. Wolcott. The role of Biofilm: Are we hitting the Right target? *Plast Reconstr Surg* 2011; Suplemento 127 de enero: 28S-35S).
10. Leaper D. Practice development - Innovations. Expert commentary. *Wounds International* 2010; 3(1): 19
11. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T and Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years? *Int W J* 2010; 9 (Supl. 2): 1-19.
12. Metcalf D, Bowler P, Hurlow J. *Development of an algorithm for wound biofilm identification*. Presentación en formato póster en la EWMA 2013. Disponible en: [http://old.ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/P314.pdf](http://old.ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/P314.pdf)

13. Percival SL, Vuotto C, Donelli G, Lipsky BA. Biofilms and Wounds: An identification algorithm and potential treatment options. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 389-397.
14. Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, et al. *Biofilms Made Easy*. Wounds International 2010; 1(3): S1-S6.
15. Wolcott R. Economic aspects of biofilm based wound care in diabetic foot ulcers. *Journal of Wound Care* 2015; 24(5): 189-194.
16. Hurlow J, Couch K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D and Bowler P. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in Wound Care* 2015; 4(5): 295-301.
17. Cooper R, Jenkins L and Hooper S. Inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by medihoney in vitro. *J Wound Care* 2014; 23(3): 93-104.
18. Finnegan S and Percival SL. EDTA: An antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 415-421.
19. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound outcomes. *J Wound Care* 2015; 24(8): 366-371.
20. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008; Nov 17(11):50-8.
21. Bradbury S and Fletcher J. *Prontosan Made Easy*. Wounds International 2011; 2(2).
22. *JWC Wound Care Handbook 2016-2017*. Londres 2016. MA Healthcare Limited.
23. Bellingeri A et al. Effect of a wound cleansing solution on wound bedpreparation and inflammation in chronic Wounds: a single-blind RCT. *J Wound Care* 2016; 25: 3, 160-168.
24. Percival and Suliman. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. *Journal of Wound Care* 2015; 24(11): 498-510.
25. Vowden K and Vowden P. *Debridement Made Easy*. Wounds UK 2011; 7(4).
26. *Debrisoft: Making the case*. Wounds UK 2015. Londres.
27. Downe A. How wound cleansing and debriding aids management and healing. *Journal of Community Nursing* 2014; 28(4): 33-37.
28. Rycerz A, Vowden K, Warner V, Jørgensen BF. *VAC Ulta NPWT System Made Easy*. Wounds International 2012; 3(3).
29. Metcalf DG, Parsons D, Bowler PG. Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm. *IWJ* 2016; Mar 1.
30. Bjarnsholt T, Alhede M, Østrup Jensen P, Nielsen AK, Krogh Johansen H, Homøe P, Høiby N, Givskov M and Kirketerp-Møller K. Antibiofilm properties of acetic acid. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 363-372.
31. Halstead FD, Webber MA, Rauf M, Burt R, Dryden M, and Oppenheim BA. In vitro activity of an engineered honey, medical grade honeys and antimicrobial wound dressings against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of Wound Care* 2016; 25(2): 93-102.
32. Hoekstra MJ, Westgate SJ, Mueller S. Povidone-iodine ointment demonstrates in vitro efficacy against biofilm formation. *International Wound Journal* 2016; doi: 10.1111/iwj.12578. [Publicación electrónica antes de la impresión]
33. Percival SL, Finnegan S, Donelli G, Vuotto C, Rimmer S, Lipsky BA (2016) Antiseptics for treating infected wounds: Efficacy on biofilms and effect of pH. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42(2): 293-309.
34. Thorn RM, Austin AJ, Greenman J, Wilkins JP, Davis PJ (2009). In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *Journal of Wound Care* 2009; 18(8): 343-6.
35. Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *Journal of Wound Care* 2011; 20(11): 534-539.
36. Percival S and McCarty S. Silver and alginates: Role in wound healing and biofilm control. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 407-414.
37. Cooper R and Jenkins L. Binding of two bacterial biofilms to dialkyl carbamoyl chloride (DACC) - coated dressings in vitro. *Journal of Wound Care* 2016; 25(2): 6-82.
38. Butcher M. Catch or kill. How DACC technology redefines antimicrobial management. *Br J Comm Nurs* 2011 (Suppl).
39. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17(4): 145-55.
40. *International consensus*. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. Londres: Wounds International, 2012. Disponible para su descarga en: [www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com).



# Investigación de los biofilms: llenar las lagunas en el conocimiento de las heridas crónicas

## Greg Schultz,

Instituto de Investigación de las Heridas, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Florida, EE. UU.;

## Thomas Bjarnsholt,

Costerton Biofilm Center, Departamento de Inmunología y Microbiología, Facultad de la Salud y Ciencias Médicas, Universidad de Copenhague, Dinamarca; Departamento de Microbiología Clínica, Rigshospitalet, Dinamarca;

## Klaus Kirketerp-Møller,

Centro de cicatrización de heridas de Copenhague, Hospital Universitario de Bispebjerg, Copenhague, Dinamarca y **Rose Cooper,** Facultad de Ciencias de la Salud de Cardiff, Universidad Metropolitana de Cardiff, Cardiff, Reino Unido

La hipótesis inicial de que la presencia de bacterias en estructuras de tipo biofilm era un factor importante que contribuía a las infecciones crónicas resistentes se originó en estudios de principios de la década de los 1980 sobre enfermedades que incluían endocarditis, osteomielitis, periodontitis y fibrosis quística<sup>[1]</sup>. Tras estos estudios iniciales, numerosos estudios analíticos y publicaciones de investigación clínica han confirmado que los biofilms bacterianos son un factor de gran importancia en múltiples enfermedades caracterizadas por infecciones bacterianas persistentes que son tolerantes al sistema inmunitario del propio paciente (anticuerpos y células inflamatorias fagocíticas) y las pautas de duración estándar de antibióticos orales (o tópicos, i.v.)<sup>[2-4]</sup>.

Este importante concepto se amplió en un artículo histórico publicado en *Science*<sup>[5]</sup> en 1999. El artículo integró el concepto de inflamación crónica estimulada por el biofilm, dando lugar a la elevación de las proteasas y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que dañaban el tejido circundante, lo que podría dar lugar a la destrucción tisular como ocurre en la enfermedad periodontal o a la alteración de la función orgánica mediante la formación de cicatrices (fibrosis) como en la fibrosis quística. Reconociendo que las heridas cutáneas crónicas tienen muchas de las mismas manifestaciones clínicas que la mayoría de otras enfermedades con inflamación crónica asociada con biofilms bacterianos, James y colaboradores (2008)<sup>[6]</sup> publicaron el informe inicial de las estructuras del biofilm en las heridas crónicas. Utilizando la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido para examinar muestras de 66 sujetos, encontraron estructuras de biofilm presentes en un alto porcentaje (~60 %) de las 50 biopsias de heridas crónicas en comparación con solo 1 de 16 (6 %) muestras de heridas agudas. Este artículo ayudó a llamar la atención sobre las posibles funciones críticas que los biofilms bacterianos podrían desempeñar en el desarrollo y mantenimiento de las heridas cutáneas crónicas.

## RELACIÓN ENTRE LOS BIOFILMS Y LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS HERIDAS CRÓNICAS

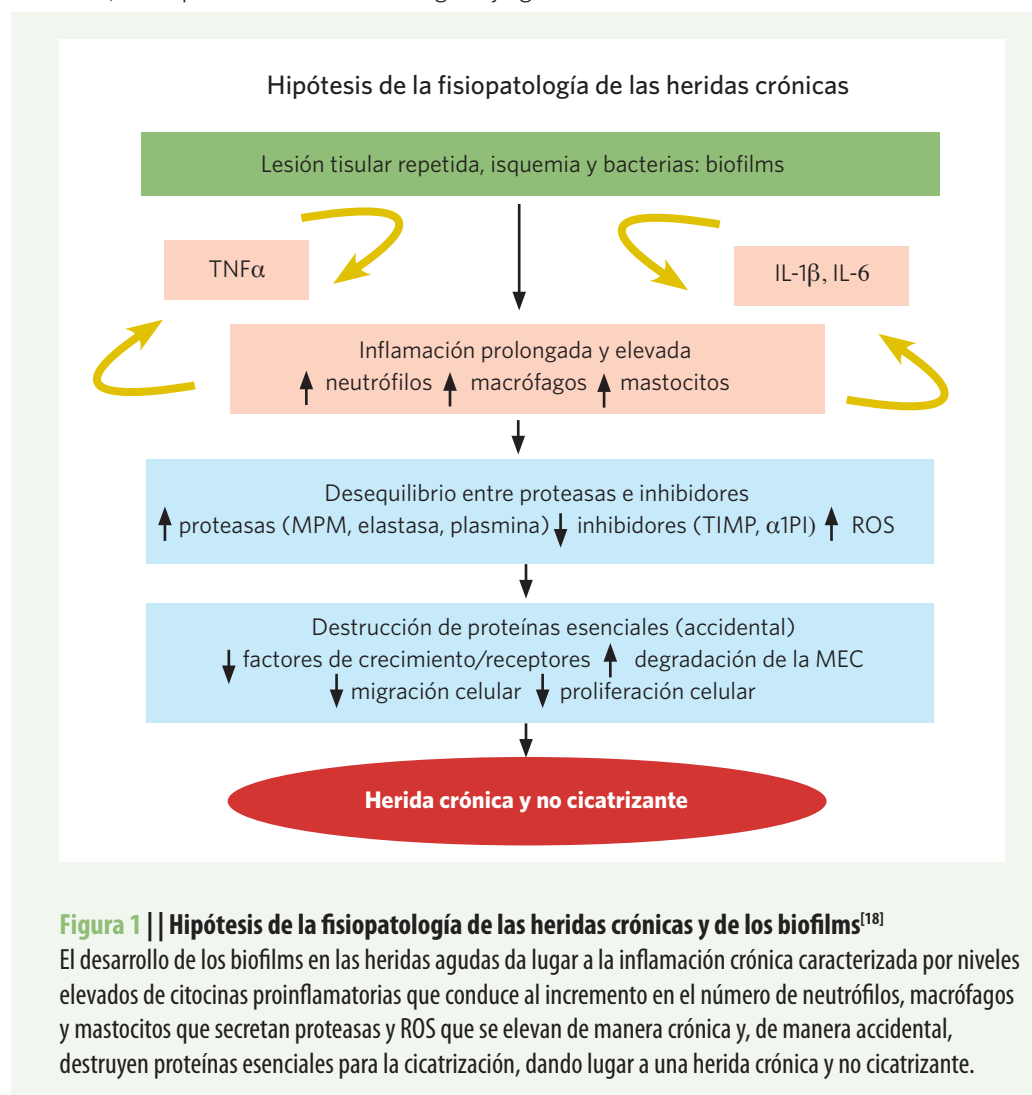
Independientemente de la investigación sobre los biofilms bacterianos en las heridas crónicas, múltiples laboratorios estuvieron investigando de manera activa la diferencia molecular entre las heridas cicatrizantes y las crónicas. Entre las primeras y principales diferencias moleculares que se identificaron fue la elevación notable en dos importantes familias de proteasas en las heridas crónicas: las metaloproteasas de la matriz (MPM) y la elastasa de neutrófilos (EN), un miembro de la superfamilia de las proteasas de serina<sup>[7-13]</sup>. Al aumento de las actividades de las proteasas en las heridas crónicas se le atribuyó diferentes efectos deletéreos sobre la cicatrización. Estos incluían:

- Destrucción de proteínas importantes de la matriz extracelular (MEC) incluida la proteína de adhesión multidominio, la fibronectina<sup>[7,14]</sup>, que es importante en la migración epitelial
- Destrucción de factores de crecimiento importantes, incluido el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>[15]</sup>.
- Degradación de proteínas receptoras de membrana clave para los factores de crecimiento<sup>[16]</sup>.

Del mismo modo, también se han notificado elevaciones en las citocinas proinflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleucina-1 alfa (IL1 $\alpha$ ), en muestras de líquidos de heridas crónicas o en biopsias en comparación con las heridas cicatrizantes.<sup>(17)</sup> Todos estos datos apuntaban una vía patológica común en la que el desarrollo de los biofilms bacterianos en heridas agudas estimula la inflamación crónica, indicada mediante niveles

persistentemente elevados de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$ ). Estas citocinas proinflamatorias atraen de forma quimiotáctica a las células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y mastocitos) al lecho de la herida, donde secretan proteasas (MPM y EN) y liberan ROS. Con el tiempo, los niveles elevados de manera crónica de proteasas y ROS tienen efectos indeseables que dañan o degradan proteínas esenciales para la cicatrización, convirtiendo una herida en cicatrización en una herida crónica y estancada (Figura 1)<sup>[18]</sup>.

Asimismo, Bjarnsholt y colaboradores<sup>[19]</sup> han planteado la hipótesis de que la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en los biofilms produce un mecanismo protector frente a la actividad fagocítica de los PMN sintetizando y secretando factores de virulencia, incluido un ramnolípido que elimina de manera eficiente los PMN (mediante su lisis) y la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno, uno de los principales ROS producidos por los PMN, hasta productos no tóxicos: oxígeno y agua.



#### UNA LAGUNA EN LA BASE DEL CONOCIMIENTO

##### Detección y medida de las bacterias de los biofilms en las heridas

De acuerdo con la evidente correlación entre la fisiopatología de las heridas crónicas y la presencia de biofilms en un alto porcentaje de las mismas, la detección y la localización de los biofilms en el lecho de las heridas crónicas proporciona información útil, especialmente a la hora de evaluar y dirigir la efectividad del desbridamiento. Asimismo, la evaluación del estado del biofilm de una herida crónica podría indicar cuándo el lecho de una herida crónica está adecuadamente preparado para poder responder a los tratamientos avanzados como los factores de crecimiento, apósitos avanzados de matriz, tratamientos celulares o injertos

de piel<sup>[20,21]</sup>. Además, la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica y patología utilizan técnicas convencionales (escaneo, secuenciación y muestreo) que no son capaces de distinguir entre las bacterias que existían, ya fuese de manera planctónica o en un biofilm<sup>[22]</sup>. Por tanto, los médicos suelen asumir que las bacterias notificadas son biofilms y que las deben tratar en consecuencia.

Asimismo, múltiples estudios han revelado que los métodos tradicionales de cultivo utilizados por los laboratorios de microbiología clínica para evaluar la carga biológica en las muestras de heridas están sesgados a la hora de detectar los organismos planctónicos, que se cultivan con facilidad y no pueden detectar muchas especies bacterianas, especialmente las anaerobias, ni especies fúngicas y levaduras<sup>[23-26]</sup>. Por ejemplo, Dowd y colaboradores (2008)<sup>[23]</sup> revelaron que las técnicas estándar de cultivo identificaron solamente el 1 % de todos los microorganismos presentes en las muestras de 30 heridas crónicas, especialmente de los anaerobios estrictos.

Thomsen y colaboradores (2010)<sup>[26]</sup> concluyeron resultados similares al utilizar técnicas de identificación mediante ADN e hibridación fluorescente *in situ* para identificar especies bacterianas en 14 úlceras sometidas a operaciones de injerto de piel. Encontraron diferencias de importancia entre los resultados obtenidos mediante los métodos de cultivo estándar y los métodos de biología molecular.

Ampliando su estudio inicial, Wolcott y colaboradores (2016)<sup>[27]</sup> utilizaron pirosecuenciación del ADNr 16S para analizar la microbiota de 2963 muestras procedentes de úlceras venosas crónicas de las piernas (n=916), úlceras de pie diabético (910), úlceras de decúbito (767) y heridas quirúrgicas no cicatrizantes (370). Encontraron perfiles similares para las 20 especies bacterianas identificadas con mayor frecuencia en cada uno de los cuatro tipos de heridas crónicas, siendo las especies de *Staphylococcus* y *Pseudomonas* las que suponían los géneros más prevalentes. Además, los anaerobios estrictos comprendían 4 de los principales 10 géneros detectados en las muestras de heridas crónicas. Los microorganismos comensales, incluidos los *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* coagulasa negativos, se encontraban presentes en prácticamente la mitad de las muestras de heridas crónicas analizadas, pero se necesita una mayor investigación para evaluar si la presencia de estos organismos afecta a la cicatrización de las heridas crónicas.

Es importante comprender que con el uso tanto de los métodos de cultivo como de los de ADN para detectar especies bacterianas presentes en las muestras de heridas no se diferencia entre las bacterias que crecen de forma planctónica de las que crecen en comunidades en los biofilms. Esto solamente se puede lograr mediante microscopía o mediante el cultivo selectivo de los biofilms tal y como se describe a continuación.

### ¿Mejora la cicatrización de las heridas crónicas con el tratamiento basado en los biofilms?

Una pregunta importante a realizar es: '¿Conocer de forma más precisa las especies bacterianas, fúngicas y de levaduras presentes en las heridas crónicas, incluidas las bacterias de los biofilms, realmente proporciona información importante que un médico puede usar para mejorar los resultados de la cicatrización?' En un gran estudio retrospectivo de cohortes y de nivel A, la aplicación de los tratamientos tópicos personalizados mediante el diagnóstico molecular de las especies bacterianas dio lugar a mejoras significativas, estadística y clínicamente, en la cicatrización<sup>[28]</sup>.

En el grupo de tratamiento de referencia (*standard of care*, SOC), las heridas del 48,5 % de los pacientes (244/503) cicatrizaron por completo durante el periodo de estudio de 7 meses. Esto supone un incremento de hasta el 62,4 % (298/479) en el grupo de tratamiento que recibió el SOC más los antibióticos sistémicos de acuerdo con los resultados de identificación molecular de las bacterias de las heridas. La cicatrización completa se incrementó adicionalmente hasta el 90,4 % (358/396) en el grupo de tratamiento que recibió el SOC más el tratamiento tópico (incluidos los antibióticos) de acuerdo con los resultados del diagnóstico molecular ( $p < 0,001$  en comparación con el SOC o el SOC + los antibióticos sistémicos, de acuerdo con el análisis de riesgos proporcionales de Cox). Más recientemente, Wolcott (2015)<sup>[29]</sup> reportó un aumento significativo en la cicatrización de las heridas tratadas con SOC en combinación con un hidrogel que contenía antibióticos tópicos y compuestos que desorganizaban los biofilms.

**¿Cómo y dónde tomar muestras del lecho de una herida crónica para detectar un biofilm?**

En la actualidad, detectar y localizar los biofilms en los lechos de heridas crónicas cutáneas es una de las lagunas más importantes en la base del conocimiento para el cuidado de las heridas con biofilms, especialmente puesto que los biofilms maduros y tolerantes se pueden volver a formar en tres días tras el desbridamiento eficaz de las heridas cutáneas crónicas<sup>[30,31]</sup>.

En mayo de 2015, la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) publicó las directrices para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones con biofilm<sup>[32]</sup>. Incluye información y directrices acerca de la detección y tratamiento de las infecciones con biofilms en múltiples condiciones. Esas incluían infecciones tisulares/de las mucosas como las de pacientes con infecciones pulmonares crónicas (fibrosis quística) y con infecciones crónicas en las que el biofilm se forma sobre dispositivos implantados dentro del cuerpo (implantes ortopédicos, implantes mamarios) o sobre dispositivos conectados entre la superficie interna (estéril) y externa del cuerpo, como los catéteres intravenosos, catéteres urinarios permanentes o tubos endotraqueales. Los lectores a los que van dirigidas estas directrices son microbiólogos clínicos y especialistas en enfermedades infecciosas implicados en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones con biofilms.

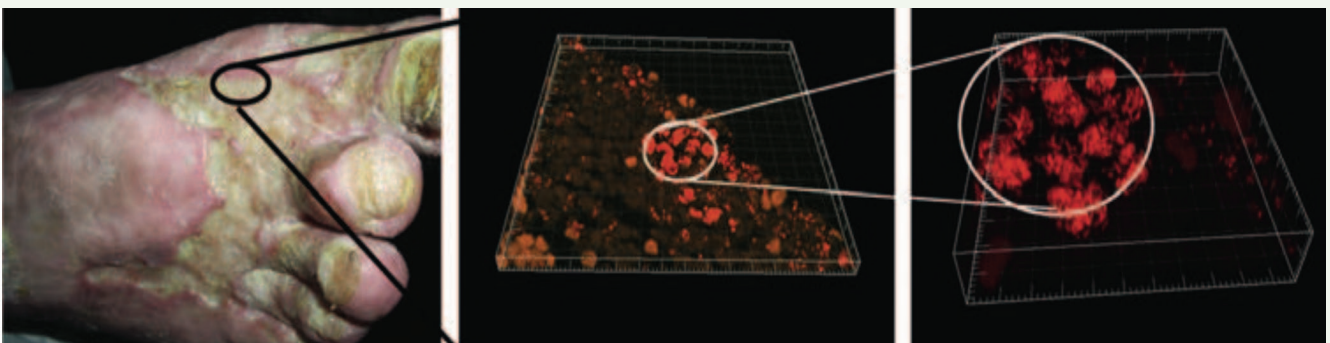
Las directrices de la ESCMID establecen que: *'Los tejidos biopsiados se consideran las muestras más fiables para revelar la presencia de biofilms en las heridas. El uso de hisopos para recoger las muestras de biofilm de la superficie de la herida no se considera un método adecuado, debido a la contaminación de la flora cutánea, la fuerte adherencia del biofilm al epitelio del hospedador y al crecimiento de anaerobios en los tejidos profundos. Si se sospecha de una infección entre moderada y grave de las partes blandas y hay presente una herida, se debe examinar una muestra de tejido a partir de la base de la herida desbridada. Si no se puede obtener esta muestra, un hisopo superficial puede proporcionar información útil para la elección del tratamiento con antibióticos'*<sup>[33,34]</sup>.

Sin embargo, suponiendo que se pueda obtener una muestra de biopsia o de raspado de la herida cutánea crónica, estas directrices dejan varias preguntas importantes sin resolver, incluidas:

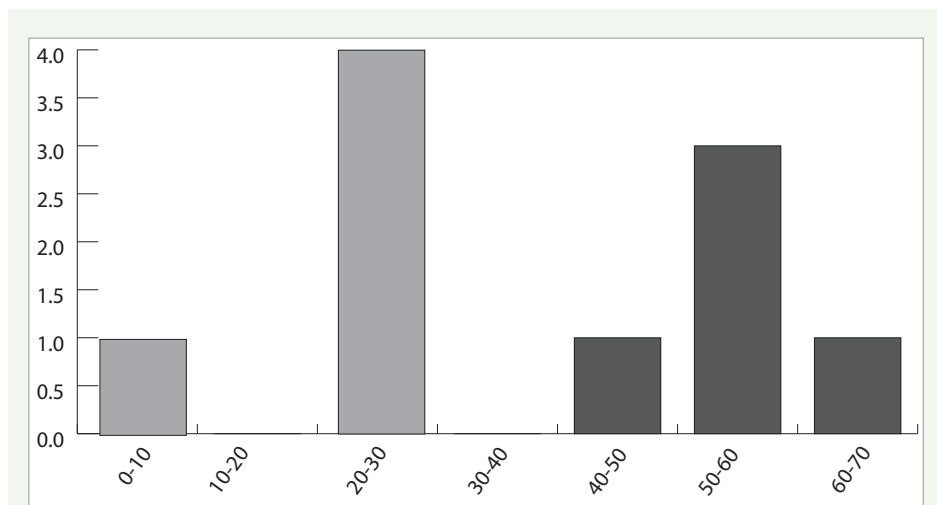
- ¿En qué parte del lecho de la herida se debe tomar una sola muestra?
- ¿Una biopsia es suficiente para evaluar de manera fiable si una herida crónica tiene (o no) un biofilm maduro? Es muy poco probable que los biofilms estén de manera uniforme por encima de todo el lecho de la herida y en el borde de la misma, por tanto, ¿qué debe guiar al médico?
- ¿Existe algún signo visual que pueda ser útil para decidir dónde tomar esa única biopsia?

Varios estudios han concluido que la distribución de los agregados de biofilm a lo largo del lecho de la herida no es uniforme<sup>[35,36]</sup>. Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2, los agregados de biofilms de *P. aeruginosa* no se distribuyen de manera homogénea sobre el lecho de la herida crónica<sup>[36]</sup>.

Además, los agregados de los biofilms no necesariamente se encuentran presentes solo



**Figura 2** | Biofilms de *P. aeruginosa* en una herida crónica visualizada mediante el uso de una sonda de hibridación fluorescente *in situ* formada por un ácido nucleico y específica para un péptido (rojo) con microscopía confocal de barrido láser. La imagen de la derecha muestra una ampliación de la imagen central. La distribución de las colonias del biofilm sobre el lecho de la herida no es uniforme<sup>[36]</sup>



**Figura 3** | Distribución de las distancias desde la superficie de la herida hasta el centro de la masa de los agregados de *S. aureus* (sombreado con gris claro) o de *P. aeruginosa* (sombreado gris oscuro). La distancia son los valores promedio obtenidos a partir del análisis de 15 imágenes para cada una de las 9 muestras de heridas crónicas.

en la superficie del lecho de la herida<sup>[35]</sup>. Tal como se muestra en la Figura 3, se identificaron estructuras del biofilm por debajo de la superficie del lecho de 9 heridas crónicas, con agregados de *S. aureus* cerca de la superficie del lecho de la herida (a ~20-30 micras de profundidad) en comparación con los agregados de *P. aeruginosa* (50-60 micras de profundidad). Lo más probable es que diferentes especies o fenotipos de bacterias prefieran nichos ambientales.

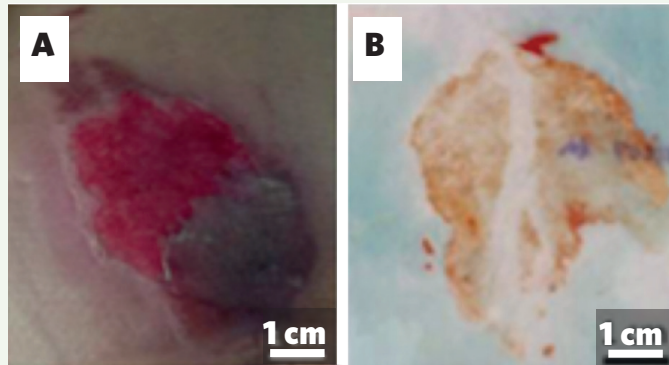
Además, la distribución de las bacterias y de los biofilms también podría depender de la competición o colaboración con otros microorganismos<sup>[26,36]</sup>.

Tal como se explica en el artículo adjunto de Bjarnsholt et al. (páginas 4-8)<sup>[37]</sup>, ha habido un debate considerable sobre si los médicos pueden observar de forma visual los biofilms en el lecho de heridas crónicas. Aunque mediante colorantes se pueden observar grandes formaciones de biofilms sobre la superficie del esmalte de los dientes, está menos claro que se puedan observar formaciones de biofilms en heridas crónicas. Algunos médicos han propuesto que los signos clínicos como la capa brillante, translúcida y con un aspecto baboso sobre el lecho de la herida no cicatrizante que se vuelve a formar con rapidez cuando se desbrida, que puede ser más fácil de eliminar mediante almohadillas de tela y que puede responder menos al desbridamiento enzimático o autolítico es más probable que se deban a un biofilm<sup>[38,39]</sup>. Sin embargo, estas observaciones necesitan apoyarse en análisis rigurosos de estos tipos de materiales sobre el lecho de las heridas para detectar los biofilms.

Una nueva técnica, el 'mapa del biofilm en la herida'. descrita por Nagakami y colaboradores<sup>[40]</sup> puede proporcionar información útil acerca de la localización de los biofilms en la superficie del lecho de la herida. Un médico presiona en el lecho de la herida y durante unos minutos una membrana de nylon con una alta densidad de cargas positivas, produce una 'impresión molecular' de las moléculas en la superficie del lecho de la herida que están estrechamente unidas a la membrana. La membrana con la transferencia se sumerge durante unos segundos en una solución que contiene un colorante cargado positivamente (como el rojo de rutenio) que se une iónicamente a las moléculas con una fuerte carga negativa que se encuentran unidas a la membrana y luego se lava brevemente. La mayoría de los biofilms bacterianos contienen cantidades importantes (~20 %) de ADN bacteriano, que está muy cargado negativamente<sup>[41]</sup>.

Los experimentos de laboratorio han demostrado que las zonas de la membrana que retienen el colorante corresponden a las zonas de la superficie del lecho de la herida que tienen matriz exopolimérica de comunidades de biofilm. Además, la cantidad de la superficie del lecho de

**Figura 4 | Mapa del biofilm en la herida.** La tinción de color naranja-rojo presente en la membrana (panel B) sugiere la presencia de matriz exopolimérica del biofilm en la herida crónica (panel A) transferida sobre una membrana cargada positivamente



una herida que ha teñido la membrana sirve como indicativo de la extensión de las escaras que se han desarrollado sobre el lecho de la herida crónica durante la semana siguiente. Un punto débil de esta técnica es que detectaría de manera preferente la matriz exopolimérica del biofilm que se encontrase en la superficie del lecho de la herida, y no detectaría la matriz exopolimérica del biofilm que estuviese enterrada en la profundidad de la matriz del lecho de la herida. Está claro que es necesario desarrollar un detector de biofilms rápido, económico y fácil de utilizar que se puede utilizar de manera inmediata y en unos pocos minutos.

#### ¿CUÁLES SON LOS ENSAYOS ÓPTIMOS PARA LA DETECCIÓN DE BIOFILM EN LAS HERIDAS CRÓNICAS?

Se utilizan diversos ensayos diferentes para determinar si la muestra de una herida contiene un biofilm maduro tolerante. El enfoque más frecuente es visualizar las estructuras de tipo biofilm utilizando o bien microscopía óptica, habitualmente con anticuerpos que detectan un solo componente de la matriz exopolimérica de algunos biofilms, como el alginato sintetizado por *P. aeruginosa*, o hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Sin embargo, pueden ser necesarios varios días para procesar las muestras de tejido embebiéndolas en parafina. La generación de secciones transversales puede ofrecer un procesamiento y una evaluación más rápidas. Ambas técnicas requieren microscopios caros y técnicos con la formación adecuada, y no se pueden realizar durante una visita clínica.

La mayoría de los laboratorios de microbiología estándar pueden adoptar un enfoque relativamente simple y estándar para medir las bacterias en biofilms protectores<sup>[42]</sup>. En resumen, las muestras se colocan en tampón fosfato salino (PBS) con 5 ppm de Tween 20 (5 ml/ml). Se someten a agitación vorticial para suspender el tejido. Tras ello, se añade lejía diluida a una concentración final del 0,03 %.

A continuación, las muestras se incuban durante 10 minutos para destruir todas las bacterias planctónicas y la lejía se neutraliza con metasulfito sódico (a una concentración final del 0,3 %). Luego, el agregado del biofilm se dispersa en bacterias individuales mediante cinco ciclos de 1,5 minutos de sonicación con un minuto de pausa en frío entre los ciclos de sonicación. Las muestras se siembran en placas de agar de crecimiento selectivo usando diluciones de un orden de 10 y se cuentan las colonias tras una incubación de entre 24 y 48 horas a 37 °C.

De manera alternativa, las muestras de las heridas se pueden colocar en soluciones con antibióticos (gentamicina, moxifloxacino, penicilina) durante 24 horas a 37 °C para destruir las bacterias planctónicas susceptibles, a continuación se lavan dos veces en caldo neutralizante Dey-Engley, se someten a agitación vorticial (30 segundos), se someten a ultrasonido (dos minutos) y se someten a agitación vorticial (30 segundos) en tres ocasiones, para dispersar los biofilms en suspensiones de células individuales que, a continuación se diluyen de manera seriada con PBS, se colocan en placas con TSB, que se incuban a 37 °C durante 24-48 horas<sup>[43]</sup>.

**¿PUEDEN CICATRIZAR LAS HERIDAS CON UNA PEQUEÑA CANTIDAD DE BIOFILM?**

Muchas heridas agudas pueden cicatrizar a pesar de la colonización bacteriana. Se trata de una paradoja que se puede explicar mediante la hipótesis de que el sistema inmunitario de la mayoría de los pacientes (en ocasiones complementado por los antibióticos sistémicos o los apósitos con antisépticos tópicos) puede destruir las bacterias planctónicas antes de que se desarrollen en forma de biofilms y de que sea muy complicado eliminarlas. La mayoría de las heridas crónicas se han vuelto crónicas debido a un tratamiento deficiente y, sin duda, tienen cantidades importantes de biofilm bacteriano, pero cuando muchas heridas crónicas reciben el tratamiento correcto, como compresión y/o descarga, empiezan a cicatrizar, incluso sin añadir antibióticos o antisépticos. Es posible que esto pueda explicarse mediante el hecho de que algunas bacterias son más virulentas, como *Pseudomonas* y algunas cepas de *Staphylococcus*<sup>[19]</sup>, pero muchas de las bacterias de las heridas son oportunistas. La respuesta inmunitaria podría crear oportunidades para las bacterias menos virulentas, que luchan por el mismo espacio, para influir en las bacterias del biofilm. Está claro que se trata de una cuestión importante que necesita de más investigación para poder abordarla.

**CONCLUSIÓN**

El biofilm bacteriano puede jugar un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de las heridas crónicas. La detección y la localización de los biofilms en heridas crónicas proporciona información clínica útil que ayuda especialmente a evaluar y dirigir la eficacia del desbridamiento. Sin embargo, siguen habiendo lagunas en la base del conocimiento cuando se trata de detectar y localizar biofilms en heridas crónicas. Las directrices de la ESCMID<sup>[32]</sup> publicadas en 2015 ofrecen orientación acerca del diagnóstico y tratamiento de la infección por biofilms pero deja algunas preguntas sin responder, incluidas si los signos visuales podrían ser útiles a la hora de decidir de dónde tomar una biopsia.

El debate alrededor de si se puede observar el biofilm a simple vista permanece vigente. Nuevas técnicas, como el ‘mapa del biofilm en la herida’ de Nagakami y colaboradores<sup>[40]</sup> puede proporcionar información útil acerca de la localización de los biofilms en la superficie del lecho de la herida. Sin embargo, al igual que con otras técnicas existentes, esto tiene su punto débil y sigue siendo necesario desarrollar un detector de biofilms en forma de ‘análisis diagnóstico inmediato’ que pueda proporcionar resultados en unos pocos minutos, no en unos días. Se necesita una investigación más centrada para detectar y localizar de forma precisa y eficaz los biofilms en heridas crónicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Costerton JW. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev Infect Dis* 1984; 6 Suppl 3:S608-S616.
2. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987v;41:435-64.
3. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711-45.
4. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418):1318-22.
6. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):37-44.
7. Wysocki AB, Grinnell F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 1990; 63(6):825-31.
8. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1):26-37.
9. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6):442-52.
10. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008; 16(5):642-8.
11. Liu Y, Min D, Bolton T, Nube V, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; 32(1):117-9.
12. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 2008; 158(5):951-61.
13. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45(7):1011-6.
14. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* 1992; 141(5):1085-95.
15. Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, Rudolph R, Robson MC, Vande Berg J, Reid P. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 1995; 96(3):1336-50.
16. Cowin AJ, Hatzirodos N, Holding CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE, Fitridge R, Cooter RD, Schultz GS, Belford DA. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2001; 117(5):1282-9.
17. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2000; 8(1):13-25.
18. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4):411-20.
19. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, Hoiby N, Givskov M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):2-10.
20. Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *J Wound Care* 2009; 18(2):54-6.
21. Wolcott RD, Cox S. More effective cell-based therapy through biofilm suppression. *J Wound Care* 2013;22(1):26-31.
22. Costerton JW, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ, Kreft R, Nistico L, Kathju S, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Maale G, James G, Sotereanos N, DeMeo P. New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 61(2):133-40.
23. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):43.
24. Dowd SE, Delton HJ, Rees E, Wolcott RD, Zischau AM, Sun Y, White J, Smith DM, Kennedy J, Jones CE. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care*



2011; 20(1):40-7.

25. Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, McKeenan T, Smith E, Rhoads D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS ONE* 2008; 3(10):e3326.
26. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, Kirketerp-Møller K, Nielsen PH. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1):38-49.
27. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA, Cox SB, White JS. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen* 2016; 24(1):163-74.
28. Dowd SE, Wolcott RD, Kennedy J, Jones C, Cox SB. Molecular diagnostics and personalised medicine in wound care: assessment of outcomes. *J Wound Care* 2011; 20(5):232, 234-2, 239.
29. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care* 2015; 24(8):366-71.
30. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17(4):145-2, 154.
31. Shin KS, Song HG, Kim H, Yoon S, Hong SB, Koo SH, Kim J, Kim J, Roh KH. Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures using an immunochromatographic immunoassay-based MRSA rapid kit for the detection of penicillin-binding protein 2a. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67(3):301-3.
32. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Hola V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21 Suppl 1:S1-25.
33. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 2012; 20(5):647-57.
34. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, Pinzur MS, Senneville E. Executive summary: 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2012; 54(12):1679-84.
35. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, Kroghfelt KA, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12):4084-9.
36. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2013; 121(Suppl 136):S1-S51.
37. Bjarnsholt T, Schultz GS, Kirketerp-Møller K, Fletcher J, Malone M. The role of biofilms in delayed wound healing. *Wounds International* 2016.
38. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. *J Wound Care* 2014; 23(3):137-2.
39. Hurlow J, Bowler PG. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care* 2012; 21(3):109-10, 112, 114.
40. Nakagami G, Schultz G, Gibson D, Phillips P, Kitamura A, Minematsu T, Miyagaki T, Hayashi A, Sasaki S, Sugama J, Sanada H. *Biofilm detection by wound blotting can predict slough development in pressure ulcers: a prospective observational study*. Submitted 2016.
41. Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2006 9(2):133-7.
42. Fennelly KP, Ojano-Dirain C, Yang Q, Liu L, Lu L, Progulsk-Fox A, Wang GP, Antonelli P, Schultz G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(6):692-3.
43. Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. *J Wound Care* 2010; 19(8):320-8.

## NOTAS





Una publicación de Wounds International  
[www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com)