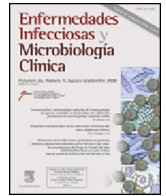




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas

María D. Macià^{a,*}, José Luis del Pozo^b, María Díez-Aguilar^c y Jesús Guinea^d

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa) y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa-REIPI

^b Área de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Microbiología, Laboratorio de Biofilms Microbianos, Clínica Universidad de Navarra

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria-IRYCIS (Madrid) y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa-REIPI

^d Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón y CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CB06/06/0058), Madrid

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 11 de abril de 2017

Aceptado el 17 de abril de 2017

On-line el 27 de mayo de 2017

Palabras clave:

Biopelículas

Sensibilidad antibiótica en biopelículas

Diagnóstico microbiológico en infecciones por biopelículas

Keywords:

Biofilms

Antimicrobial susceptibility studies on biofilms

Microbiological diagnosis of biofilm-related infections

R E S U M E N

Las infecciones asociadas a biopelículas suponen un grave problema sanitario ya que representan entre el 65 y el 80% de todas las infecciones. Estas son generalmente crónicas y están caracterizadas por la persistencia del microorganismo debido a su resistencia al sistema inmunitario y a los antimicrobianos. Las biopelículas se pueden localizar tanto en tejidos humanos como sobre dispositivos exógenos tales como catéteres, marcapasos, prótesis, implantes, sondas urinarias, etc.

Tradicionalmente, los laboratorios de microbiología clínica realizan los estudios de sensibilidad sobre microorganismos en crecimiento planctónico. Sin embargo, de esta manera se pierden las características propias de la biopelícula con lo que la antibioterapia basada en estos estudios podría asociarse con fracaso terapéutico o recurrencias. El diagnóstico microbiológico y los estudios de sensibilidad en las infecciones relacionadas con biopelículas son complejos y, hoy por hoy, representan un reto que clínicos y microbiólogos han de abordar en equipo ya que no existe todavía un consenso global ni protocolos estandarizados.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of biofilm-related infections

A B S T R A C T

Biofilm-related infections represent a serious health problem, accounting for 65–80% of all infections. The infections are generally chronic and characterized by the persistence of the microorganism, due to the increased resistance of biofilms to both the immune system and antimicrobials. Biofilms can be located to almost every human body tissue and on exogenous devices such as catheters, pacemakers, prosthetic material, implants, urinary catheters, etc.

Traditional antimicrobial susceptibility studies in clinical microbiology laboratories have lied on the study of planktonic form of microorganisms. However, this approach might lead to miss the biofilm characteristics and to a treatment failure. Microbiological diagnosis and antimicrobial susceptibility studies of biofilm-related infections are complex and, nowadays, represent a challenge that clinicians and microbiologists have to address as a team in the absence of consensus or standardized protocols.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Las biopelículas son formaciones supracelulares estructuradas que surgen como estrategia de supervivencia en ambientes hostiles

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: maria.d.macia@ssib.es (M.D. Macià).

dotando a los microorganismos embebidos en ellas de resistencia al aclaramiento mecánico, al sistema inmunitario y a los agentes antimicrobianos^{1,2}.

Las infecciones relacionadas con biopelículas, característica de infecciones crónicas persistentes refractarias a tratamiento antimicrobiano, son un importante problema sanitario ya que representan entre un 65 y un 80% de todas las infecciones. Estas se pueden localizar en casi cualquier tejido del cuerpo humano, destacando la infección crónica de piel y partes blandas, las infecciones pulmonares en los pacientes con fibrosis quística (FQ) o bronquiectasias, o la endocarditis². Además, las biopelículas causan infecciones relacionadas con diversos dispositivos biomédicos. En general, estas infecciones son difíciles de diagnosticar y tratar, existiendo en la actualidad muchas dudas en cuanto a la estrategia terapéutica óptima para estos pacientes³. Tradicionalmente, los laboratorios de Microbiología Clínica se han centrado en aislar y realizar estudios de sensibilidad sobre microorganismos en estado planctónico. Sin embargo, liberar a los microorganismos de las biopelículas hace que estas pierdan sus características y pueda conducir a error la extrapolación de los datos de sensibilidad a los antimicrobianos en estado planctónico. En el presente documento se abordan tanto el diagnóstico microbiológico como los estudios de sensibilidad en las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.

Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en tejidos y dispositivos

Infección pulmonar crónica

Las enfermedades pulmonares crónicas como la FQ, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las bronquiectasias representan un factor predisponente para la infección crónica. Los microorganismos más prevalentes en este contexto son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*^{4–8}. Las muestras adecuadas para el diagnóstico microbiológico son el esputo espontáneo o inducido, el lavado broncoalveolar (LBA) o el broncoaspirado, intentando minimizar la contaminación orofaríngea durante su obtención.

Rinosinusitis crónica

Se trata de una enfermedad inflamatoria que afecta a la mucosa de los senos paranasales y de las fosas nasales. Suele comenzar con una infección vírica que, en algunos casos, evoluciona desarrollando una sobreinfección bacteriana secundaria causada frecuentemente por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Si esta no se resuelve, predomina la colonización por microbiota orofaríngea anaerobia (como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., y *Peptostreptococcus* spp.) y aerobia (*P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., y *Escherichia coli*) y *S. aureus* (incluyendo *S. aureus* resistente a la meticilina [SARM])⁹, incluso hongos como *Aspergillus* spp., generalmente, en pacientes añosos y/o inmunocomprometidos. Las secreciones purulentas obtenidas desde el meato medio o a través de las cavidades de los senos paranasales son las muestras preferidas para el diagnóstico microbiológico.

Otitis media crónica

La otitis media es una infección que puede cursar de forma aguda o crónica con la presencia de exudado en la cavidad media del oído. Las bacterias comúnmente implicadas son *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*¹⁰. En las otitis medias crónicas supuradas

y colesteatomatosas, *P. aeruginosa* y *S. aureus* son los microorganismos más comúnmente involucrados. El diagnóstico microbiológico se reserva generalmente para casos refractarios al tratamiento. La muestra clínica se debe obtener mediante aspiración por timpanocentesis y si existe perforación timpánica espontánea puede utilizarse el exudado que fluye al canal externo del oído medio. Esta muestra se tomará con jeringa siempre que sea posible y, si no, mediante torunda.

Infección crónica de herida

Se considera herida crónica aquella en la que la curación no sucede con normalidad y la integridad funcional y anatómica de la piel no se logra tras aproximadamente un mes; la infección es la principal causa de esta cronicidad^{2,11}. Todas las heridas abiertas están colonizadas por microorganismos de origen endógeno y exógeno, aunque las biopelículas suelen estar compuestas por una sola especie bacteriana, básicamente, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. También pueden estar implicados anaerobios (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Peptostreptococcus* spp.), *Bacillus anthracis*, estreptococos beta hemolíticos, *Enterococcus* spp. y enterobacterias. Para el diagnóstico microbiológico, se recomienda el cultivo de la biopsia de tejidos profundos.

Infección en pacientes quemados

Aunque la superficie de las quemaduras es inicialmente estéril, la colonización microbiana se produce rápidamente: las bacterias grampositivas colonizan la herida en las primeras 48 h, y a los 5-7 días puede colonizarse por otros grampositivos, gramnegativos y posteriormente por levaduras provenientes de la microbiota normal. La mayoría son infecciones monomicrobianas y los microorganismos más frecuentes son *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Otros microorganismos menos frecuentes son *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. El diagnóstico se realiza por sospecha clínica y cultivo cuantitativo (10⁵ UFC por gramo de tejido) del material de biopsia.

Infección de válvula cardíaca nativa

La endocarditis sobre válvula nativa se produce por una interacción entre el endotelio vascular y microorganismos circulantes en la sangre que se multiplican en la lesión formando una biopelícula en forma de vegetaciones. Las vegetaciones pueden impedir el correcto funcionamiento de la válvula, generando una fuente continua de microorganismos al torrente sanguíneo y riesgo de embolias sépticas a distancia. Esta, sigue siendo una enfermedad con una alta tasa de mortalidad y sus principales agentes causales son *S. aureus* (31%), estreptococos del grupo *viridans* (17%), *Enterococcus* spp. (11%) estafilococos coagulasa negativos (11%), *Streptococcus bovis* –*S. bovis*– (7%), otros estreptococos (5%), bacilos gramnegativos (2%), hongos (2%), bacilos gramnegativos del grupo HACEK (2%, *Haemophilus aphrophilus* [*Aggregatibacter aphrophilus*], *Aggregatibacter paraphrophilus*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*], *Cardiobacterium hominis*; *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*¹²). El diagnóstico se basa fundamentalmente en la positividad de los hemocultivos que deben incubarse más de 5 días si se sospecha endocarditis y en la ecocardiografía. Aun así, los hemocultivos pueden resultar negativos (5-30% de los casos) debido a la terapia antibiótica concomitante o en endocarditis causada por hongos o por microorganismos fastidiosos por lo que las técnicas moleculares y la serología pueden ser útiles. Un cultivo positivo de la vegetación se considera criterio mayor de diagnóstico de endocarditis, no siendo útil el cultivo valvular.

Infección prostática

La prostatitis crónica es una infección de la glándula prostática prolongada en el tiempo, con infecciones del tracto urinario recurrentes en las que se aísla el mismo microorganismo de las secreciones prostáticas. El principal agente causal de esta infección es *E. coli*. También pueden estar implicados *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp.¹³. El diagnóstico se basa en los cultivos cuantitativos comparativos entre 1) la orina del comienzo de la micción, 2) la orina del chorro medio, 3) la secreción prostática obtenida después del masaje prostático (o el semen) y 4) la orina del comienzo de la micción obtenida después del masaje prostático o tras la masturbación. Es sugerente de prostatitis cuando la cantidad de UFC/ml es diez veces superior en secreción prostática, semen, u orina posmasaje que en primer/chorro medio de orina.

Vaginosis

La vaginosis bacteriana es el trastorno vaginal más frecuente en las mujeres en edad fértil, lo que supone más del 60% de todas las infecciones vulvovaginales. Se acepta que se trata de una infección asociada a biopelículas, constituidas principalmente por agrupaciones de *Gardnerella vaginalis* fuertemente adheridas al epitelio vaginal (células *clue*) junto con la pérdida de bacterias beneficiosas (lactobacilos). El diagnóstico se basa en la presencia de, al menos, tres criterios de Amsel (descarga característica vaginal, pH elevado, células *clue*, olor fétido) así como en la observación microscópica de la secreción vaginal obtenida mediante torunda de las células *clue*. Los cultivos vaginales presentan muy baja especificidad.

Infección asociada a catéter vascular

Una vez que se inserta un catéter, las proteínas del huésped recubren las superficies internas y externas del dispositivo y sirven como un lugar de anclaje para ciertos microorganismos, principalmente estafilococos coagulasa negativos, *S. aureus*, y *Candida* spp. Otros menos frecuentes incluyen a *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus* spp., *Achromobacter* spp., micobacterias, otras levaduras, y algunos hongos filamentosos. El diagnóstico microbiológico se basa en la coincidencia en los aislamientos obtenidos del cultivo del punto de inserción o la punta del catéter y los aislados del hemocultivos. Cuando se retira el catéter, este se debe cultivar según el método semicuantitativo de Maki¹⁴, en el que la presencia de 15 o más UFC por placa indica su colonización y apunta al mismo como origen de la infección. El cultivo de un catéter venoso central con reservorio subcutáneo debería combinar el hisopado de la cámara del reservorio, el cultivo tras sonicación de la membrana de silicona y el cultivo del segmento distal del catéter¹⁵.

Infección sobre válvula cardíaca protésica, marcapasos e injertos

Según el tiempo transcurrido desde la cirugía de implantación, las endocarditis se clasifican como precoces (< 12 meses) o tardías. Las infecciones relacionadas con los dispositivos de electroestimulación pueden involucrar al generador, al generador y los electrodos, a los electrodos, y/o presentarse como endocarditis. La infección asociada a injertos vasculares oscila en torno a un 6% con una mortalidad entre 15 y 50% y una tasa de amputaciones entre el 8 y el 50%. Los estafilococos causan entre el 60 y el 80% de estas infecciones, pero también pueden estar involucrados estreptococos del grupo *viridans* y *S. bovis*, *S. pneumoniae*, estreptococos beta-hemolíticos (fundamentalmente *Streptococcus agalactiae*) y *Abiotrophia* spp. y *Granulicatella* spp.¹⁶. El diagnóstico definitivo de la endocarditis sobre válvula protésica solo puede establecerse

con certeza por medio del examen histológico y microbiológico de las vegetaciones. Los criterios diagnósticos de la Universidad de Duke son la base para el diagnóstico y los hemocultivos positivos siguen siendo la piedra angular del diagnóstico (también en el caso de la infección asociada a marcapasos y desfibriladores implantables). La serología o la detección antigénica es fundamental para el diagnóstico de patógenos como: *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp. o *Aspergillus* spp. Son también útiles las técnicas de biología molecular aplicadas sobre diferentes tejidos. Los cultivos del bolsillo y cables tras la extracción del dispositivo son útiles en la identificación del microorganismo causal. La sensibilidad del cultivo de biopsia del bolsillo subcutáneo es más alta que la recogida de un hisopado. No se debe realizar punción-aspiración percutánea del bolsillo del dispositivo debido a la falta de rendimiento diagnóstico adecuado y el riesgo teórico de la introducción de microorganismos¹⁷.

Neumonía asociada a ventilación mecánica

La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVVM) es aquella que se produce en pacientes con intubación endotraqueal (o traqueostomía) durante el periodo en el que se encuentran intubados. La colonización de la vía aérea superior, e incluso de la placa dental, es un factor predictor para la colonización del tubo traqueobronquial y la exposición previa a antibióticos es un factor predisponente para microorganismos multirresistentes como *S. aureus* resistente a meticilina y *P. aeruginosa*. Las muestras válidas para el diagnóstico de la NAVVM son el esputo espontáneo o inducido, la aspiración nasotraqueal y el cultivo semicuantitativo del aspirado endotraqueal (elección), o muestras obtenidas mediante broncoscopia con los siguientes criterios microbiológicos: a) LBA con un umbral de $\geq 10^4$ UFC/ml o $\geq 5\%$ de células que contienen bacterias intracelulares en el examen microscópico directo; b) muestra obtenida mediante cepillo protegido con un umbral de $\geq 10^3$ UFC/ml; c) aspirado distal protegido con un umbral de $\geq 10^3$ UFC/ml; d) aspirado endotraqueal cuantitativo con un umbral de $\geq 10^6$ UFC/ml.

Infección asociada a prótesis articular

Esta infección tiene una incidencia media en España, probablemente infraestimada, entre el 3 y el 4%. Los microorganismos grampositivos (estafilococos coagulasa negativos, *S. aureus*, enterococos y estreptococos) están implicados en torno a un 65%. Los bacilos gramnegativos aerobios (*E. coli*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*) representan un 5-10%, y los anaerobios (entre los que destacan *Propionibacterium acnes* y *Finexgoldia magna*) suponen un 1-4%. Los hongos, micobacterias atípicas, *Brucella* spp, etc. representan un 1% del total. Un 20% de los casos son infecciones polimicrobianas y en un 7% de los casos no se consigue aislar ningún microorganismo¹⁸. El diagnóstico de la infección asociada a prótesis articular continúa siendo un reto. Se consideran criterios de infección crónica tardía la presencia de al menos uno de los siguientes: a) aislamiento del mismo microorganismo en dos cultivos del aspirado articular o de muestras de tejido periprotésico recogidas durante la intervención; b) presencia de signos de inflamación aguda en el examen histológico del tejido periprotésico; c) tracto fistuloso en contacto con la prótesis; d) material purulento en el espacio articular.

Se deberá remitir líquido sinovial para cultivo y realizar una tinción de Gram aunque presenta una escasa sensibilidad (<26%). Las muestras de material periprotésico recogidas durante la cirugía de revisión de las prótesis son las más rentables, aunque es necesario obtener un número suficiente de muestras (5/6) que aumente la sensibilidad de los cultivos y que facilite la discriminación entre microorganismos contaminantes y patógenos. Hay que evitar los

cultivos de exudado procedentes de fístulas crónicas así como los cultivos de torundas recogidas en el intraoperatorio¹⁸.

Debido a la presencia de biopelículas el diagnóstico mediante técnicas convencionales resulta difícil y, en ocasiones, es recomendable cultivar directamente la prótesis. Previamente, esta debe ser sometida a un proceso de sonicación para lograr desprender las bacterias adheridas al implante retirado. Los cultivos de muestras obtenidas mediante sonicación son más sensibles que los cultivos convencionales de tejido periprotésico y que los cultivos de líquido sinovial para el diagnóstico de infección de prótesis de rodilla o cadera, especialmente en aquellos pacientes que han recibido tratamiento antibiótico en los 14 días previos a la cirugía. Es importante realizar cultivos aerobios y anaerobios del fluido resultante de la sonicación ya que un 5% y un 11% de los casos, respectivamente, serán positivos solo en uno de los dos medios de cultivo.

Infección asociada a sonda urinaria

La bacteriuria asociada a sondaje urinario es la infección nosocomial más frecuente en nuestro medio (hasta el 40%) y se asocia a un incremento en la mortalidad¹⁹. Los microorganismos implicados proceden habitualmente de la microbiota del paciente, siendo habitualmente infecciones monomicrobianas causadas por *E. coli* u otras enterobacterias, y en ocasiones por *P. aeruginosa*, enterococos, o *Candida* spp. Cuando se prolonga la duración del sondaje, la infección puede ser polimicrobiana, y si además los pacientes reciben antibióticos es relativamente frecuente el aislamiento de bacilos gramnegativos multirresistentes. La infección asociada a sondaje urinario se define como la presencia de síntomas o signos compatibles con infección del tracto urinario sin otro foco posible, junto con piuria y un recuento $>10^3$ UFC/ml de una única especie bacteriana en una muestra de orina obtenida a través de la sonda, o de un paciente en el que se retiró la sonda en las 48 h previas. El hallazgo en el urocultivo de más de un microorganismo debe ser interpretado con precaución, ya que en el sondado la infección a menudo es polimicrobiana. La tinción de Gram de una muestra de orina puede ser de utilidad especialmente en el paciente grave. El urocultivo se ha de recoger puncionando la sonda. En el paciente con cateterismo permanente se recomienda recambiar la sonda y posteriormente realizar el urocultivo para evitar la contaminación. No se deben recoger muestras de orina sistemáticamente en pacientes asintomáticos.

Infección asociada a otro tipo de dispositivos biomédicos

La infección asociada a implante de mama es una causa importante de morbilidad con una incidencia de hasta el 35% en pacientes oncológicos. Los microorganismos grampositivos (*S. aureus* y estreptococos) y algunos gramnegativos son los más frecuentes en infecciones precoces mientras que en las tardías (un mes después de la cirugía) predominan los estafilococos coagulasa negativos, las propionibacterias, y las micobacterias atípicas¹⁷.

La infección asociada a una malla tiene una incidencia de aproximadamente un 1-2%. Una vez colocada, la malla se impregna de plasma y fluido intersticial, los cuales contienen proteínas que actúan como receptores para ciertas adhesinas bacterianas iniciando así el desarrollo de la biopelícula. Los microorganismos más frecuentemente implicados en este tipo de infecciones son *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos y *E. coli*¹⁷.

La infección es la complicación más grave tras el implante de pene (2-3% en implantes primarios y hasta el 30% en reintervenciones), dado que esta puede originar múltiples complicaciones locales que generen intervenciones quirúrgicas, hospitalizaciones prolongadas, pérdida de funcionalidad del implante y daños psicológicos, además de generar un importante coste económico. Los estafilococos coagulasa negativos (especialmente *Staphylococcus*

epidermidis) son los microorganismos más frecuentes seguidos de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida* spp. e incluso *Neisseria gonorrhoeae*¹⁷.

La incidencia de infección asociada a dispositivos de neuroestimulación es muy variable, oscilando entre 0,6 y 12%. Los estafilococos (*S. aureus* y *S. epidermidis*) son los microorganismos más frecuentes, aunque en ocasiones se encuentra *P. acnes*, bacilos gramnegativos como *P. aeruginosa* y micobacterias atípicas como *Mycobacterium fortuitum*¹⁷.

La incidencia de infección asociada a implantes cocleares es baja, situándose entre el 1,6 y 10%. Lo más frecuente es que se afecte la herida quirúrgica, seguida de otitis media y las complicaciones derivadas como la mastoiditis o la meningitis. *S. aureus* es la causa más frecuente de infección de la herida quirúrgica y *S. pneumoniae* y *H. influenzae* de las infecciones secundarias. Respecto al diagnóstico microbiológico de estas infecciones, desafortunadamente, no existen guías ni recomendaciones. En general, si se objetivan colecciones/exudados periimplante se puede realizar una punción-aspiración, o extraer una muestra de tejido, cuando sea oportuno y enviar el material al laboratorio de Microbiología para observación microscópica y cultivo. Se deben extraer hemocultivos en aquellos pacientes que se presenten con fiebre o un cuadro séptico o sugestivo de bacteriemia. Si se opta por la retirada del implante, este se debe colocar en un frasco estéril y enviar al laboratorio de Microbiología para realizar un cultivo tras sonicación¹⁷.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas

El diagnóstico de las infecciones asociadas a la formación de biopelículas es complejo y debe combinar una perspectiva global y multidisciplinar que considere aspectos clínicos y hallazgos microbiológicos. Por tanto, requerirá una comunicación estrecha y fluida entre clínicos, microbiólogos, personal de enfermería y técnicos de laboratorio.

Recogida, transporte y conservación de muestras

Las muestras dependerán de que la infección se localice sobre un tejido vivo o sobre un biodispositivo. Siempre que sea posible las muestras se deben obtener antes del inicio del tratamiento antimicrobiano, en las mejores condiciones de asepsia, realizando previamente (cuando proceda) una correcta desinfección de la piel, y con una mínima manipulación desde su obtención hasta su procesamiento en el laboratorio. Se deben introducir en contenedores estériles apropiados sin formol ni otros conservantes y cuando exista sospecha de infección por hongos o micobacterias se debe evitar el uso de medios de transporte para anaerobios. El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible, pudiéndose conservar estas refrigeradas a 2-8 °C hasta su procesamiento un máximo de 24 h. Las muestras en medio de transporte para anaerobios se deben mantener a temperatura ambiente. Siempre que se pueda conviene reservar una porción de la muestra congelada para la realización posterior de estudios moleculares.

Procesamiento de las muestras

Siempre que sea posible, se recomienda realizar una observación microscópica de las muestras, por ejemplo con métodos de tinción rutinarios como la tinción de Gram, con el fin de visualizar las biopelículas y/o la presencia de células inflamatorias (leucocitos polimorfonucleares) que evidencian un proceso infeccioso en curso. Las siguientes muestras líquidas o semilíquidas no necesitan procesamiento previo: sangre para hemocultivo (en infección de válvula cardíaca nativa o protésica, infección asociada

a catéter intravascular, infección asociada a marcapasos y desfibriladores implantables, e infecciones en las que sea necesario), orina (incluida la obtenida a través de sonda urinaria), semen, secreción prostática, y líquido articular. Sin embargo, estas otras muestras semilíquidas sí lo requieren: secreciones bronquiales en la infección pulmonar crónica, secreciones purulentas en rinosinusitis y secreciones respiratorias en la NAVM. En general, las muestras respiratorias (sobre todo esputos) presentan una elevada consistencia y deben someterse a un proceso de homogeneización previa con agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditioneitol evitando un tratamiento prolongado que pueda inhibir o retrasar el crecimiento microbiano, o mecánico (sonicación suave). Dependiendo de su viscosidad puede ser necesario realizar procesamiento previo en muestras de pus en otitis, como en el caso de las secreciones respiratorias, agitando con suero salino o sonicando suavemente.

Biopsias

Se incluirían aquí los tejidos profundos en la infección crónica de herida y pacientes quemados, las biopsias óseas y de tejido periprotésico en la infección asociada a prótesis articular, las vegetaciones en infección de válvula cardíaca nativa o protésica cuando haya reemplazo valvular o necropsia y las biopsias del bolsillo subcutáneo en la retirada de marcapasos. Las muestras de biopsias se deben cortar y homogeneizar en un homogeneizador tipo *stomacher* o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo *brain heart infusión* (BHI), antes de su siembra en los medios de cultivo. Las extensiones para tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el portaobjetos o bien a partir de la muestra homogeneizada. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el homogeneizado a los medios de cultivo.

Si se dispone de técnicas moleculares, de los tejidos adheridos a válvulas cardíacas protésicas o dispositivos extracorpóreos, se separará una parte para cultivo y otra para realizar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) universal 16S ARNr y, si es posible, otra parte de la muestra se conservará en archivo a -70°C .

Prótesis, implantes retirados (procesamiento mediante sonicación)

En este grupo se incluirían los marcapasos y desfibriladores implantables, las prótesis articulares, y los implantes (mama, pene, cocleares, etc.). Cuando se produce la retirada completa o parcial del material protésico se deben retirar también los tejidos adheridos al mismo, y se deben procesar por separado como biopsias. En los dispositivos de electroestimulación se recomienda la sonicación del generador y los cables, siendo estos últimos los que han mostrado un mayor rendimiento diagnóstico. El procesamiento de los dispositivos explantados debe realizarse mediante una técnica de sonicación o agitación que permite desagregar la biopelícula. En el caso de no disponer de sonicador, se seguirá el mismo procedimiento realizando únicamente agitación en vórtex. Si se dispone de técnicas moleculares, del producto obtenido de la sonicación o agitación de válvulas cardíacas protésicas y dispositivos de electroestimulación cardíaca, se separarán 2 alícuotas de 1 ml, una para PCR y otra para archivo. No se ha establecido un punto de corte, como en el caso de la infección asociada a prótesis articular, para interpretar los resultados obtenidos a partir del cultivo del «sonicado» y los resultados deben ser interpretados con mucha cautela. No está recomendado sumergir los dispositivos en caldo de enriquecimiento para luego subcultivar, ni el uso de torundas que muestren la superficie del dispositivo^{17,20}.

Sondas urinarias y catéteres intravasculares

El cultivo tras sonicación de la sonda ha demostrado ser más sensible que el urocultivo¹⁹ al asegurarse la detección de la biopelícula

tras el aislamiento únicamente de las bacterias adherentes. Hoy por hoy no se cuenta con protocolos estandarizados para la siembra tras la sonicación o con los recuentos e interpretaciones posteriores de los cultivos, por lo que no se puede prescindir del urocultivo obtenido a través de la sonda¹⁹. Con respecto al procesamiento de los catéteres, se desconoce si es necesario realizar sonicación previa a la siembra o si se debe determinar la colonización intraluminal. La técnica semicuantitativa de Maki es sencilla y está aceptada como técnica de referencia, sin embargo, tiene limitaciones (sensibilidad desconocida, baja especificidad, e imposibilidad para diagnosticar infecciones de origen endoluminal)¹⁷. Las técnicas que permiten determinar la colonización conjunta intra- y extraluminal (lavado del interior del catéter y sonicación) no alcanzan por separado una sensibilidad superior al 58%. El método descrito por Liñares et al.¹⁴ (que combina los métodos de Cleri y Maki) presenta una sensibilidad del 100% aunque es de difícil implementación en el laboratorio por su laboriosidad, por lo que la técnica de Maki continúa siendo la técnica de referencia en la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica^{14,17}.

Cultivo microbiológico

Al contrario de la observación microscópica, el cultivo requiere la liberación previa de los microorganismos de la biopelícula por medio de procedimientos físicos (sonicación, trituración y/o agitación). Estas infecciones suelen cursar con una carga baja de microorganismos, lo que hace necesario emplear medios de enriquecimiento; al mismo tiempo la toma de las muestras es susceptible de contaminación. Por ello es clave distinguir entre los microorganismos presentes en la biopelícula de aquellos que sean parte de la microbiota normal de la zona, lo que se complica por el hecho de que los microorganismos de la microbiota normal pueden contribuir a la biopelícula (por ejemplo, *S. epidermidis*). Lo ideal es que tanto los cultivos como la observación microscópica sean cuantitativos o semicuantitativos y, siempre que sea posible, tomar múltiples muestras para aumentar la sensibilidad. En este tipo de infecciones, algunos microorganismos pueden ser viables y observables microscópicamente pero no cultivables en los medios convencionales, lo que obliga a recurrir a medios especiales y/o técnicas moleculares.

La inoculación directa de las muestras de homogeneizados de biopsias, prótesis osteoarticulares y dispositivos biomédicos intra- y extravasculares debe realizarse en medios convencionales para bacterias aerobias (agar sangre, agar chocolate) y medio selectivo para bacilos gramnegativos (agar MacConkey o similar), bacterias anaerobias (agar *Brucella* o agar Schaedler) y estreptococos (agar sangre ácido nalidíxico, CNA). Además se inoculará un medio líquido de enriquecimiento tipo caldo BHI, tryptic soy broth (TSB) o tioglicolato. En caso de sospecha de infección por micobacterias se inocularán medios específicos (como Middlebrook 7H10 en placa). En el caso de sospecha de *Neisseria gonorrhoeae*, en la infección osteoarticular, se inoculará una placa de medio Thayer-Martin incubada en atmósfera con 5% de CO_2 . Las placas de agar sangre, agar chocolate y CNA (colistina ácido nalidíxico) se incubarán a $35-37^{\circ}\text{C}$ con un 5% de CO_2 . Las placas de agar *Brucella* y agar Schaedler para el cultivo de anaerobios se incubarán a $35-37^{\circ}\text{C}$ en anaerobiosis. Los caldos se incubarán a $35-37^{\circ}\text{C}$.

El tiempo de incubación de las placas será de 2-7 días y los caldos de enriquecimiento de 7-10 días. En caso de sospecha de microorganismos de crecimiento lento (*Brucella* spp., micobacterias u hongos), este período se alargará convenientemente. Las placas y los medios líquidos serán examinados diariamente para detectar la presencia de microorganismos.

Técnicas moleculares

Estas técnicas permiten la identificación de microorganismos en caso de infección cuando el cultivo es negativo, bien por la presencia de microorganismos difícilmente cultivables o bien porque ha existido tratamiento antibiótico previo que inhibe el crecimiento microbiano. Se pueden realizar sobre la mayoría de muestras. En la actualidad, las técnicas que se emplean con mayor frecuencia son las PCR universales o específicas basadas en la detección de ADN o ARN. Las primeras se basan en la amplificación del gen que codifica para el ADN ribosomal 16S (o ITS para el caso de los hongos) y posterior secuenciación, comparación de secuencias con bases de datos e identificación del microorganismo. Las segundas permiten detectar la presencia de microorganismos concretos «no cultivables» cuyas infecciones cursan, frecuentemente, con hemocultivos negativos como *Tropheryma whippelii*, *C. burnetii* o *Bartonella* spp. Ambos formatos pueden diseñarse de manera cuantitativa. Las técnicas moleculares pueden ser más sensibles que el cultivo en algunas ocasiones, pero no deben sustituirlo sino complementarlo. Son necesarios más estudios para definir su papel en el diagnóstico de las infecciones asociadas a la formación de biopelículas así como protocolos que describan su utilización, aplicación, y generalicen su uso en laboratorios clínicos.

Estudios de sensibilidad de las biopelículas a los antimicrobianos

Los microorganismos que forman parte de la biopelícula son significativamente más resistentes a los antimicrobianos que los que crecen planctónicamente, y no se han establecido por el momento puntos de corte para estas formas de crecimiento ya que los estudios clásicos de sensibilidad a los antimicrobianos se realizan, aun hoy en día, con bacterias en estado planctónico. Por lo tanto, en general, los resultados de las pruebas de sensibilidad clásicas pueden no ser extrapolables a infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. En los últimos años se han implementado y probado en diferentes especies de bacterias o levaduras modelos de desarrollo de biopelículas *in vitro*²¹. Sin embargo, la falta actual de estandarización de los métodos, parámetros, e interpretación de los resultados limita la aplicación de los datos obtenidos en el entorno clínico, incluyendo la comparación de diferentes estrategias de tratamiento^{21,22}.

Modelos *in vitro*

En función de la liberación, continua o estática de nutrientes (y otras características como si es necesario detener los experimentos para obtener datos estructurales o de recuentos de UFC) los modelos pueden clasificarse en cerrados o estáticos (*batch cultures*) y en abiertos o continuos (cultivos continuos). Los modelos cerrados tienen la ventaja de ser sencillos, factibles, reproducibles, baratos y poco susceptibles a la contaminación lo cual los hace fácilmente aplicables en la rutina del laboratorio de Microbiología. Además, con pequeñas modificaciones en los protocolos también pueden permitir estudios de viabilidad. La mayor desventaja se encuentra en que el grosor de las biopelículas no supera los 50 μm , y esto limita los estudios estructurales. Ejemplos de estos modelos son los estudios de sensibilidad en placas multipocillo o en el modelo de Calgary²³. Los modelos abiertos reproducen con más fidelidad la dinámica de formación de la biopelícula *in vivo*, ya que se controlan parámetros como el flujo del medio, la llegada de nutrientes y la temperatura. Mediante un flujo continuo se mantienen las características ambientales constantes, controlando la temperatura y la llegada del medio de cultivo. Estos modelos

permiten, además, la implementación de modelos PK/PD y la observación al microscopio de la formación de la biopelícula, así como la determinación de parámetros estructurales como biomasa o grosor. Con estos sistemas, las células planctónicas se eliminan con el flujo, por lo que se asegura el análisis de las células que forman parte de la biopelícula. Se han realizado estudios de sensibilidad en celda de flujo, biorreactores (como el CDC) o el sistema *Bioflux*.

Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos de actividad antibiótica

Gracias a los estudios de sensibilidad realizados sobre estos modelos se han podido definir parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) que cuantifican la actividad de los antimicrobianos sobre las biopelículas como la concentración mínima inhibitoria de la biopelícula (CMIB: concentración más baja de antibiótico que dar lugar a una diferencia de DO650 nm $\leq 10\%$ de la media de dos lecturas de pocillos de control positivo), la concentración bactericida de la biopelícula (CBB: concentración más baja que elimina el 99,9% de las células recuperadas de un cultivo de biopelícula en comparación con el crecimiento control), la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB: concentración más baja de antibiótico necesaria para erradicar la biopelícula o, en otras palabras, la menor concentración de agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible en el medio de recuperación de las células de la biopelícula), o la concentración de prevención de biopelícula (CPB: parámetro que podría utilizarse con el fin de reducir la densidad celular para prevenir la formación de la biopelícula).

Estudios *in vitro* y correlación con los ensayos clínicos

En casi todos los casos, los parámetros descritos se han definido mediante el sistema de Calgary²³ o relacionados. Estos parámetros han servido para comparar la actividad de los antibióticos sobre las bacterias en crecimiento planctónico y en las biopelículas. Muchos de los primeros trabajos se hicieron sobre biopelículas formadas por *P. aeruginosa*. En estos, la mayoría de los antibióticos presentan una CMIB dos o más diluciones mayor que la CMI, al igual que sucede con la CMEB o CBB vs. CMB. Sin embargo, estudios con otros modelos y otros microorganismos, han demostrado la complejidad de la interacción de los antibióticos sobre las biopelículas y que, desafortunadamente, pocas conclusiones prácticas generales pueden extraerse ya que los resultados están más ligados al diseño de los experimentos o al modelo utilizado que al antibiótico empleado. De hecho, en base al análisis de los dos ensayos clínicos que comparan el tratamiento de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en FQ según los estudios de sensibilidad estándar versus los estudios de sensibilidad en biopelículas, la evidencia actual es insuficiente para recomendar la elección de antibióticos basados en pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre biopelículas en este contexto²⁴.

Información de los resultados

El informe microbiológico en una infección relacionada con la formación de biopelículas debería contener resultados de la observación microscópica, el cultivo y los estudios de sensibilidad cuando proceda. Aunque las tinciones de Gram se deberían realizar e informar lo antes posible e incluso de forma preliminar, para el resultado final se deberán interpretar conjuntamente los hallazgos de las diferentes metodologías empleadas.

En la observación microscópica, se debe/n visualizar la extensión/es completa/s y su resultado no excluirá el cultivo de la muestra. Se valorará e informará la observación de leucocitos

polimorfonucleares y/o si se detecta una biopelícula microbiana, utilizando términos descriptivos como «En la tinción de Gram se observan bacilos gramnegativos dispuestos en agregados junto con la presencia de leucocitos polimorfonucleares sugestivos de una infección asociada a biopelícula».

Los microorganismos en los cultivos se encuentran en crecimiento planctónico, así que su interpretación no se modifica. La concordancia entre la observación microscópica de la biopelícula y un cultivo puro del presunto microorganismo es altamente sugerente de tratarse de una infección relacionada con el mismo en forma de biopelícula. En este escenario tendrá sentido realizar el estudio de sensibilidad sobre dicho microorganismo empleando un modelo de crecimiento en biopelícula. Cuando no exista concordancia, el microbiólogo deberá ser capaz de dar una interpretación razonable y proporcionar un resultado útil al clínico. Así, una observación microscópica positiva podría ir acompañada de un cultivo negativo cuando el paciente haya recibido tratamiento antibiótico, cuando se trate de bacterias no cultivables, o si el procesamiento de la muestra puede haber alterado los resultados. Si se encuentran disponibles para el laboratorio, en este caso, sería muy útil la realización de técnicas moleculares sobre la muestra. La situación inversa (observación microscópica negativa con cultivos positivos) plantea mayor complejidad ya que dependiendo del tipo de infección, no se puede excluir una contaminación de la muestra durante su obtención o procesamiento. Así, en muchas infecciones (como en las relacionadas con dispositivos exógenos) se debería dar valor clínico a microorganismos que en otras circunstancias se considerarían como microbiota normal de la piel, particularmente cuando coinciden biotipo y perfil de sensibilidad, o cuando se encuentren en más de una muestra del paciente. De igual modo, los cultivos mixtos deberán ser interpretados en función del tipo de infección, la observación microscópica y el aislamiento repetido en diferentes muestras, antes de decidir si realizar estudios de sensibilidad convencional o sobre la biopelícula. Las tinciones o cultivos negativos no excluyen una infección relacionada con la formación de biopelícula y se recomienda guardar las placas de la siembra directa, así como una porción de las muestras, por si fuera necesario realizar pruebas adicionales.

En algunas infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, sobre todo cuando estas constituyen un foco para la infección sistémica (por ejemplo, las asociadas a dispositivos intravasculares o a catéteres urinarios, las exacerbaciones de la infección pulmonar crónica), los estudios de sensibilidad clásicos se pueden aplicar exitosamente. Sin embargo, los clínicos deben ser informados de que se puede producir una recurrencia de la infección por el foco de la biopelícula si este no se erradica. Desafortunadamente, no existen recomendaciones sobre cómo informar estos resultados y además, no se ha encontrado una ventaja clínica en los pacientes tratados en función de los resultados de los estudios de sensibilidad en biopelículas, respecto a los convencionales. Se deberían registrar parámetros como la CMIB para los distintos antibióticos y microorganismos sin proporcionar una interpretación (S, sensible; I, intermedio y R, resistente) en ausencia de puntos de corte definidos por agencias oficiales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio Oliver del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Son Espases, por su valiosa ayuda en la elaboración y revisión de este manuscrito.

Bibliografía

- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318–22.
- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. 2013;136:1–51.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014 ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21 Suppl 1:S1–25.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288:1251–4.
- Macià MD, Blanquer D, Togores B, Saulea J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3382–6.
- Luján AM, Macià MD, Yang L, Molin S, Oliver A, Smania AM. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One*. 2011;6:e27842.
- Macià MD, Pérez JL, Molin S, Oliver A. Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:5230–7.
- Doring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros*. 2012;11:461–79.
- Ramakrishnan Y, Shields RC, Elbadawey MR, Awilson J. Biofilms in chronic rhinosinusitis: what is new and where next. *J Laryngol. Otol*. 2015;129:744–51.
- Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*. 2002;287:1710–5.
- Oates A, Bowling FL, Boulton AK, Bowler PG, Metcalf DG, McBain AJ. The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *J Diabetes Res*. 1535;2014:86.
- Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 2009;169:463–73.
- Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate*. 1993;23:107–14.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977;296:1305–9.
- Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol*. 1985;21:357–60.
- Klug D, Balde M, Pavin D, Hidden-Lucet F, Clementy J, Sadoul N, et al., PEO-PLÉ Study Group. Risk factors related to infections of implanted pacemakers and cardioverter-defibrillators: results of a large prospective study. *Circulation*. 2007;116:1349–55.
- De Cueto-López M, del Pozo-León JL, Franco-Álvarez de Luna F, Marin-Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:655–60.
- Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice Infection associated with prosthetic joints. *New Engl J Med*. 2009;361:787–94.
- Hola V, Ruzicka F, Horka M. Microbial diversity in biofilm infections of the urinary tract with the use of sonication techniques. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59:525–8.
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *New Engl J Med*. 2007;357:654–63.
- Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:981–90.
- Malone M, Goeres DM, Gosbell I, Vickery K, Jensen S, Stoodley P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Rev Antiinfect Ther*. 2016;15:147–56.
- Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1915–22.
- Waters V, Ratjen F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;5(3C):CD009528.