

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



60

## Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas

Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

María D. Macià Romero

Autores

José Luis Del Pozo León  
María Díez Aguilar  
Jesús Guinea Ortega  
María D. Macià Romero



ISBN: 978-84-617-3988-2

**EDITORES:**

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.  
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

**SUGERENCIA DE CITACIÓN:**

Del Pozo León JL, Díez Aguilar M, Guinea Ortega J, Maciá Romero MD, Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. 60. Maciá Romero, MD (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

**AVISO:**

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

## Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

### Editores:

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

# 60. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. 2017

### Coordinadora:

María D. Macià Romero<sup>1</sup>

### Autores:

José Luis Del Pozo León<sup>2</sup>  
María Díez Aguilar<sup>3</sup>  
Jesús Guinea Ortega<sup>4</sup>  
María D. Macià Romero<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa) y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa-REIPI, <sup>2</sup>Área de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Microbiología, Laboratorio de Biofilms Microbianos, Clínica Universidad de Navarra; <sup>3</sup>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. <sup>4</sup>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.

## ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 1.         | Introducción .....   | 7  |
| 2.         | Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas .....  | 8  |
| 2.1.       | Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en tejidos.....  | 8  |
| 2.1.1.     | Infección pulmonar crónica.....  | 5  |
| 2.1.1.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 8  |
| 2.1.1.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 8  |
| 2.1.2.     | Rinosinusitis crónica.....   | 10 |
| 2.1.2.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 10 |
| 2.1.2.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 10 |
| 2.1.3.     | Otitis crónica.....  | 10 |
| 2.1.3.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 10 |
| 2.1.3.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 11 |
| 2.1.4.     | Infección crónica de herida.....   | 11 |
| 2.1.4.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 11 |
| 2.1.4.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 12 |
| 2.1.5.     | Infección en pacientes quemados.....   | 12 |
| 2.1.5.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 12 |
| 2.1.5.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 12 |
| 2.1.6.     | Infección de válvula cardíaca nativa.....  | 13 |
| 2.1.6.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 13 |
| 2.1.6.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 13 |
| 2.1.7.     | Infección prostática.....  | 14 |
| 2.1.7.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 14 |
| 2.1.7.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 14 |
| 2.1.8.     | Vaginosis .....  | 14 |
| 2.1.8.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 14 |
| 2.1.8.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 14 |
| 2.2.       | Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas sobre dispositivos biomédicos.....   | 15 |
| 2.2.1.     | Infección asociada a catéter vascular.....   | 15 |
| 2.2.1.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 15 |
| 2.2.1.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 15 |
| 2.2.2.     | Infección sobre válvula cardíaca protésica, marcapasos e injertos.....   | 16 |
| 2.2.2.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 16 |
| 2.2.2.1.1. | Endocarditis sobre válvula cardíaca protésica.....   | 16 |
| 2.2.2.1.2. | Infección asociada a dispositivos de electroestimulación: marcapasos, desfibriladores implantables y dispositivos de resincronización..... | 17 |
| 2.2.2.1.3. | Infección asociada a injertos vasculares.....  | 17 |
| 2.2.2.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 17 |
| 2.2.3.     | Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVIM).....  | 18 |
| 2.2.3.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 18 |
| 2.2.3.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 18 |
| 2.2.4.     | Infección asociada a prótesis articular.....   | 18 |
| 2.2.4.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 18 |
| 2.2.4.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 19 |
| 2.2.5.     | Infección asociada a sonda urinaria.....   | 19 |
| 2.2.5.1.   | Consideraciones clínicas.....  | 19 |
| 2.2.5.2.   | Consideraciones microbiológicas.....   | 19 |
| 2.2.6.     | Infección asociada a otro tipo de dispositivos biomédicos.....   | 20 |
| 2.2.6.1.   | Infección asociada a implantes de mama.....  | 20 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.6.1.1. Consideraciones clínicas.....   | 20        |
| 2.2.6.1.2. Consideraciones microbiológicas.....  | 20        |
| 2.2.6.2. Infección asociada a malla abdominal.....   | 20        |
| 2.2.6.2.1. Consideraciones clínicas.....   | 20        |
| 2.2.6.2.2. Consideraciones microbiológicas.....  | 21        |
| 2.2.6.3. Infección asociada a implantes de pene.....   | 21        |
| 2.2.6.3.1. Consideraciones clínicas.....   | 21        |
| 2.2.6.3.2. Consideraciones microbiológicas.....  | 21        |
| 2.2.6.4. Infección asociada a dispositivos de neuroestimulación.....   | 21        |
| 2.2.6.4.1. Consideraciones clínicas.....   | 21        |
| 2.2.6.4.2. Consideraciones microbiológicas.....  | 21        |
| 2.2.6.5. Infección asociada a implantes cocleares.....   | 21        |
| 2.2.6.5.1. Consideraciones clínicas.....   | 21        |
| 2.2.6.5.2. Consideraciones microbiológicas.....  | 22        |
| <b>3. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1. Consideraciones previas.....  | 22        |
| 3.2. Muestras adecuadas. Recogida, transporte y conservación.....  | 22        |
| 3.2.1. Muestras adecuadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en tejidos.....                    | 22        |
| 3.2.1.1. Infección pulmonar crónica.....   | 22        |
| 3.2.1.2. Rinosinusitis.....  | 22        |
| 3.2.1.3. Otitis crónica.....   | 23        |
| 3.2.1.4. Infección de herida.....  | 23        |
| 3.2.1.5. Infección en pacientes quemados.....  | 23        |
| 3.2.1.6. Infección asociada a válvula cardíaca nativa.....   | 23        |
| 3.2.1.7. Infección prostática.....   | 24        |
| 3.2.1.8. Vaginosis.....  | 24        |
| 3.2.2. Muestras adecuadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas sobre dispositivos biomédicos..... | 25        |
| 3.2.2.1. Infección asociada a catéter intravascular.....   | 25        |
| 3.2.2.1.2. Métodos basados en la retirada del catéter.....   | 26        |
| 3.2.2.2. Infección de válvula cardíaca protésica, marcapasos e injertos.....   | 26        |
| 3.2.2.2.1. Infección de válvula cardíaca protésica.....  | 26        |
| 3.2.2.2.2. Infección asociada a marcapasos y desfibriladores implantables.....   | 27        |
| 3.2.2.3. Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM).....  | 27        |
| 3.2.2.4. Infección de prótesis articular e implantes ortopédicos.....  | 27        |
| 3.2.2.5. Infección asociada a sonda urinaria.....  | 27        |
| 3.2.2.6. Infección asociada a otro tipo de implantes biomédicos.....   | 28        |
| 3.2.2.6.1. Infección asociada a implantes de mama.....   | 28        |
| 3.2.2.6.2. Infecciones asociadas a mallas abdominales, implantes de pene, sistemas de neuroestimulación, e implantes cocleares.....                              | 28        |
| 3.3. Detección microscópica.....   | 28        |
| 3.3.1. Microscopía óptica.....   | 29        |
| 3.3.2. Microscopía láser confocal (MLC).....   | 29        |
| 3.3.3. Microscopía mediante hibridación de fluorescencia <i>in situ</i> (FISH).....  | 30        |
| 3.3.4. Microscopía electrónica.....  | 30        |
| 3.4. Cultivo.....  | 31        |
| 3.4.1. Procesamiento previo de las muestras.....   | 31        |
| 3.4.1.1. Muestras líquidas o semilíquidas que no necesitan procesamiento previo.....   | 33        |
| 3.4.1.2. Muestras semilíquidas que necesitan procesamiento previo.....   | 33        |
| 3.4.1.3. Muestras semilíquidas en las que el procesamiento previo depende de la viscosidad de la muestra.....  | 33        |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.1.4. Biopsias.....   | 33 |
| 3.4.1.5. Prótesis, implantes retirados (procesamiento mediante sonicación).....                              | 34 |
| 3.4.1.6. Muestras de procesamiento previo al cultivo controvertido.....                                      | 34 |
| 3.4.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación.....  | 35 |
| 3.5. Técnicas moleculares.....   | 36 |
| 3.5.1. PCRs universales.....   | 36 |
| 3.5.2. PCRs específicas.....   | 37 |
| 3.5.2.1. Detección de ADN.....   | 37 |
| 3.5.2.2. Detección de ARN.....   | 37 |
| 3.6. Otros métodos diagnósticos.....   | 37 |
| 3.6.1. Marcadores inflamatorios.....   | 37 |
| 3.6.2. Serología.....  | 37 |
| <b>4.</b> Estudios de sensibilidad de las biopelículas a los antimicrobianos.....                            | 38 |
| 4.1. Estudios de sensibilidad en modelos cerrados o estáticos.....   | 40 |
| 4.1.1. Estudios de sensibilidad en placas multipocillo.....  | 40 |
| 4.1.1.1. Estudios de sensibilidad a antifúngicos en placas multipocillo.....                                 | 40 |
| 4.1.1.2. Estudios de producción de biopelículas en cepas de <i>Candida</i> spp.....                          | 40 |
| 4.1.2. Estudios de sensibilidad en el dispositivo de Calgary.....  | 41 |
| 4.2. Estudios de sensibilidad en modelos abiertos o dinámicos.....   | 41 |
| 4.2.1. Estudios de sensibilidad en celda de flujo.....   | 41 |
| 4.2.2. Estudios de sensibilidad en biorreactores: reactor de biopelículas CDC.....                           | 42 |
| 4.2.3. Sistema <i>Bioflux</i> .....  | 42 |
| 4.3. Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) de actividad antibiótica.....                      | 43 |
| 4.4. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....   | 44 |
| 4.5. Correlación clínica de los estudios de sensibilidad en biopelículas.....                                | 44 |
| 4.6. Conclusiones prácticas para los estudios de sensibilidad de las biopelículas a los antimicrobianos..... | 45 |
| <b>5.</b> Información de los resultados.....   | 45 |
| 5.1. Interpretación e información de los resultados del diagnóstico microbiológico.....                      | 45 |
| 5.1.1. Tinción de Gram.....  | 45 |
| 5.1.2. Cultivos.....   | 46 |
| 5.1.3. Información de los resultados del estudio de sensibilidad.....  | 46 |
| <b>6.</b> Bibliografía.....  | 48 |

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-IRB-01. Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.
2. PNT-IRB-02. Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de *Candida* spp. mediante placas multipocillo
3. PNT-IRB-03. Estudios de sensibilidad en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el dispositivo de Calgary modificado

## 1. INTRODUCCIÓN

Las biopelículas están integradas por comunidades complejas de microorganismos, generalmente adheridas a una superficie sólida o líquida y embebidas en una matriz de exopolisacárido. Esta organización social supracelular surge como estrategia de supervivencia en ambientes hostiles, como el propio ser humano, dotando a los microorganismos embebidos en ella de resistencia al aclaramiento mecánico, al sistema inmunitario y a los agentes antimicrobianos. Las biopelículas están estructuradas tanto a nivel funcional como genético, siendo característicos los gradientes fisiológicos y bioquímicos que se establecen desde la superficie hasta las capas internas, determinados por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno y agua y que explican, en gran medida, las distintas tasas de crecimiento exhibidas por los microorganismos que integran dicha estructura. Los denominados sistemas *quorum sensing*, sistemas de señalización célula a célula que se inducen cuando la densidad bacteriana traspasa un umbral de microorganismos, son fundamentales para el establecimiento y desarrollo de las biopelículas. Estos, además de regular la densidad celular, son capaces de inducir cambios en la transcripción genética mediante la variación de la concentración de moléculas de señalización como mensajeros secundarios y ARNs de cadena corta.

La formación y desarrollo de una biopelícula, clásicamente, incluye tres etapas: adhesión, maduración y dispersión. La fase de adhesión está mediada por los flagelos y pili en las bacterias gramnegativas y por las proteínas de superficie en las grampositivas, así como algunas proteínas (aglutininas) en el caso de *Candida albicans*. Tras la unión inicial, la biopelícula prolifera formando microcolonias y produciendo una matriz extracelular. Esta última está compuesta principalmente por exopolisacáridos, pequeñas cantidades de proteínas, ADN extracelular, productos de lisis y componentes del hospedador. Entre sus funciones principales destaca actuar como barrera protectora contra las defensas del hospedador, los antimicrobianos, la desecación o las especies reactivas del oxígeno, así como proporcionar cohesión a la estructura y actuar como fuente de nutrientes. Finalmente se produce la dispersión de la biopelícula, momento en el que algunos microorganismos liberados de la matriz pueden migrar y colonizar nuevas superficies distantes de la biopelícula original empezando el ciclo de nuevo. Esta dualidad sésil/planctónica de los microorganismos es un proceso regulado por inductores intra y extracelulares que modulan los

niveles de moléculas de señalización, mensajeros secundarios y ARNs de cadena corta, en respuesta más a un proceso adaptativo que genéticamente predeterminado.

Los microorganismos que forman parte de una biopelícula (microorganismos en crecimiento en biopelícula) muestran características diferentes a los que se desarrollan en estado planctónico (crecimiento sin formación de biopelícula). Una de las más relevantes es su mayor tolerancia (o resistencia) a los antimicrobianos (incluyendo desinfectantes) que puede oscilar entre 100 y 1000 veces más respecto a los microorganismos en estado planctónico. Existen varias razones que explican esta mayor resistencia; se podrían distinguir mecanismos de tolerancia física como la disminución de la penetración, de tolerancia fisiológica debidos a las distintas tasas de crecimiento de las células en las capas de la biopelícula incluyendo el fenómeno de los microorganismos “persistentes”, mecanismos de resistencia convencional como la debida a transferencia genética y a los propios eventos mutacionales y por último, mecanismos de resistencia adaptativa como la inducción de bombas de expulsión, enzimas u otros sistemas.

Las infecciones relacionadas con biopelículas representan entre un 65 y un 80% de todas las infecciones poniendo de relieve así su gran impacto clínico. La transición del estado planctónico al modo de crecimiento en biopelícula se relaciona con un estado crónico de la infección, en contraste con las fases más agudas causadas por microorganismos en estado planctónico. Las infecciones crónicas se caracterizan por la persistencia del microorganismo a pesar de la respuesta inmunológica del hospedador y de emplear un tratamiento antimicrobiano adecuado. Las infecciones asociadas a la formación de biopelículas se pueden localizar en casi cualquier tejido del cuerpo humano, destacando la infección de herida crónica, las infecciones pulmonares crónicas, como ocurre en las infecciones respiratorias de los pacientes con fibrosis quística (FQ) o bronquiectasias, o la endocarditis. Además de formarse sobre tejidos vivos, las biopelículas están característicamente implicadas en las infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos como catéteres vasculares, válvulas cardíacas protésicas, marcapasos e injertos vasculares, prótesis articulares e implantes ortopédicos, sondas urinarias, etc. que se tratarán específicamente en los próximos apartados. Cabe destacar el problema sanitario que suponen estas infecciones. Valgan como ejemplo los siguientes datos:



- 1) Un 80% de los más de 60.000 pacientes diagnosticados de FQ en la población occidental desarrollará infección respiratoria crónica (IRC) y rinosinusitis.
- 2) Más del 60% de los pacientes con infecciones crónicas de heridas (que suponen un 1-2% de la población occidental) sufrirá infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.
- 3) Un 0,5-2% de todos los pacientes con dispositivos ortopédicos desarrollará una infección durante los dos primeros años posteriores a la cirugía.
- 4) La densidad de incidencia de bacteriemia asociada a catéter en las unidades de cuidados intensivos (UCI) es de 5 episodios por 1.000 días de uso del catéter.
- 5) La formación de biopelículas se ha relacionado con el desarrollo de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) que sucede en 9-27% de los pacientes con tubos endotraqueales (TET).
- 6) Las tasas de infección asociada a sondaje urinario son incluso superiores, ya que más del 50% de los catéteres insertados se infectan durante los primeros 10-14 días.
- 7) El 1-2% de pacientes con injertos de tejido experimentan eventos adversos en los que la mayoría tiene que ver con la presencia de biopelículas, siendo por ejemplo la prevalencia de infección asociada a implantes de mama de un 2-24%.

En general, las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas son difíciles de diagnosticar y de tratar, existiendo en la actualidad muchas dudas en cuanto al manejo de estos pacientes. 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 formas pierdan las características propias y pueda conducir a error la extrapolación de los datos de sensibilidad a los antimicrobianos de acuerdo a su forma planctónica, lo que con frecuencia conduce a fracasos terapéuticos o recurrencias de las infecciones crónicas.

En el presente documento se abordan tanto el diagnóstico microbiológico como los estudios de sensibilidad en las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas para los que no existen aún técnicas estandarizadas o consensuadas de manera generalizada.

## 2. INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

### 2.1. INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN TEJIDOS

#### 2.1.1. Infección pulmonar crónica

##### 2.1.1.1. Consideraciones clínicas

Las enfermedades pulmonares crónicas representan un factor predisponente para la infección crónica. Las infecciones asociadas a la FQ son el paradigma de la infección pulmonar crónica, así son muchas las características fisiopatológicas compartidas con otras patologías respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las bronquiectasias.

La EPOC se define como una limitación crónica al flujo aéreo, no totalmente reversible, caracterizada por una respuesta inflamatoria anormal a partículas nocivas y gases (fundamentalmente al tabaco), acompañada, frecuentemente, por disnea progresiva y tos, y una historia natural con agudizaciones y comorbilidades. Dicha inflamación bronquial crónica junto con la pérdida de la función pulmonar, así como el uso continuado de antibióticos son factores de riesgo para el desarrollo de infecciones. En la actualidad, la EPOC es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y representa un grave problema económico y socio-sanitario. Las bronquiectasias se definen como una enfermedad pulmonar crónica en la que hay una dilatación anormal e irreversible del árbol bronquial causada por la destrucción de los componentes elásticos y musculares de las paredes bronquiales. Las bronquiectasias cursan con frecuencia con broncorrea, tos, infecciones pulmonares de repetición y un grado variable de alteración ventilatoria de tipo obstructivo o mixta. En general, aunque las causas de las bronquiectasias son heterogéneas, suelen conducir a la dilatación e inflamación persistente del árbol bronquial que favorece la lesión del epitelio bronquial alterando la escalera mucociliar e impidiendo la adecuada eliminación del moco y facilitando así la adherencia microbiana.



La FQ es una enfermedad multisistémica que afecta a los pulmones, sistema digestivo, glándulas sudoríparas, y al aparato reproductor. Se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para el regulador de la conductancia transmembrana (CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. Los pacientes con FQ presentan un transporte anormal de cloro y sodio en todos los tejidos exocrinos, dando como resultado un sudor característicamente salado junto con una deshidratación de las secreciones en bronquios, tracto biliar, páncreas, intestino y sistema reproductor que aumenta la viscosidad de las mismas. A nivel respiratorio, la mayor viscosidad de las secreciones mucosas predispone a la enfermedad bronquial crónica y a las bronquiectasias. La disfunción del CFTR disminuye el volumen del fluido paraciliar en el tracto respiratorio inferior a la par que impide el desprendimiento del moco de los conductos de las glándulas de la submucosa en las vías aéreas y a su vez altera el aclaramiento mucociliar de los microorganismos inhalados predisponiendo a la colonización/infección broncopulmonar. La infección pulmonar crónica continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en la mayoría de estos pacientes.

### 2.1.1.2. Consideraciones microbiológicas

Las enfermedades pulmonares de base predisponentes también comparten algunos de los microorganismos aislados con mayor frecuencia en la infección crónica. Aunque la formación de biopelículas está asociada con la colonización crónica, los mismos microorganismos integrantes de la biopelícula son los responsables de las reagudizaciones o exacerbaciones agudas. En los pacientes con EPOC en función de la gravedad y el tratamiento antibiótico recibido por el paciente con anterioridad, predominan *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* en los pacientes con obstrucción leve o moderada; en caso de obstrucción grave o muy grave suelen estar implicadas además enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,...). Si el paciente ha recibido tratamiento antibiótico en los últimos tres meses, o en cuatro o más ocasiones en el curso del último año, aumenta la probabilidad de aislar *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo asociado con una intensa respuesta inflamatoria y con mala evolución de la enfermedad.

Los patógenos implicados con mayor frecuencia

con la colonización-infección asociada a bronquiectasias son *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Esta última, es la causa principal de infección crónica y, al igual que en la EPOC, también está asociada a un deterioro de la función pulmonar (extensión de las bronquiectasias y una obstrucción al flujo aéreo más grave) que además sucede con mayor rapidez que en pacientes con infecciones por otros microorganismos. Esto se asocia a además a una peor calidad de vida y a un peor pronóstico.

En el caso de la FQ, a pesar de la respuesta inflamatoria y la terapia intensiva con antibióticos, las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex (en su mayoría *B. multivorans* y *B. cenocepacia*) y *Achromobacter xylosoxidans*, frecuentemente persisten, provocando insuficiencia respiratoria. También pueden estar implicados otros microorganismos como *S. aureus*, *H. influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* y micobacterias no tuberculosas, *Aspergillus fumigatus* y otros hongos filamentosos. La infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ. Este bacilo gramnegativo productor de oxidasa destaca por su extraordinaria capacidad adaptativa y evolutiva atribuible a la elasticidad de su gran genoma de más de 6 Mb. *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a una gran variedad de antibióticos a lo que se suma su enorme capacidad de desarrollar y adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Sometida a la elevada presión selectiva del microclima del pulmón en la infección crónica, *P. aeruginosa* experimenta una intensa diversificación y adaptación representada por fenotipos como el mucoide, debido a la hiperproducción de alginato, el enano o puntiforme, diversas auxotrofías, u otros de alteración del flagelo o del lipopolisacárido (LPS). Es importante destacar que la conversión mucoide es una de las mutaciones adaptativas más frecuentes (80 a 90% de los pacientes con infección pulmonar crónica) y relevantes en este contexto. Otra característica común de estas infecciones crónicas por *P. aeruginosa*, es la alta prevalencia (30 a 60% de los pacientes) de cepas hipermutadoras deficientes en el sistema de reparación del emparejamiento erróneos del ADN, en contraste con lo que se observa en las infecciones agudas (<1%). La presencia de cepas hipermutadoras se ha vinculado a las altas tasas de resistencia a antibióticos y, a su vez, a una mayor frecuencia de mutaciones adaptativas. En consonancia, también en las biopelículas se ha demostrado que la

hipermutación está asociada a diversificación fenotípica y adaptabilidad, así como a la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, una vez establecida la infección crónica por *P. aeruginosa*, su erradicación con los tratamientos antibióticos convencionales es extremadamente difícil, si no imposible.

## 2.1.2. Rinosinusitis crónica

### 2.1.2.1. Consideraciones clínicas

La rinosinusitis crónica (RSC) es una enfermedad inflamatoria que afecta a los senos paranasales y a la mucosa de las fosas nasales con una duración de más de 12 semanas. Clínicamente se caracteriza por secreción mucopurulenta, obstrucción nasal, dolor facial y/o presión, y anosmia o hiposmia. La RSC puede subdividirse en tres síndromes clínicos distintos, con diferentes factores contribuyentes y las respuestas al tratamiento médico o quirúrgico: 1) RSC con poliposis nasal, 2) RSC sin poliposis nasal y 3) rinosinusitis alérgica fúngica. La RSC sin poliposis nasal es la forma más común y representa entre el 60 y el 65% de los casos. En la mayoría de los casos, el proceso patológico se inicia con la obstrucción de un ostium de unos de los senos paranasales que conduce a la rinosinusitis bacteriana aguda. Si la obstrucción no se resuelve, se acaba produciendo un proceso inflamatorio crónico. Se han identificado múltiples factores de riesgo para el desarrollo de la RSC sin poliposis nasal, como la rinitis alérgica, el asma, la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina, el tabaquismo, la exposición a agentes irritantes y contaminantes, inmunodeficiencias, defectos en la depuración mucociliar, infecciones víricas, enfermedades sistémicas, infecciones dentales, alteraciones anatómicas y exposición a humedad y al moho.

### 2.1.2.2. Consideraciones microbiológicas

El papel de la infección crónica en este contexto es variable y controvertido. Durante la última década, la RSC ha sido considerada más como un trastorno inflamatorio complejo que un proceso infeccioso simple o un problema anatómico. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de biopelículas bacterianas en el tejido del seno en el 45 al 80% de los casos. La microbiota local habitual en pacientes sanos incluye bacterias aeróbicas y anaeróbicas similares a las implicadas en la sinusitis aguda y crónica. La evolución de la microbio-

logía de la rinosinusitis comprende varias fases. La primera fase (rinosinusitis aguda) está causada generalmente por una infección vírica (rinovirus, adenovirus, influenza o parainfluenza) que generalmente dura unos 10 días, produciéndose la recuperación completa en el 99% de los pacientes. En algunos casos, sin embargo, se desarrolla una infección bacteriana secundaria aguda causada más comúnmente por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Si ésta no se resuelve, predomina la colonización por microbiota orofaríngea anaerobia (como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., y *PeptoStreptococcus* spp.) y aerobia, como bacilos gramnegativos (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., y *E. coli*) y *S. aureus* (incluyendo *S. aureus* resistente a la meticilina [SARM]). Es importante destacar que la infección polimicrobiana es común y los microorganismos presentes pueden actuar de manera sinérgica.

La infección fúngica, principalmente por *Aspergillus* spp., también se ha propuesto como involucrada en la RSC sin poliposis nasal. Suele presentarse en pacientes mayores y ligeramente inmunocomprometidos como diabéticos tipo I o en tratamiento con corticoesteroides. La rinosinusitis fúngica crónica también ha sido descrita en pacientes usuarios de cocaína intranasal, presumiblemente debido a la irritación crónica resultante de las fosas nasales.

## 2.1.3. Otitis crónica

### 2.1.3.1. Consideraciones clínicas

La otitis media es una infección, muy frecuente en niños, que puede cursar de forma aguda o crónica con la presencia de exudado (seroso, mucoso, purulento o mixto) en la cavidad media del oído. Una de las complicaciones más graves de la otitis media es la pérdida auditiva, que conlleva retrasos en el desarrollo educacional, lingüístico y en el comportamiento de los niños.

La clasificación de la otitis media se realiza según la duración del exudado y la presencia o ausencia de síntomas agudos. Según su tiempo de evolución, la enfermedad puede subdividirse en: a) aguda (<3 semanas), subaguda (semanas a 3 meses) y c) crónica (> 3 meses de evolución):

- Otitis media con exudado (OME): es una otitis media subaguda, con presencia de exudado en la cavi-

dad del oído medio y ausencia de síntomas. Si este exudado se prolonga más de 3 meses se denomina otitis media crónica no supurada (OMC).

- Otitis media aguda (OMA): se caracteriza por la presencia sintomática de exudado en el oído medio.
- Otitis media crónica (OMC): a su vez se puede dividir en OMC con exudado (es una OME con una duración >3 meses) y OMC supurada, que generalmente se debe a episodios repetidos de infección aguda, asociado a la perforación de la membrana timpánica.
- Otitis media crónica colestomatosa: el colestoma es la presencia anormal de epitelio escamoso productor de queratina en el oído medio, que puede ocurrir secundariamente a la perforación de la membrana timpánica o también como consecuencia de una lesión primaria.

### 2.1.3.2. Consideraciones microbiológicas

Las bacterias comúnmente implicadas en las infecciones del tracto respiratorio superior son, asimismo, las más frecuentemente aisladas en las OMA: *S. pneumoniae* (25-50%), *H. influenzae* (15-30%) y *M. catarrhalis* (10-15%). En las OMC supuradas la capacidad de formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa* y *S. aureus* hace que sean estos los microorganismos más comúnmente involucrados. Las OMC colestomatosas pueden estar asociadas con infecciones polimicrobianas, pero siguen siendo *S. aureus* y *P. aeruginosa* los principales responsables. En concreto, *S. aureus* es el microorganismo más frecuentemente aislado en OMC colestomatosas, mientras que en las no colestomatosas es *P. aeruginosa*. La prevalencia de SARM varía según la región así como la sensibilidad de *P. aeruginosa*, por lo que es importante realizar el estudio de sensibilidad *in vitro* que ayude a orientar el tratamiento.

Otros microorganismos causantes de OMC aunque menos frecuentes son las enterobacterias (esencialmente *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., y *E. coli*) que aparecen sobre todo en zonas con condiciones higiénicas deficientes. Los microorganismos anaerobios, como *Bacteroides* spp. y *Fusobacterium* spp. también pueden ser causantes de estas infecciones y para su diagnóstico, es importante realizar una adecuada recogida y procesamiento de la muestra. *Aspergillus* spp. y *Candida* spp., aunque infrecuentemente, también pueden causar OMC.

Las biopelículas bacterianas juegan un papel funda-

mental en las otitis crónicas, favoreciendo la persistencia de la infección y dificultando su tratamiento. Las biopelículas se pueden adherir al tejido dañado como al hueso osteítico y a la mucosa ulcerada del oído medio o a implantes otológicos como los tubos de timpanostomía. Se ha demostrado, mediante microscopía electrónica de barrido, la presencia de biopelículas (*S. aureus* y *P. aeruginosa*) hasta en el 70% de las otitis crónicas en tejidos de pacientes con OMC supurativa y OMC colestomatosa.

Las reagudizaciones de las otitis medias crónicas colestomatosas también se han relacionado con la presencia de biopelículas, debido a que la matriz de queratina proporciona un sustrato óptimo para su desarrollo. Se han analizado aislados de *P. aeruginosa* procedentes de colestoma y se observó que formaban biopelículas con una gran adherencia a los queratinocitos.

En la OME crónica también se ha demostrado la presencia de biopelículas. Hasta hace unos años se creía que este tipo de otitis crónica no se debía a una causa infecciosa, ya que los cultivos microbiológicos tradicionales eran negativos y por ello se definió como un proceso inflamatorio como respuesta a los metabolitos bacterianos. Sin embargo, posteriormente, varios estudios demostraron la presencia de ADN y ARNm bacteriano en los exudados recogidos de las OME que indicaban la presencia de bacterias metabólicamente activas. De hecho, se trata de un proceso infeccioso con desarrollo de biopelículas bacterianas. Ehrlich y cols. demostraron la presencia de biopelículas de *H. influenzae* en la mucosa del oído medio en un modelo animal de chinchilla y posteriormente se detectó directamente la presencia de biopelículas de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* en muestras de mucosa del oído medio en niños con OME crónica. Las imágenes con microscopía confocal obtenidas después de teñir con fluorocromos para detectar microorganismos viables y no viables, demostraron que a pesar de obtener cultivos negativos, las muestras recogidas tenían bacterias viables.

### 2.1.4. Infección crónica de herida

#### 2.1.4.1. Consideraciones clínicas

Las heridas crónicas suponen un gran problema de salud. 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 trans-



currido aproximadamente un mes. La infección es la principal causa de esta cronicidad y la formación de la biopelícula bacteriana tiene una gran relevancia en este tipo de infecciones. En estos casos se produce una respuesta inflamatoria prolongada, retraso en la síntesis de colágeno y en la epitelización y un daño tisular. Las heridas crónicas incluyen las úlceras de pie diabético, úlceras por presión, úlceras venosas y heridas quirúrgicas no curadas.

Los pacientes con riesgo de sufrir heridas crónicas son aquellos con la circulación venosa o arterial dañada, pacientes inmunocomprometidos, ancianos, pacientes diabéticos, y cualquier paciente con neuropatías o con lesión de médula espinal.

#### 2.1.4.2. Consideraciones microbiológicas

Todas las heridas abiertas están colonizadas por microorganismos, tanto endógenos (de la propia microbiota del paciente), como procedentes de fuentes exógenas. La infección de las heridas crónicas suele ser polimicrobiana, con presencia de microorganismos aerobios y anaerobios. Al combinar las técnicas de diagnóstico microbiológico convencional, con técnicas moleculares, se ha determinado que existe una gran variedad de microorganismos en las heridas crónicas, con un promedio de 5,4 especies diferentes en cada herida.

Los dos microorganismos más frecuentes causantes de infección de heridas crónicas son *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Además pueden estar implicadas diferentes especies de anaerobios (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Pepto Streptococcus* spp.), *Bacillus anthracis*, estreptococos beta-hemolíticos, *Enterococcus* spp. y enterobacterias. En muchas de estas infecciones se ha observado sinergia entre aerobios y anaerobios, lo cual potencia la aparición de infección. Hasta el 60% de las heridas crónicas cursan con la presencia de biopelículas. Aunque la población bacteriana de las heridas crónicas es polimicrobiana, los agregados de biopelícula presentes en ellas, están compuestas por una sola especie bacteriana (*P. aeruginosa*, o *S. aureus*). Además, la distribución de estas especies dentro de una misma herida no se establece arbitrariamente y su presencia varía según la localización y la profundidad dentro de la herida. Como se ha demostrado por microscopía confocal y PNA-FISH (del inglés *peptide nucleic acid probes-fluorescent in situ hybridization*), *S. aureus* se localiza principalmente en la superficie, mientras que los agregados de *P. aeruginosa* se

encuentran en zonas más profundas de la herida. Además, en las biopelículas de *P. aeruginosa* se produce un escudo de ramnolípidos con efecto citolítico, que ofrecen una protección frente a la acción bactericida de los leucocitos polimorfonucleares, favoreciendo la inflamación crónica.

Desde la primera vez que se describió la observación de una biopelícula en una herida en 1996 en un modelo murino infectado con *S. aureus*, la presencia de estas biopelículas en heridas crónicas se ha demostrado tanto en modelos animales, como en humanos y se reconoce que existe una asociación significativa entre las heridas crónicas y las biopelículas que contribuyen a retrasar la curación.

#### 2.1.5. Infección en pacientes quemados

##### 2.1.5.1. Consideraciones clínicas

La infección sigue siendo la causa más común de morbilidad y mortalidad (>50%) en pacientes con quemaduras. A pesar de que la incidencia global de sepsis en pacientes quemados ha disminuido, la incidencia de infección en aquellos con quemaduras que abarcan una superficie corporal total superior al 15% se ha mantenido alrededor del 6%.

La superficie de una quemadura es un medio rico en proteínas con tejido avascular necrótico, que proporciona un nicho para la colonización y proliferación microbiana. La destrucción de la barrera cutánea y la respuesta inmunosupresiva humoral y celular son factores determinantes que contribuyen al desarrollo de infecciones graves en estos pacientes. La avascularidad dificulta la llegada de células inmunes y de antimicrobianos administrados sistémicamente.

##### 2.1.5.2. Consideraciones microbiológicas

Aunque la superficie de las quemaduras es estéril inmediatamente después de la agresión, la colonización por microorganismos se produce rápidamente: las bacterias grampositivas que sobreviven en las glándulas sudoríparas y en los folículos pilosos, colonizan la herida en las primeras 48 horas si ésta no se trata con antimicrobianos tópicos. Después de 5-7 días, la quemadura puede infectarse por otros microorganismos grampositivos, gramnegativos y/o levaduras provenientes de la microbiota del propio paciente (como gastrointestinal o respiratoria) o de fuentes exógenas como microorganismos nosocomiales. La colonización por levaduras y hongos

suele ocurrir más tarde por el uso de antibióticos de espectro ampliado.

A diferencia de las heridas crónicas, la mayoría de las infecciones de quemaduras son monomicrobianas. Los microorganismos grampositivos muestran baja invasividad local y no llegan a la fascia, mientras que los gramnegativos invaden con mayor facilidad y producen bacteriemia e infecciones a distancia. Aunque la etiología varía según las diferentes unidades de quemados, dentro de los gramnegativos, *P. aeruginosa* es el principal agente causante de infección y dentro de los grampositivos, *S. aureus*. Otros microorganismos comúnmente implicados en estas infecciones son *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. Los microorganismos anaerobios están implicados habitualmente en pacientes con quemaduras eléctricas.

Muchos de los microorganismos implicados en la infección de la herida por quemadura, tienen la capacidad de crecer formando biopelículas, como es el caso de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. En concreto, se ha descrito que la formación de una biopelícula *in vitro* por una cepa de *P. aeruginosa* aislada de una quemadura, se produce en torno a las 10 horas. Se ha demostrado la implicación de la biopelícula en pacientes con quemaduras graves ulceradas, a través de su observación en biopsia por microscopía óptica y electrónica después de 7 días tras la agresión térmica. Sin embargo, no se han observado biopelículas bacterianas en quemaduras intactas no ulceradas. El conocimiento de la implicación de las biopelículas en las quemaduras ha tenido una gran relevancia para su tratamiento, ya que se ha recalado la importancia de un correcto manejo de las quemaduras graves, con el desbridamiento y el cierre de cualquier lesión ulcerada, para evitar así la formación de estas biopelículas. En los últimos años se está investigando y se han desarrollado apósitos con este propósito, siendo los apósitos de plata ampliamente utilizados por demostrar ser efectivos en la prevención de la formación de biopelículas.

## 2.1.6. Infección de válvula cardíaca nativa

### 2.1.6.1. Consideraciones clínicas

La endocarditis sobre válvula nativa se produce por una interacción entre el endotelio vascular, con microorganismos circulantes en la sangre. A pesar de

que en los últimos años ha habido mejoras en el diagnóstico y en el tratamiento, la endocarditis infecciosa sigue siendo una enfermedad muy grave, con una alta tasa de mortalidad (más de un tercio de los pacientes mueren en el primer año después del diagnóstico).

### 2.1.6.2. Consideraciones microbiológicas

Existe una gran diversidad de microorganismos que pueden causar endocarditis infecciosa. Entre ellos destacan *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. La endocarditis infecciosa causada por *Staphylococcus* spp. normalmente se asocia a cuidados sanitarios, mientras que las causadas por *Streptococcus* spp. se suelen adquirir en la comunidad.

Los principales microorganismos responsables de esta infección son: *S. aureus* (31%), estreptococos del grupo viridans (17%), *Enterococcus* spp. (11%) estafilococos coagulasa negativos (11%), *Streptococcus 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*).

Los microorganismos llegan al torrente circulatorio principalmente a través de la orofaringe, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario. En condiciones normales, estos microorganismos no se adhieren al endotelio intacto, sin embargo, cuando se produce algún daño o lesión con la formación de un trombo aséptico, las células endoteliales, las plaquetas y los fibroblastos secretan fibronectina a la cual se pueden unir las bacterias. Éstas se multiplican en la lesión creciendo en forma de biopelículas y formando las vegetaciones, lo cual acentúa el daño y puede provocar embolias sépticas. La vegetación séptica, es considerada una biopelícula por sí misma, formada por bacterias encapsuladas por fibrina, una masa de plaquetas y células del sistema inmunitario. Algunas bacterias, como *S. aureus* o *E. faecalis* han demostrado ser capaces de producir por sí mismas daños en la superficie de las células endoteliales del tejido valvular. Estas bacterias son fagocitadas por las células del tejido valvular provocando su lisis y desencadenando el inicio de la cascada de coagulación, atrayendo a plaquetas y a la fibrina a unirse al tejido dañado.

Muchas especies bacterianas poseen adhesinas de superficie específicas para su unión con la fibronectina, como es el caso de *S. aureus* y varias especies de *Streptococcus*. *Streptococcus sanguis* y *S. mutans* producen exopolisacáridos como dextranos y glucanos que se unen al tejido dañado. Los bacilos gramnegativos como *E. coli* o *K. pneumoniae* tienen menor capacidad de adherencia a las válvulas cardíacas que los microorganismos grampositivos. En modelos animales se ha demostrado que para inducir una endocarditis infecciosa por bacilos gramnegativos, se requiere mucho más inóculo que para los microorganismos grampositivos.

La formación de las vegetaciones se estudió en un modelo animal con conejos, donde se demostró que a las 3 horas después de la adhesión, las bacterias quedan atrapadas por una matriz de plaquetas y fibrina y a las 24 horas ya se observa un gran número de microcolonias bacterianas cubiertas por capas de fibrina. Esta vegetación impide el correcto funcionamiento de la válvula, proporciona una fuente continua de infección al torrente sanguíneo y partes de esta vegetación pueden romperse y pasar a la circulación y provocar embolias.

### 2.1.7. Infección prostática

#### 2.1.7.1. Consideraciones clínicas

Las prostatitis infecciosas están incluidas dentro de la categoría I (prostatitis bacterianas agudas) y II (prostatitis bacterianas crónicas) de la clasificación del *National Institutes of Health*. Según esta institución, las prostatitis crónicas suponen el 7-14% de todos los casos de prostatitis.

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. Puede manifestarse de forma continua o por episodios entre los cuales el paciente está asintomático. Hasta un 10% de los pacientes con una prostatitis aguda desarrollarán una prostatitis crónica.

#### 2.1.7.2. Consideraciones microbiológicas

El principal agente causal de esta infección es *E. coli*. Asimismo, también pueden estar implicados *E. faecalis* y bacilos gramnegativos como *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp.

En la prostatitis bacteriana crónica, se desarrolla una infección ascendente desde la uretra hasta la próstata que puede ser provocada por un flujo turbulento uretral y/o un reflujo ductal intraprostático. Una vez en los ductos y acinos prostáticos, las bacterias se multiplican y provocan una reacción inflamatoria aguda. Si estas bacterias en estado planctónico no se eliminan, pueden formar biopelículas adheridas al epitelio del sistema ductal con la producción de un glicocálix que las protege. La persistencia de estas bacterias formando biopelículas en la glándula prostática, lleva a una estimulación inmunológica persistente con la consecuente inflamación crónica. Esta biopelícula, asimismo, está implicada en las calcificaciones prostáticas y en la persistencia bacteriana. Todos los microorganismos, tanto grampositivos, como gramnegativos, causantes de prostatitis crónicas, han demostrado ser capaces de formar biopelículas. Se ha observado que aislados de *E. coli* procedentes de prostatitis tenían mayor capacidad para formar biopelículas que aquellos causantes de otras infecciones como pielonefritis o cistitis agudas.

En un estudio se demostró que uno de cada 6 pacientes con prostatitis crónica con cultivos de biopsias sonicadas positivos, tenían un cultivo negativo de la secreción prostática. En estas biopsias se visualizaron microcolonias bacterianas fuertemente adheridas a los acinos y ductos prostáticos. Esto explicaría la dificultad que entraña el diagnóstico y tratamiento de estas infecciones con los protocolos que se emplean en la actualidad.

### 2.1.8. Vaginosis

#### 2.1.8.1. Consideraciones clínicas

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. La vaginosis bacteriana en su conjunto, se ha asociado con problemas de salud graves, como parto prematuro, aborto espontáneo, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis y la adquisición y transmisión de varios microorganismos de transmisión sexual. Los síntomas característicos son el prurito o disconfort genital y la leucorrea fétida, aunque algunas mujeres pueden permanecer asintomáticas. Su alta prevalencia y la asociación con complicaciones hacen de la vaginosis bacteriana un problema importante de salud.



### 2.1.8.2. Consideraciones microbiológicas

Se ha descrito que la microbiota vaginal sana está constituida principalmente por bacilos grampositivos del género *Lactobacillus*, siendo *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii* las especies más comunes. Sin embargo, otras especies microbianas patógenas, incluyendo *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus* spp., y *Prevotella* spp., pueden estar presentes en baja proporción sin llegar a una carga bacteriana como para causar patología. Las especies de *Lactobacillus* desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad y la salud del tracto genital femenino previniendo las infecciones genito-urinarias. A nivel microbiológico, la vaginosis bacteriana se caracteriza por un cambio dramático de la microbiota vaginal que implica la pérdida de bacterias benéficas (lactobacilos) junto con la proliferación simultánea de bacterias anaerobias incluyendo a *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., y *Prevotella* spp. Sin embargo, debido a la gran diversidad y complejidad de microorganismos implicados, la etio-patogénesis de la vaginosis bacteriana no está aún clara y continúa siendo controvertida. En la actualidad, se acepta que la vaginosis bacteriana está asociada a la formación de una biopelícula, constituida principalmente por agrupaciones de *G. vaginalis* fuertemente adheridas al epitelio vaginal. Debido al hecho de que las bacterias dentro de las biopelículas no son eliminadas eficientemente por el sistema inmunitario ni totalmente destruidas por los antibióticos, las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas tienden a persistir y por lo tanto, no sorprende que la vaginosis bacteriana tenga una alta tasa de recaídas y recurrencias. De hecho, varios estudios *in vitro* demostraron que las biopelículas de *G. vaginalis* muestran una gran resistencia frente a los mecanismos protectores de la microbiota normal vaginal, incluyendo al peróxido de hidrógeno y al ácido salicílico producido por *Lactobacillus* spp., a la vez de una mayor tolerancia a los antibióticos.

## 2.2. INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS SOBRE DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS

La colonización de los dispositivos biomédicos durante la cirugía a partir de la microbiota cutánea del propio paciente es el origen de la mayor parte de estas infecciones. Otras causas menos frecuentes son: la colocación de un implante contaminado, la

contaminación ambiental durante la cirugía, las infecciones de los tejidos suprayacentes, los traumatismos con pérdida de la solución de continuidad de la piel o la siembra hematológica a partir de un foco distante. Los microorganismos que colonizan el implante son capaces de desarrollarse formando biopelículas sobre la superficie del mismo a pesar de la respuesta del sistema inmune y/o de la profilaxis antimicrobiana. Este hecho hace que en la mayor parte de las ocasiones fracase el tratamiento médico y sea necesario retirar el implante para conseguir la curación.

### 2.2.1. Infección asociada a catéter vascular

#### 2.2.1.1. Consideraciones clínicas

Los catéteres intravasculares se han convertido en un elemento fundamental para el tratamiento médico de un gran número de pacientes en nuestros hospitales. Cada año se insertan más de 150 millones de estos dispositivos en los Estados Unidos para la administración de fluidos intravenosos, medicamentos, productos sanguíneos, nutrición parenteral, además de para realizar hemodiálisis o para monitorizar el estado hemodinámico. La bacteriemia relacionada con el catéter es una causa importante de morbilidad hospitalaria con una mortalidad atribuible que oscila entre el 12% y el 25% en el paciente crítico, y un coste económico que puede llegar a 56.000 dólares por episodio. La bacteriemia relacionada con el catéter se encuentra entre las infecciones más frecuentes adquiridas en el hospital. Actualmente se estima que entre el 15% y el 30% del total de bacteriemias nosocomiales están relacionadas con un catéter. La incidencia de la bacteriemia relacionada con catéter varía considerablemente dependiendo del tipo de catéter y su uso, del lugar de inserción, de la experiencia de la persona que inserta el catéter, de la frecuencia con la que se accede al catéter, de la duración de la cateterización, de las características del paciente, y del uso de estrategias de prevención. Se ha determinado que la estancia media hospitalaria adicional atribuible a un episodio de bacteriemia asociada a catéter es de 24 días. Los factores de riesgo para estas infecciones son diferentes según el tipo de catéter; el punto de inserción, las comorbilidades, la permanencia del catéter y la unidad en que el paciente está ingresado. La sintomatología clínica de la bacteriemia o fungemia asociada a catéter intravascular es muy poco sensible y específica. La mayoría de los pacientes tienen fiebre y escalos-



fríos, que pueden acompañarse de sintomatología sistémica. Algunos pacientes pueden tener signos de infección local, en forma de celulitis o exudado purulento, a nivel del punto de inserción del catéter o del trayecto subcutáneo.

### 2.2.1.2. Consideraciones microbiológicas

La bacteriemia o fungemia asociada a catéter se puede originar a partir de la migración de los microorganismos de la piel a lo largo de la superficie externa del catéter, de la colonización de la luz del catéter o las conexiones, a partir de la contaminación de los fluidos intravenosos administrados o a partir de un foco distante. 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 (por ejemplo, los estafilococos coagulasa negativos se unen a la fibronectina, *S. aureus* a la fibronectina y al fibrinógeno, y *Candida* spp. a la fibrina).

Los estafilococos coagulasa negativos, *S. aureus*, *Corynebacterium* spp, enterobacterias y *Candida* spp. son los microorganismos que más frecuentemente están implicados en estas infecciones. *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *Candida* spp. pueden vehiculizarse a través de las manos del paciente, del personal sanitario o a través de la infusión de soluciones de administración intravenosa. Otros microorganismos emergentes como *Micrococcus* spp., *Achromobacter* spp., micobacterias, levaduras de géneros diferentes de *Candida*, o incluso algunos hongos filamentosos también pueden estar implicados en estas infecciones. El tratamiento más eficaz de estas infecciones es la retirada del catéter. Sin embargo, en ocasiones, especialmente en algunas infecciones por *S. aureus*, puede realizarse un tratamiento conservador mediante la combinación de sellado antibiótico y tratamiento sistémico.

La candidemia es una infección que con frecuencia se asocia al catéter intravascular. La colonización del catéter por *Candida* spp. es una consecuencia de la capacidad de este microorganismo para producir biopelículas, perpetuando así el foco de la infección. La última actualización de las guías de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) del año 2016 sobre el manejo del paciente sin neutropenia y con candidemia asociada al catéter es la retirada del

mismo, siempre que la situación del paciente lo permita, puesto que esto disminuye la mortalidad. Esta recomendación se basa en las dificultades que existen para poder erradicar las biopelículas y que muchas veces requieren la eliminación de la superficie sobre la que se han formado las mismas. Las recomendaciones de retirada del catéter en pacientes neutropénicos no tienen un nivel de evidencia muy alto ya que en estos casos el origen abdominal de la candidemia es más frecuente. El uso de la terapia de sellado con soluciones que contienen antifúngicos se recomienda sólo en situaciones muy particulares en las que el catéter es vital para el paciente y no se puede retirar y reemplazar.

### 2.2.2. Infección sobre válvula cardíaca protésica, marcapasos e injertos

#### 2.2.2.1. Consideraciones clínicas

##### 2.2.2.1.1. Endocarditis sobre válvula cardíaca protésica

La endocarditis infecciosa es una enfermedad potencialmente mortal que ha sufrido grandes cambios tanto en el tipo de paciente como en la etiología a lo largo de los últimos años. La epidemiología de la endocarditis infecciosa se ha vuelto más compleja en los últimos años debido a la gran cantidad de factores relacionados con la asistencia sanitaria que predisponen a esta infección. El pronóstico no ha mejorado en los últimos años a pesar de los avances médicos y quirúrgicos. Tras más de 40 años de mejoras continuas en el diseño y los materiales utilizados en el diseño y fabricación de las válvulas cardíacas protésicas, la cirugía de reemplazo de una válvula conlleva una baja morbilidad y mortalidad. A pesar de ello, la infección continúa siendo un problema relevante en nuestros días. Estas infecciones se clasifican generalmente en precoces o tardías, en función de si el tiempo transcurrido desde la cirugía de implantación es mayor o menor de 12 meses. La frecuencia de estas infecciones oscila entre 0,1 y 2,3% por paciente-año y una mortalidad asociada que oscila entre un 20-40% dependiendo de las comorbilidades de los pacientes y del tratamiento recibido. Asimismo, la historia clínica es muy variable dependiendo del microorganismo causal, de la presencia o ausencia de enfermedad cardíaca preexistente, de la presencia o ausencia de otras válvulas protésicas o dispositivos cardíacos y del modo de presentación. Se puede presentar como una enfermedad aguda, rápidamente progresiva o

como una enfermedad subaguda o crónica con poca fiebre y síntomas inespecíficos que pueden confundir la evaluación inicial. Hasta el 90% de los pacientes se presentan con fiebre, a menudo asociada con hiporexia y pérdida de peso. Hasta en un 85% de los pacientes se detectan soplos cardíacos. El 25% de los pacientes tienen complicaciones cardioembólicas en el momento del diagnóstico, aunque estigmas periféricos son cada vez más raros en nuestro medio. Los émbolos al cerebro, pulmón o bazo se producen hasta en el 30% de los pacientes y son, a menudo, la forma de presentación.

#### *2.2.2.1.2. Infección asociada a dispositivos de electroestimulación: marcapasos, desfibriladores implantables y dispositivos de resincronización*

Los distintos dispositivos de electroestimulación cardíaca como los marcapasos, desfibriladores automáticos implantables y dispositivos de resincronización cardíaca se han vuelto cada vez más importantes en el tratamiento de las enfermedades cardíacas hecho que ha conllevado una importante mejora de la calidad de vida de nuestros pacientes a lo largo de los últimos años. El uso de estos dispositivos se ha generalizado desde la colocación de los primeros marcapasos en 1960. La tasa de infección, que durante los primeros años oscilaba entre un 0,13% y un 11%, ha ido disminuyendo a lo largo de los años debido a las mejoras en la técnica quirúrgica y al diseño de dispositivos más pequeños y biocompatibles. Se ha calculado que actualmente la incidencia de infección asociada a este tipo de dispositivos oscila entre 0,8 y 5,7% y afecta a 1,9 por cada 1000 dispositivos-año, siendo mayor en los pacientes que han requerido una reimplantación del sistema. Estas infecciones se dividen en cuatro tipos:

- 1) Infección del generador: es el tipo más frecuente. Se caracteriza por la aparición de síntomas flogóticos locales y/o exudado purulento a través de la herida quirúrgica.
- 2) Infección del generador y de los electrodos: dado que la infección progresa a lo largo de los electrodos, el paciente puede tener síntomas sistémicos como fiebre, hipotensión, malestar general y a veces embolismos sépticos a distancia.
- 3) Infección asociada a los electrodos: es rara dado que los electrodos se endotelizan y fibrosan a lo largo de los primeros tres meses desde la colocación con lo que es difícil que se colonicen pasado este tiempo.
- 4) La endocarditis en pacientes portadores de marcapasos se produce cuando la infección afecta al

tejido endocárdico, normalmente sobre la zona donde está anclado el extremo distal del cable, aunque también pueden afectarse las válvulas cardíacas.

Se han identificado los siguientes factores de riesgo para la infección asociada: diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca, disfunción renal, el uso de anticoagulantes orales, el tratamiento corticoideo y la cirugía de recambio del dispositivo. Obviamente la técnica del procedimiento y la experiencia del personal que coloca los dispositivos tiene un impacto directo en la tasa de infección asociada.

#### *2.2.2.1.3. Infección asociada a injertos vasculares*

La infección asociada a injertos vasculares está en torno a un 6% con una mortalidad que oscila entre 15% y 50% y una tasa de amputaciones entre el 8% y el 50% dependiendo de los estudios. Los dos factores de riesgo más importantes son el tipo de prótesis y la localización. El tratamiento de estas infecciones es muy complejo. La retirada del injerto vascular seguida de una revascularización está asociada a una alta incidencia de amputaciones y mortalidad. En general, se requiere la retirada de la prótesis en las infecciones que cursan con sepsis grave o dehiscencia de anastomosis, mientras que cuando se produce una oclusión sin afectar las anastomosis se puede realizar una escisión parcial de la porción ocluida. En ausencia de signos de sepsis y con las anastomosis intactas se puede optar por un tratamiento conservador.

#### *2.2.2.2. Consideraciones microbiológicas*

Los microorganismos que causan estas infecciones se pueden adquirir o bien de forma endógena a partir de la piel del paciente o de manera exógena desde el entorno del hospital o a partir de las manos del personal sanitario. Los estafilococos causan la mayor parte de las infecciones asociadas a dispositivos endovasculares y representan entre el 60% y el 80% de los casos en la mayoría de series publicadas. Los estafilococos coagulasa negativos son una causa frecuente de contaminación en el laboratorio y, por lo tanto, se requiere el aislamiento de la misma especie, con un patrón de sensibilidad a los antibióticos idéntico para confirmar el diagnóstico etiológico de estas infecciones. La prevalencia de la resistencia a la oxacilina entre los estafilococos coagulasa negativos varía según los estudios, pero es frecuente y debe ser tenida en cuenta en las decisiones iniciales de tratamiento empírico de estas

infecciones. Entre los estreptococos, los del grupo viridans son los predominantes y *Streptococcus bovis* ha experimentado un aumento en los últimos años, muy posiblemente asociado a bacteriemias de origen intestinal. *S. pneumoniae*, los estreptococos beta-hemolíticos (fundamentalmente *S. agalactiae*) y *Abiotrophia* spp. y *Granulicatella* spp. pueden también causar estas infecciones. *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, bacilos gramnegativos incluyendo *P. aeruginosa*, y *Candida* spp. representan una minoría de las infecciones. Los hongos filamentosos y las micobacterias atípicas son causa infrecuente de estas infecciones.

### 2.2.3. Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVVM)

#### 2.2.3.1. Consideraciones clínicas

La NAVVM es aquella que se produce en pacientes con intubación endotraqueal (o traqueotomía) y que no estaba presente, ni en el periodo de incubación, ni en el momento de la intubación. En esta definición se incluyen las neumonías diagnosticadas en las 72 horas posteriores a la extubación o retirada de la traqueostomía. A pesar de los avances en el conocimiento de las causas que contribuyen a la prevención, la NAVVM continúa siendo una complicación frecuente de la atención hospitalaria. Aproximadamente el 10% de los pacientes que requieren ventilación mecánica son diagnosticados de neumonía asociada. Afortunadamente, en la actualidad, se está consiguiendo reducir las tasas de NAVVM en las UCI gracias a la aplicación de la terapia preventiva con descontaminación oro-digestiva y aspiración subglótica. La mortalidad debido a cualquier causa en pacientes sometidos a ventilación mecánica oscila entre un 20% y un 50%, mientras que la mortalidad directamente relacionada con la NAVVM se estima en torno a un 13%. La NAVVM consume una gran cantidad de recursos sanitarios además de prolongar de manera significativa la estancia hospitalaria. Además, el coste de cada episodio de NAVVM se estima en 40.000 dólares por paciente.

#### 2.2.3.2. Consideraciones microbiológicas

La colonización de la vía aérea superior, e incluso recientemente de la placa dental, representa un factor predictor para la colonización del tubo traqueobronquial. Clásicamente, la neumonía temprana se ha asociado con microorganismos frecuentes en la comunidad mientras que la neumonía de aparición tardía se ha asociado con microorganismos noso-

comiales. Sin embargo, varios estudios posteriores han puesto en duda la relación entre el tiempo de aparición de la NAVVM y el riesgo de infección por microorganismos multirresistentes, de hecho, no se han encontrado diferencias significativas entre los patrones de patógenos en la neumonía asociada a ventilación mecánica temprana y tardía. Los factores asociados con un mayor riesgo de NAVVM por microorganismos multirresistentes son el uso de antibióticos por vía intravenosa en los últimos 90 días, más de 5 días de hospitalización, shock séptico en el momento de la neumonía asociada a ventilación mecánica, el síndrome de distrés respiratorio, y la terapia de reemplazo renal. La exposición previa a antibióticos se ha identificado de forma consistente como un factor predisponente para la NAVVM por microorganismos multirresistentes, especialmente por SARM, y *P. aeruginosa* multirresistente.

### 2.2.4. Infección asociada a prótesis articular

#### 2.2.4.1. Consideraciones clínicas

Las prótesis articulares han supuesto un gran avance sanitario que ha mejorado enormemente la calidad de vida de los pacientes. Se han diseñado prótesis para múltiples articulaciones siendo las prótesis de rodilla y cadera las más habituales. En España se estima que se realizan aproximadamente unas 30.000 artroplastias cada año. La infección asociada a prótesis articular constituye la complicación más grave, ya que en muchas ocasiones requiere tratamientos largos y complejos y además presenta una elevada morbilidad asociada (retirada del implante, pérdida de función, amputaciones) y por tanto un incremento del coste sanitario. Afortunadamente, su incidencia es baja, oscilando entre el 0,8% y el 1,9% y entre el 0,3% y el 1,7% de las artroplastias primarias de rodilla y cadera respectivamente. El riesgo de infección tras una artroplastia de revisión de cadera o rodilla se eleva al 3,2% y al 5,6%, respectivamente. En España se estima que la incidencia media de la infección asociada a prótesis articular oscila entre el 3% y el 4%. Sin embargo, estas cifras están probablemente infraestimadas debido a la dificultad diagnóstica en muchas ocasiones.

Entre los factores de riesgo de la infección asociada a prótesis articular destacan la presencia de infecciones superficiales post-quirúrgicas que no involucran a la prótesis, una puntuación de 1 ó 2 en el índice NNIS (*System surgical patient*), la presencia de una neoplasia o presentar antecedente de una



artroplastia en la misma articulación intervenida. Otros factores que pueden predisponer al desarrollo de una infección son: edad avanzada, obesidad, diabetes mellitus, tabaquismo, inmunosupresión (VIH avanzado, corticoterapia) antecedentes de patología articular subyacente (artritis reumatoide) o de infección de articulación nativa, y la malnutrición. Entre los factores de riesgo relacionados con la cirugía destacan la realización simultánea de dos artroplastias, un tiempo intraoperatorio prolongado (>2,5 horas), y la necesidad de transfusiones sanguíneas durante la cirugía. Los factores de riesgo postoperatorios incluyen una estancia hospitalaria prolongada, complicaciones de la herida quirúrgica (drenaje, hematoma, dehiscencias, retraso en la cicatrización, necrosis de herida), úlceras de decúbito, fibrilación auricular, infarto de miocardio, infección de tracto urinario y la bacteriemia por *S. aureus*.

La mortalidad atribuida a la infección asociada a prótesis articular oscila entre el 0,4% y el 1,2% en pacientes menores de 65 años y entre el 2% y el 7% en mayores de 80 años. El tratamiento de estas infecciones es complejo y multidisciplinar, pudiéndose optar en las infecciones agudas por un desbridamiento agresivo combinado con antibioterapia dirigida o por un recambio en uno o en dos tiempos en las infecciones crónicas. Otras opciones terapéuticas son el tratamiento supresor crónico, la artrodesis o la amputación de la extremidad.

#### 2.2.4.2. Consideraciones microbiológicas

Los microorganismos grampositivos (estafilococos coagulasa negativos, *S. aureus*, enterococos y estreptococos) constituyen más de la mitad de los casos (en torno a un 65%). Los bacilos gramnegativos aerobios (*E. coli*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*) representan en torno al 5%-10% de los aislados, mientras que los anaerobios (entre los que destacan *Propionibacterium acnes* y *Fingoldia magna*) suponen en torno a un 1%-4%, según las series. *P. acnes* tiene una prevalencia mayor en las infecciones asociadas a artroplastias de hombro o cirugías de instrumentación de la columna. Existen además casos producidos por otros microorganismos que suponen un 1% del total (hongos, micobacterias atípicas, *Brucella* spp, etc.). Las infecciones polimicrobianas constituyen en torno a un 20% de los casos, implicando habitualmente cepas de SARM y anaerobios. Por último, hasta en un 7% de los casos no se consigue aislar ningún microorganismo (infección con cultivos negativos), con frecuencia en el contexto de una antibioterapia previa o concomitante. El desarrollo

de nuevas técnicas diagnósticas, como el cultivo tras sonicación del material protésico retirado, junto con el empleo de técnicas moleculares y la introducción de mejoras en la toma y procesamiento de las muestras, reducirá en el futuro el porcentaje de cultivos negativos.

#### 2.2.5. Infección asociada a sonda urinari

##### 2.2.5.1. Consideraciones clínicas

La bacteriuria asociada a sondaje urinario es la infección nosocomial más frecuente en nuestro medio representando hasta el 40% de todas infecciones asociadas a los cuidados sanitarios y se asocia a un incremento en la mortalidad. La mayoría de las infecciones urinarias adquiridas en los hospitales están asociadas con sondas o catéteres urinarios, y en la mayor parte de los casos, los pacientes no tienen síntomas o signos en relación con el tracto urinario. Entre el 15% y el 25% de los pacientes ingresados en nuestros hospitales son portadores de una sonda en algún momento del ingreso. La incidencia de la bacteriuria asociada a sondaje oscila entre un 3% y un 8% por día de sondaje. La duración de la cateterización es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de infección. Otros factores de riesgo asociados son el sexo femenino, la colonización microbiana de la bolsa de drenaje, la inserción de la sonda por personal no experto o en urgencias, una enfermedad subyacente rápidamente fatal, la edad avanzada, la diabetes mellitus, y una creatinina sérica elevada en el momento del sondaje. El uso de antimicrobianos en este tipo de infecciones es considerable y a menudo inadecuado, además, estas infecciones son un gran reservorio de microorganismos resistentes a los antimicrobianos. Sin embargo, y a pesar de su elevada prevalencia, en la mayoría de hospitales no se han implementado programas preventivos.

La forma más efectiva para reducir el riesgo de bacteriuria asociada a sonda o catéteres urinarios (*stents*, tubos de nefrostomía,...) es evitar su uso innecesario además de retirar las sondas y tubos lo antes posible cuando ya no sean necesarias. Los signos y síntomas compatibles con infección asociada a sondaje urinario incluyen fiebre, escalofríos, alteración del estado mental, malestar, letargia, dolor de costado, dolor en el ángulo costo vertebral, hematuria aguda, molestia en la pelvis, y en aquellos pacientes cuyos catéteres se han retirado, disuria, urgencia o necesidad frecuente de orinar, o dolor suprapúbico.

### 2.2.5.2. Consideraciones microbiológicas

Los microorganismos implicados en este tipo de infecciones proceden habitualmente de la microbiota del propio paciente. Estas infecciones suelen ser monomicrobianas y causadas la mayor parte de las veces por *E. coli* u otras enterobacterias. En ocasiones se aísla *P. aeruginosa*, enterococos, o *Candida* spp. Cuando se prolonga la duración del sondaje, la infección puede ser polimicrobiana. En pacientes con sondaje prolongado y especialmente en pacientes sometidos a presión antibiótica es relativamente frecuente el aislamiento de bacilos gramnegativos multirresistentes como enterobacterias productoras de betalactamsas de espectro extendido (BLEE), *Acinetobacter* spp. o microorganismos productores de carbapenemasas.

### 2.2.6. Infección asociada a otro tipo de dispositivos biomédicos

El número de dispositivos médicos diferentes a los anteriormente mencionados que se insertan actualmente en nuestros pacientes es enorme, siendo la infección una de las principales complicaciones asociadas. En general, las tasas de infección asociada a estos dispositivos son bajas, aunque varían en función del tipo de dispositivo, la técnica quirúrgica y la existencia de comorbilidades. A continuación se resumen las características clínicas y microbiológicas de algunas de estas infecciones.

#### 2.2.6.1. Infección asociada a implantes de mama

##### 2.2.6.1.1. Consideraciones clínicas

Los implantes de mama se utilizan con propósitos cosméticos, para corrección de asimetrías y defectos congénitos, y con propósitos reconstructivos en pacientes diagnosticados de cáncer de mama. La infección asociada a implante de mama es una causa importante de morbilidad siendo los pacientes oncológicos, en los que se realiza una reconstrucción inmediata, el tipo de paciente con el mayor riesgo asociado. La incidencia de infección después de una reconstrucción con expansor y colocación de un implante puede alcanzar el 35%. La presencia de celulitis, de una fístula o la exposición del implante obligan a la retirada del mismo para asegurar la curación de la infección. Sin embargo hay algunos datos prometedores cuando se utiliza un tratamiento conservador con retención del implante o con un

recambio en un tiempo en ciertos pacientes seleccionados.

##### 2.2.6.1.2. Consideraciones microbiológicas

La glándula mamaria no es un órgano estéril, contiene microbiota endógena proveniente de la piel y compuesta por estafilococos, diferoides, lactobacilos, estreptococos alfa-hemolíticos y anaerobios como *P. acnes*. Los microorganismos grampositivos (*S. aureus* y estreptococos) y algunos gramnegativos son los microorganismos que más frecuentemente producen las infecciones precoces. Sin embargo, las infecciones tardías (aquellas que se producen al menos un mes después de la cirugía) están causadas más frecuentemente por estafilococos coagulasa negativos y propionibacterias, sin olvidar que en este tipo de infecciones las micobacterias atípicas pueden jugar un papel importante. Todas estas infecciones pueden ser polimicrobianas o monomicrobianas. Se han descrito infecciones por otros microorganismos como *Pasteurella multocida*, *Brucella* spp, *Granulicatella adiacens*, *Streptomyces* spp. y hongos. *Mycobacterium fortuitum* es la micobacteria que más frecuentemente se asocia con la infección asociada a implantes de mama, aunque se han descrito infecciones por otras micobacterias como *M. avium*, *M. abscessus*, *M. conceptionense*, *M. thermoresistible* y *M. chelonae*.

#### 2.2.6.2. Infección asociada a malla abdominal

##### 2.2.6.2.1. Consideraciones clínicas

La infección asociada a una malla es una complicación poco frecuente y de difícil abordaje. Su incidencia es aproximadamente de un 1%-2%. Una vez colocada, la malla se impregna de plasma y fluido intersticial, los cuales contienen proteínas como albúmina, inmunoglobulinas, fibrinógeno o fibronectina. Estas proteínas impregnan la superficie del implante y actúan como receptores para ciertas adhesinas bacterianas dando comienzo así al desarrollo de biocapas sobre el biomaterial. Sin embargo, en esta etapa de adhesión inicial no siempre se requiere la intervención de las proteínas del paciente. *E. coli*, por ejemplo, es capaz de adherirse mediante sus fimbrias directamente a superficies plásticas. Las bacterias ven favorecida su adhesión en función del grado de hidrofobicidad, porosidad, o carga eléctrica del biomaterial. Las mallas de material hidrofóbico, como el politetrafluoretileno, favorecen la adhesión bacteriana, mientras que las recubiertas de titanio evi-

tan o retardan la colonización de la prótesis. Las mallas multifilamento se han asociado a mayores tasas de infección. De hecho, las mallas de poliéster multifilamento son las que se han relacionado con mayores tasas de infección (7-16%), mientras que las monofilamento del mismo material se asocian con un número de casos similares a las de propileno (2-4%). Esto se debe a la existencia de una mayor superficie (de más del 157% con respecto al área de las mallas monofilamento) y un mayor número de puntos potenciales de adherencia.

#### 2.2.6.2.2. Consideraciones microbiológicas

Los microorganismos más frecuentemente implicados en este tipo de infecciones son *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos y *E. coli*. En un estudio se demostró que *S. aureus* se adhiere mejor sobre mallas de polipropileno multifilamento que sobre aquellas de polipropileno monofilamento. En el caso de microorganismos poco virulentos, estos pueden colonizar el implante durante años, y originar abscesos subagudos o infecciones tardías.

#### 2.2.6.3. Infección asociada a implantes de pene

##### 2.2.6.3.1. Consideraciones clínicas

Hay dos tipos de implantes, los semirrígidos y los inflables. La infección es la complicación post-implantación más grave (2-3% en implantes primarios y hasta el 30% en reintervenciones), dado que ésta 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.

##### 2.2.6.3.2. Consideraciones microbiológicas

Los microorganismos que más frecuentemente están implicados en estas infecciones son los estafilococos coagulasa negativos con *S. epidermidis* a la cabeza. También se han descrito infecciones por *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida* spp. e incluso *Neisseria gonorrhoeae*.

#### 2.2.6.4. Infección asociada a dispositivos de neuroestimulación

##### 2.2.6.4.1. Consideraciones clínicas

La incidencia de infección asociada es muy variable, oscilando entre 0,6% y 12%, según las series debido probablemente a la gran heterogeneidad de las poblaciones estudiadas. La infección superficial o profunda del lecho quirúrgico es la forma de presentación más frecuente, mientras que la infección del parénquima cerebral es la más grave y afortunadamente la más infrecuente.

##### 2.2.6.4.2. Consideraciones microbiológicas

Los estafilococos (*S. aureus* y *S. epidermidis*) son los microorganismos más frecuentemente implicados. *P. acnes*, bacilos gramnegativos como *P. aeruginosa* y micobacterias atípicas como *M. fortuitum* también pueden estar implicados.

#### 2.2.6.5. Infección asociada a implantes cocleares

##### 2.2.6.5.1. Consideraciones clínicas

Los implantes cocleares se componen de dos partes: la parte interna está constituida por una placa receptora que se sitúa en el subcutáneo, sobre el hueso temporal y por unos electrodos que se insertan en la cóclea. La segunda parte del implante coclear es un dispositivo externo. La incidencia de infección asociada a estos dispositivos es baja, situándose entre el 1,6% y 10%. Las infecciones más frecuentes son las que afectan a la herida quirúrgica, seguidas por la otitis media y las complicaciones derivadas de este proceso como la mastoiditis o la meningitis.

##### 2.2.6.5.2. Consideraciones microbiológicas

*S. aureus* es la causa más frecuente de infección de la herida quirúrgica que, por contigüidad, puede extenderse al receptor; también por contigüidad, a partir de una otitis media, puede producirse infección del oído interno y del receptor. En este caso, son los patógenos respiratorios, especialmente, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, las causas más frecuentes de infección.

### 3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RELACIONADAS CON LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

#### 3.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Las infecciones asociadas a la formación de biopelículas son con frecuencia difíciles de diagnosticar. El diagnóstico, debe realizarse, desde una perspectiva global que integre tanto la historia clínica del paciente, sus signos y síntomas en el momento del estudio, así como los hallazgos microbiológicos basados en técnicas microscópicas, de cultivo y/o moleculares, junto otros parámetros de laboratorio (por ejemplo, marcadores de la respuesta inmunitaria). Por lo tanto el diagnóstico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas ha de ser multidisciplinar y requerirá una comunicación estrecha y fluida entre el personal facultativo, clínicos y microbiólogos, así como una preparación y formación específica del personal de enfermería y técnicos de laboratorio.

#### 3.2. MUESTRAS ADECUADAS. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras adecuadas dependerán de que la infección asociada a la formación de biopelículas se localice sobre un tejido vivo o sobre un biodispositivo y en cada caso específico se recomendará un tipo de muestra; éstas se detallarán posteriormente en los apartados concretos para cada tipo de infección. En general, las biopelículas *in vivo* son estructuras muy pequeñas, oscilando entre 4 µm y 200 µm, en tejidos, y entre 5 µm y 1200 µm en biodispositivos. Por lo tanto, la búsqueda de biopelículas en muestras clínicas puede ser difícil, requerir mucho tiempo y dar lugar a falsos negativos si las muestras no son representativas del foco de la infección. 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. La manipulación de las muestras desde su obtención hasta su procesamiento en el laboratorio debe ser la menor posible. Una vez obtenidas, las muestras se deben introducir en contenedores estériles de cierre hermético, apropiados a su tamaño y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad; no se debe añadir formol ni otros conservantes. Cuando exista sospecha de infección por hongos o micobacterias las muestras no se deben introducir en medios de transporte para

anaerobios. Dado que estas muestras suelen ser de difícil obtención, con riesgos para el paciente, y en muchas ocasiones insustituibles, debe indicarse a los servicios peticionarios que, antes de realizar la obtención, se pongan en contacto con el laboratorio de Microbiología, para evitar posibles errores y orientar el procesamiento de la muestra en base a la sospecha clínica. El envío de las muestras al laboratorio debe ser inmediato. El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible y cuando éste no sea posible, las muestras se conservarán refrigeradas a 2-8°C hasta su procesamiento un límite de tiempo máximo de 24 horas. 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, la congelación de ésta podría ser útil para la realización posterior de estudios moleculares.

A continuación se revisa el diagnóstico de cada tipo de infección relacionada con la formación de biopelículas así como las muestras más adecuadas según las recomendaciones actuales para el diagnóstico microbiológico:

##### 3.2.1. Muestras adecuadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en tejidos

###### 3.2.1.1. Infección pulmonar crónica

Las muestras adecuadas en este caso deberán ser útiles para la investigación de biopelículas y al mismo tiempo no resultar invasivas para el paciente, así serían válidas y representativas, las secreciones bronquiales del tracto respiratorio inferior como el esputo espontáneo, esputo inducido, lavado broncoalveolar (BAL), o broncoaspirado (BAS), dependiendo de la facilidad de obtención en cada paciente. Hay que intentar minimizar la contaminación orofaríngea en la obtención de estas muestras ya que miembros de la microbiota normal (como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* o *M. catarrhalis*) son también patógenos respiratorios.

###### 3.2.1.2. Rinosinusitis

Las secreciones purulentas obtenidas desde el meato medio o a través de las cavidades de los senos paranasales serían las muestras más útiles. En casos concretos, reservados a fines de investigación, se han obtenido muestras a través de la punción antral del seno maxilar.



### 3.2.1.3. Otitis crónica

El diagnóstico de las otitis crónicas se basa en los hallazgos clínicos, mientras que el microbiológico se reserva generalmente para casos refractarios al tratamiento.

La muestra clínica para el estudio microbiológico se debe obtener mediante aspiración por timpanocentesis, ya que los cultivos tomados del oído externo no son representativos. En el caso de que exista 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 en caso negativo, mediante torunda.

### 3.2.1.4. Infección de herida

Para llevar a cabo el diagnóstico microbiológico de una infección asociada a herida crónica es muy importante tener en cuenta el tipo de muestra analizada. La toma de muestra con torunda, aunque es la técnica más utilizada por ser un método sencillo de realizar, barato y no invasivo, no permite detectar los microorganismos que se encuentran en la parte más profunda de la herida y únicamente se podrían aislar las bacterias presentes en la superficie. En este aspecto, se subestima *P. aeruginosa* como microorganismo causante de infecciones asociadas a heridas crónicas, debido a las limitaciones del cultivo convencional con torunda. Además, esta muestra es susceptible de contaminación, no representa la carga bacteriana real de la herida y no permite el aislamiento de microorganismos anaerobios. Por el contrario, el cultivo de la biopsia de tejidos profundos tiene una mayor sensibilidad y especificidad y se considera la muestra de elección. Es importante recordar que en la obtención de tejidos conviene previamente eliminar el pus, el material necrótico y los tejidos desvitalizados y lavar a chorro con suero salino estéril.

### 3.2.1.5. Infección en pacientes quemados

El diagnóstico de la infección de la herida por quemadura se realiza por sospecha y vigilancia clínica diaria. Los cultivos superficiales con torunda permiten conocer los patógenos que colonizan, pero el procedimiento de referencia es el estudio histopatológico con cultivo cuantitativo del material de biopsia y se debe realizar si se sospecha sepsis con origen en la herida. Se confirma la presencia de infección cuando se aíslan más de  $10^5$  UFC por gramo de tejido. Mediante el análisis histopatológico se confirmaría la presencia de microor-

ganismos en la dermis por debajo de la escara y alrededor de los tejidos sanos adyacentes y así, aunque no se realiza en la actualidad de forma rutinaria, se podría observar y demostrar la presencia de biopelículas en las heridas de quemados. Al igual que en la infección de herida, en la obtención de tejidos, conviene previamente eliminar el pus, el material necrótico y los tejidos desvitalizados y lavar a chorro con suero salino estéril.

### 3.2.1.6. Infección asociada a válvula cardíaca nativa

Es muy importante realizar un diagnóstico a tiempo de la endocarditis infecciosa, sin embargo, a veces es complicado debido a la amplia variedad de signos y síntomas que puede presentar. Aunque se trate de una infección relacionada con la formación de biopelículas, resultaría muy difícil e incluso problemático intentar evidenciar o detectar éstas con las herramientas diagnósticas actuales. Los pilares básicos clásicos del diagnóstico son: la detección de las vegetaciones en las válvulas cardíacas por pruebas de imagen, concretamente la ecocardiografía, y el diagnóstico microbiológico basado en la positividad de los hemocultivos. Más recientemente, las técnicas de microbiología molecular están demostrando gran utilidad y adquiriendo, por tanto, mayor relevancia.

A través de los hemocultivos positivos se identifica al microorganismo causante de la endocarditis infecciosa que será con gran seguridad el responsable de la biopelícula sobre la vegetación. Se recomienda realizar tres hemocultivos con un volumen de sangre por extracción de al menos 10 ml para detectar la bacteriemia y descartar agentes etiológicos contaminantes. Se deben incubar en atmósfera aerobia y anaerobia. Las muestras se deben obtener de una vena periférica, mejor que del catéter venoso central, usando una técnica estéril. Los microorganismos que más frecuentemente causan endocarditis infecciosa suelen crecer a las 48 horas. Por ello las guías europeas recomiendan incubar los viales más allá del quinto día únicamente en el caso de que haya una alta sospecha de endocarditis infecciosa y los hemocultivos permanezcan negativos a las 48-72 horas. 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. En estos casos se deben realizar otras pruebas diagnósticas no basadas en el cultivo, como son las técnicas moleculares o la serología. Se ha descrito que en hasta el 9% de los pacientes con endocarditis infecciosa no se llega a

identificar el microorganismo causal, lo que conlleva a un peor pronóstico y a mayor mortalidad hospitalaria. Sólo en el caso del reemplazo valvular (que tiene lugar en el 25%-42% de los casos de endocarditis infecciosa), o después de una necropsia, es posible realizar el cultivo microbiológico de las vegetaciones. Un cultivo positivo de la vegetación se ha considerado criterio mayor de diagnóstico de endocarditis infecciosa. Sin embargo, el resultado del cultivo valvular está limitado por su baja sensibilidad (25%) y baja especificidad (71%). La baja especificidad se debe a las contaminaciones de los cultivos valvulares con especies bacterianas saprófitas y potencialmente causantes de endocarditis, como es el caso de estafilococos coagulasa negativos y estreptococos del grupo viridans. Se ha descrito que hasta el 28% de pacientes sin endocarditis infecciosa presentan resultados positivos en los cultivos valvulares. La baja sensibilidad se debe al tratamiento antibiótico y a la población bacteriana metabólicamente menos activa presente en el interior de las biopelículas. El cultivo valvular, por tanto, no se debe realizar rutinariamente y está desaconsejado en pacientes sin criterios diagnósticos de endocarditis infecciosa y en pacientes con endocarditis infecciosa documentada por hemocultivos positivos. En los pacientes sin un diagnóstico etiológico en el momento del reemplazo valvular, la muestra se debe cultivar solo en determinadas circunstancias y los resultados se deben interpretar con cautela.

En el caso de que se sospeche una endocarditis con hemocultivos negativos, se recomienda realizar pruebas de serología para *Bartonella* spp. y *Coxiella burnetii*, estas pruebas se comentarán en el apartado 3.6.2 de este documento.

### 3.2.1.7. Infección prostática

Para el diagnóstico de la prostatitis crónica se realizan 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 (debido a los inconvenientes que presenta la obtención de esta muestra, en algunos casos se sustituye por semen) y 4) orina del comienzo de la micción obtenida después del masaje prostático o tras la masturbación. Se considera que existe una prostatitis cuando la cantidad de UFC/ml es diez veces superior en secreción prostática, semen, u orina postmasaje que en primer o en el chorro medio de orina. Se puede realizar una versión simplificada que consiste en analizar la orina del chorro medio y la ob-

tenida tras el masaje prostático.

Debido a la implicación de las biopelículas en estas infecciones, esta técnica conlleva limitaciones y en muchos casos el diagnóstico microbiológico está limitado. Sin embargo, aunque se ha reconocido el papel de las biopelículas en las prostatitis crónicas, no se recomienda la realización de biopsias como parte del diagnóstico habitual, así que en este caso, otra vez, el diagnóstico microbiológico no va acompañado de la detección de la biopelícula. Se deben tener en cuenta estas limitaciones en los cultivos microbiológicos y valorar la presencia de prostatitis basándose en la sintomatología clínica, el tacto rectal y otras exploraciones complementarias.

### 3.2.1.8. Vaginosis

En la práctica clínica, el diagnóstico de la vaginosis bacteriana en mujeres en edad fértil generalmente se basa en la presencia de al menos tres criterios de Amsel (descarga característica vaginal, pH elevado, células clue, olor fétido) donde está englobado el diagnóstico microbiológico a través de la observación microscópica de dichas células clue que representan la asociación de esta patología con la formación de biopelículas a través de los agregados bacterianos fuertemente adheridos al epitelio vaginal.

La muestra adecuada para el diagnóstico microbiológico es la secreción vaginal obtenida mediante torunda. Si la microscopía no está disponible, el diagnóstico debe basarse en hallazgos clínicos (flujo vaginal típico, elevado pH vaginal, olor a pescado). Existen pruebas comerciales que tienen un rendimiento aceptable en comparación con la tinción de Gram, algunas de éstas están basadas en la detección de elevadas concentraciones de *G. vaginalis* mediante una sonda de ADN (Affirm VP III) o mediante la determinación de la actividad del enzima sialidasa en el flujo vaginal (OSOM BV Blue test).

Los cultivos vaginales en pacientes con vaginosis no son siempre fiables debido a que se trata de una infección polimicrobiana. Adicionalmente es importante reconocer que existe hasta un 70% de mujeres que son portadoras asintomáticas de *G. vaginalis*. Se considera apropiado realizar cultivos para excluir otros agentes etiológicos como: *Trichomonas* spp., *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*. En general, en la vaginosis bacteriana el cultivo no es una herramienta diagnóstica adecuada debido a su baja especificidad.

### 3.2.2. Muestras adecuadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas sobre dispositivos biomédicos

#### 3.2.2.1. Infección asociada a catéter intravascular

El aislamiento de ciertos microorganismos en sangre como *S. aureus*, *S. epidermidis* y otras especies de estafilococos, *Corynebacterium* spp. o *Candida* spp. en ausencia de otro foco de infección debe hacer sospechar un origen de la infección en el catéter. La coincidencia en los aislamientos obtenidos del punto de inserción o en el cultivo del catéter y los aislados en hemocultivos es fundamental a la hora de establecer el diagnóstico definitivo de bacteriemia relacionada con catéter. El diagnóstico de confirmación puede realizarse mediante técnicas microbiológicas realizadas sobre la punta retirada del catéter o bien antes de su retirada.

##### 3.2.2.1.1. Métodos diagnósticos sin retirar el catéter

El diagnóstico microbiológico sin necesidad de retirar el catéter se basa en los hemocultivos extraídos de forma simultánea a través del catéter y a través de venopunción utilizando el método de lisis-centrifugación. El criterio diagnóstico es que la concentración de microorganismos en el cultivo obtenido a través del catéter sea de 3 a 5 veces superior que la obtenida a través de la vena, o más de 100 UFC/ml en la sangre obtenida a través del catéter. Una técnica alternativa es el cálculo del tiempo diferencial utilizando un sistema de hemocultivos cualitativos. Cuando la diferencia entre los tiempos de positividad de los hemocultivos extraídos a través del catéter y de la vena es superior a 120 minutos se establece el diagnóstico. Sin embargo esta técnica no está validada para todas las situaciones. Se ha demostrado que la tinción con naranja de acridina de la sangre extraída a través del catéter puede proporcionar un diagnóstico rápido aunque dicha sustancia ya no se encuentra disponible en muchos laboratorios debido a su toxicidad. El cultivo de las conexiones tiene un valor predictivo negativo muy elevado, sin embargo, este método puede asociarse con la inducción de bacteremia transitoria en el 6% de los pacientes según un estudio.

El diagnóstico conservador de la candidemia relacionada con el catéter no es tan claro como en el caso

de la bacteriemia ya que ninguna de las herramientas usadas (como los diferenciales de tiempo, el cultivo de muestras superficiales, o incluso el estudio de la producción de biopelículas por parte de las cepas de *Candida* spp. productoras de biopelícula) son capaces de discernir si el catéter es el origen o no.

##### 3.2.2.1.2. Métodos basados en la retirada del catéter

Sólo se debe enviar una punta de catéter para cultivo si hay sospecha de infección asociada a la misma. La técnica microbiológica más utilizada es el método semicuantitativo de Maki, en la que el segmento del catéter se rueda sobre la superficie de una placa de agar sangre usando pinzas estériles; tras un período de incubación se cuentan las unidades formadoras de colonias. La presencia de 15 o más UFC por placa de cultivo semicuantitativo indica la colonización del catéter y por tanto muy sugerente del mismo como origen de la infección. Una limitación de este método es que sólo detecta la colonización de la superficie externa del catéter. En 1980 se describió la técnica de Cleri para cuantificar además los microorganismos de la superficie endoluminal de un catéter. Un recuento superior a  $10^3$  UFC/segmento refleja la colonización del catéter. Para distinguir por separado la colonización de la superficie interna y externa del catéter Liñares y colaboradores diseñaron el procesamiento de los catéteres primero mediante una modificación del método de Cleri y después mediante el método de Maki. Las ventajas e inconvenientes de estos métodos se tratarán más adelante en el apartado de procesamiento de las muestras (3.4.1.6. Muestras de procesamiento previo al cultivo controvertido).

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 catéter.

#### 3.2.2.2. Infección de válvula cardíaca protésica, marcapasos e injertos

##### 3.2.2.2.1. Infección de válvula cardíaca protésica

El diagnóstico definitivo de la endocarditis sobre válvula protésica sólo puede establecerse con certeza por medio del examen histológico y microbiológico de las vegetaciones obtenidas en el acto quirúrgico o en la necropsia. Los criterios diagnósticos de la Univer-

sidad de Duke son la base para el diagnóstico de la endocarditis. Los hemocultivos positivos siguen siendo la piedra angular del diagnóstico. Se deben extraer al menos dos tomas a intervalos de 30 minutos, inocular en cada frasco 10 ml de sangre, e incubarse en aerobiosis y en anaerobiosis. Las muestras se deben obtener mediante venopunción (debido al riesgo de contaminación) y utilizando una técnica estéril. Es imprescindible extraer los hemocultivos antes del tratamiento antibiótico. En la endocarditis la bacteriemia es constante y no es necesario esperar a que el paciente esté febril para extraer las muestras para hemocultivos. La serología o la detección antigénica es fundamental para el diagnóstico de determinados patógenos como: *C. burnetii*, *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp. o *Aspergillus* spp. El examen histopatológico, las tinciones, el cultivo y las técnicas de biología molecular aplicadas sobre el tejido perivalvular, las vegetaciones o la propia válvula son de gran ayuda. El cultivo de la válvula es poco sensible y poco específico. Los resultados del cultivo se deben interpretar con precaución, sobre todo en casos con hemocultivos negativos debido a los falsos positivos.

### 3.2.2.2.2. Infección asociada a marcapasos y desfibriladores implantables

Se deben obtener al menos dos tomas de hemocultivos antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano en todos los pacientes con sospecha de infección.

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. Se deben realizar cultivos aerobios y anaerobios para hongos y micobacterias. 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 microorganismos.

Deben realizarse siempre hemocultivos seriados y ante el aislamiento repetido de cocos grampositivos extremar el grado de sospecha de una infección de todo el sistema. En cambio, el aislamiento de microorganismos gramnegativos, especialmente si el dispositivo lleva colocado más de tres meses, debe valorarse con cautela y obliga a buscar otras posibilidades diagnósticas. En ausencia de síntomas o complicaciones sistémicas y con hemocultivos repetidamente negativos, puede establecerse el diagnóstico de infección local.

### 3.2.2.3. Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVVM)

Los métodos no invasivos para obtener muestras respiratorias incluyen: el esputo espontáneo, el esputo inducido, la aspiración nasotraqueal (en un paciente que es incapaz de cooperar para recoger una muestra de esputo), y la aspiración endotraqueal. El cultivo semicuantitativo de un aspirado bronquial es la metodología preferida para el diagnóstico de la NAVVM. Sin embargo, los cultivos cuantitativos de muestras obtenidas mediante broncoscopia pueden resultar útiles. Los criterios microbiológicos de diagnóstico son:

- Lavado broncoalveolar (LBA) con un umbral de  $\geq 10^4$  UFC/ml o  $\geq 5\%$  de células que contienen bacterias intracelulares en el examen microscópico directo.
- Muestra obtenida mediante cepillo protegido con un umbral de  $\geq 10^3$  UFC/ml.
- Aspirado distal protegido con un umbral de  $\geq 10^3$  UFC/ml.
- Aspirado endotraqueal cuantitativo con un umbral de  $\geq 10^6$  UFC/ml.

En los casos en los que los resultados están por debajo del punto de corte para el diagnóstico de la NAVVM, se sugiere suspender el tratamiento antibiótico. Se deben valorar también los factores clínicos ya que pueden alterar la decisión de retirar o mantener los antibióticos.

En ocasiones hay otras muestras que pueden ayudar al diagnóstico como: hemocultivo positivo no relacionado con otra fuente de infección, cultivo de líquido pleural positivo, cultivo de absceso pleural o pulmonar positivo, exámenes positivos para microorganismos específicos (*Legionella* spp., *Aspergillus* spp., micobacterias, *Mycoplasma* spp. o *Pneumocystis jirovecii*), detección positiva de antígenos víricos en las secreciones respiratorias, seroconversión (virus influenza, *Legionella* spp., *Chlamydia* spp.) o detección de antígenos en la orina.

### 3.2.2.4. Infección de prótesis articular e implantes ortopédicos

El diagnóstico de la infección asociada a prótesis articular continúa siendo un reto en la actualidad. Requiere un alto índice de sospecha ya que a pesar de contar con diversos parámetros analíticos [proteína C reactiva (PCR), velocidad de sedimentación glo-



bular (VSG)], técnicas de imagen (radiología simple, radioisótopos, tomografía axial computerizada [TAC] o resonancia magnética nuclear [RMN]) y el examen microbiológico del aspirado articular. En la práctica clínica ninguno de ellos por separado tiene una sensibilidad y especificidad excelente. Las infecciones crónicas tardías suelen ser oligosintomáticas y difíciles de diferenciar de las movilizaciones asépticas. Además, hay que tener en cuenta que los artefactos producidos por las prótesis dificultan la valoración mediante pruebas de imagen como el TAC o la RMN. Se consideran criterios de infección crónica tardía, la presencia, de, al menos, uno de los siguientes:

1. Aislamiento del mismo microorganismo en dos cultivos del aspirado articular o de muestras de tejido periprotésico recogidas durante la intervención.
2. Presencia de signos de inflamación aguda en el exámen histológico del tejido periprotésico.
3. Tracto fistuloso en contacto con la prótesis.
4. Material purulento en el espacio articular (objetivado por el cirujano).

Aunque los estudios microbiológicos constituyen una herramienta fundamental en el diagnóstico de estas infecciones, hay que tener en cuenta, que dado que los microorganismos de la microbiota cutánea suelen ser los responsables más frecuentes, un cultivo positivo, no nos asegura el diagnóstico.

Es recomendable remitir líquido sinovial para cultivo siempre que sea posible dado que se puede aislar el patógeno hasta en un 45%-100% de las ocasiones. Diversos estudios recomiendan no realizar tinciones de Gram del aspirado articular o del tejido periprotésico debido a su escasa sensibilidad (sensibilidad: <26%, especificidad: >97%). Las muestras de material periprotésico recogidas durante la cirugía de revisión de las prótesis son las más rentables, lográndose aislar el microorganismo hasta en un 65%-94% de los casos. Es necesario obtener un número suficiente de muestras que aumente la sensibilidad de los cultivos y que facilite la discriminación entre microorganismos contaminantes y patógenos. Varios estudios recomiendan el envío de al menos cinco o seis muestras intraoperatorias, de forma que el aislamiento de un microorganismo idéntico en tres o más muestras independientes debe considerarse un dato altamente sugestivo de infección [sensibilidad: 65%; especificidad: 99,6%; likelihood ratios (LR): 168,6]. Los cultivos pueden ser negativos por la exposición previa

a antibióticos (orales, intravenosos, impregnados en el cemento), una baja carga bacteriana, un medio de cultivo inapropiado, un tiempo insuficiente de incubación, microorganismos exigentes o un tiempo excesivo entre su recogida y su procesamiento.

Hay que evitar los cultivos de exudado procedente de fístulas crónicas ya que suelen estar colonizados por microbiota cutánea haciendo muy compleja su interpretación. Tampoco resultan útiles por su baja especificidad los cultivos recogidos mediante torundas en el intraoperatorio.

Debido a la presencia de biopelículas el diagnóstico mediante técnicas convencionales resulta difícil. El rendimiento puede ser mayor al cultivar directamente la prótesis. Previamente ésta debe ser sometida a un proceso de sonicación para lograr despegar 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.

### 3.2.2.5. Infección asociada a sonda urinaria

El diagnóstico de la infección asociada a sondaje urinario es difícil por lo inespecífico de los síntomas clínicos y por el escaso valor predictivo positivo que tiene la presencia de piuria. 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<sup>3</sup> UFC/ml de una única especie bacteriana en una muestra de orina obtenida a través de la sonda o en una muestra de orina obtenida de un paciente en el que se retiró la sonda en las 48 horas 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. En este sentido, la presencia de cocos grampositivos establecería la necesidad de una cobertura antibiótica activa frente a estos microorganismos, y su ausen-

cia, probablemente la descartaría. El urocultivo se ha de recoger puncionado 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.

### 3.2.2.6. Infección asociada a otro tipo de implantes biomédicos

En la mayor parte de ocasiones las manifestaciones clínicas de una infección precoz asociada a un implante biomédico son muy características con signos flogóticos locales, fiebre y/o presencia de colecciones peri-implante, lo cual en muchas ocasiones basta para establecer el diagnóstico. Sin embargo, en el caso de las infecciones tardías, la sintomatología clínica puede ser muy anodina con presencia de dolor o deformidades. En estos casos pueden aparecer fistulas o incluso erosiones cutáneas con exposición del implante. El diagnóstico debe incluir una completa evaluación clínica, una exploración física adecuada y un abordaje multidisciplinar que incluya al cirujano, al infectólogo y al microbiólogo. Si se recogen muestras de tejidos, éstas se deben enviar al laboratorio de Microbiología y para estudio histopatológico.

#### 3.2.2.6.1. Infección asociada a implantes de mama

Si se objetivan colecciones peri-implante se puede realizar una punción aspiración guiada por ecografía. El material se debe enviar al laboratorio de Microbiología para realización de tinción de Gram y de ácido-alcohol resistencia además de cultivo bacteriológico y de micobacterias. 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, éste se debe colocar en un frasco estéril y enviar al laboratorio de Microbiología para realizar un cultivo tras sonicación. En el caso de la infección asociada a implantes de mama no hay apenas experiencia en el uso de esta técnica para el diagnóstico de una infección asociada, sin embargo, al igual que sucede con las prótesis articulares, podría ser una herramienta útil. Como principal inconveniente de este método está la facilidad de contaminación de las muestras durante la extracción y el procesamiento. Por lo tanto, y precisamente de-

bido a que muchas veces es necesario el empleo de medios de enriquecimiento ya que estas infecciones pueden cursar con una carga baja, es preciso interpretar con precaución los resultados microbiológicos.

#### 3.2.2.6.2. Infecciones asociadas a mallas abdominales, implantes de pene, sistemas de neuroestimulación, e implantes cocleares

Desafortunadamente, al igual que con los implantes de mama, no existen guías o recomendaciones ni sobre el diagnóstico de estas infecciones, ni sobre el tratamiento más adecuado en cada caso. Esto se debe a que el número de implantes que se colocan cada año es relativamente muy bajo y a que la tasa de infección asociada es asimismo muy baja. Cuando la infección está localizada en la bolsa del generador o el trayecto subcutáneo, se recomienda obtener muestra del exudado purulento por aspiración y si es posible, muestra de tejido. Se desaconseja el empleo de torundas para la obtención de las muestras por su bajo rendimiento al obtener muy escaso volumen de muestra y ser muy frecuente la contaminación. Como sucede en todas las infecciones asociadas a biopelículas en cuerpos exógenos, el pretratamiento mediante sonicación que permite desagregar las bacterias de la biopelícula, puede tener una mayor rentabilidad que el cultivo convencional.

## 3.3. DETECCIÓN MICROSCÓPICA

La detección de las biopelículas en las muestras requiere que la microscopía demuestre evidencia de un proceso infeccioso en curso, a través de hallazgos como la presencia de células inflamatorias (leucocitos polimorfonucleares), y que se pueda observar que los microorganismos presentes se disponen en agregados microbianos embebidos en una matriz propia. El análisis microscópico se puede realizar a través de microscopía óptica y métodos de tinción rutinarios, por ejemplo técnicas tan sencillas y empleadas como la tinción de Gram. Otras técnicas más sofisticadas como las técnicas de detección por microscopía láser confocal (MLC) y microscopía electrónica de barrido (MEB), serían las más adecuadas para demostrar la presencia de biopelículas en las biopsias, pero no se encuentran disponibles para el trabajo de diagnóstico de rutina en el laboratorio de Microbiología Clínica.

La identificación microscópica específica de los mi-

microorganismos de la biopelícula en las muestras (biopsias o hisopos) se puede hacer por medio de técnicas de hibridación de fluorescencia *in situ* (conocida por sus siglas en inglés, *fluorescent in situ hybridation*, FISH) y microscopía de fluorescencia específica de la especie, mientras que los métodos convencionales de cultivo o los basados en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (conocida por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*, PCR) como 16S ARN, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), bTEFAP pirosecuenciación (del inglés *bacterial tag encoded FLX 16S rDNA amplicon pyrosequencing*), etc, no pueden discriminar entre las bacterias planctónicas y las que forman parte de la biopelícula.

### 3.3.1. Microscopía óptica

Gracias al microscopio óptico se consigue ampliar muchas veces el tamaño de la muestra simplemente empleando la luz visible como fuente de iluminación y un sistema de lentes. La visualización directa en la muestra de agregados bacterianos y leucocitos mediante técnicas como la observación en fresco en campo claro o tinciones como la de Gram, hematoxilina eosina o modificaciones de estas tinciones que aumentan el contraste de las bacterias con los tejidos, pueden ser un elemento de diagnóstico microbiológico importante en algunas infecciones relacionadas con la formación de biopelículas debido a la sencillez de su preparación y a su bajo coste. Aunque, por ejemplo, la tinción de Gram no cuenta con una gran sensibilidad, siempre que la muestra se vaya a procesar para el cultivo convendría realizar una observación microscópica previa con el fin de poder observar las biopelículas.

De un modo general se podría proponer realizar una visualización mediante una extensión seguida de una tinción de Gram en secreciones (esputo en la infección pulmonar crónica, secreciones de los senos paranasales en rinosinusitis, pus del oído en otitis crónica o flujo vaginal en vaginosis), en aspirados (aspirado del tubo endotraqueal en la NAVM, aspirado articular en infección de prótesis, o aspiración de colecciones peri implante) o sobre la impronta de biopsias (en quemados, herida crónica) o de tejido perivalvular, de las vegetaciones o la propia válvula (en infección de válvula cardíaca protésica). No hay demasiada experiencia respecto a la rentabilidad de la observación directa sobre catéter o sonda urinaria

así como sobre el propio dispositivo biomédico retirado y aunque se podría probar, quizás sería más recomendable realizar un rodaje de los catéteres o sondas sobre un portaobjetos, así como una impronta de las áreas representativas del dispositivo biomédico retirado y proceder a la tinción y observación posterior de dichas extensiones con el objetivo de preservar parte de la muestra para su cultivo, técnicas moleculares y archivado. La ventaja de esta observación directa (previa al procesamiento de la muestra) es la posibilidad de observación de las células dispuestas en agregados, pero la desventaja es su baja sensibilidad. En los casos en los que la microscopía resulte negativa, podría realizarse una observación microscópica de la muestra homogeneizada o del líquido de sonicación (ver PNT-IRB-01 de este procedimiento). Los resultados de la microscopía deberían ser cuantitativos o semi-cuantitativos con el fin de ayudar a discriminar entre los contaminantes de la microbiota normal y microorganismos que infectan con independencia de que con anterioridad se hayan asociado con infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Es importante recalcar que el personal de laboratorio deberá estar entrenado específicamente en la detección visual de dichas estructuras.

### 3.3.2. Microscopía láser confocal (MLC)

El principio de la MLC se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco; esto se consigue mediante la iluminación de una pequeña zona de la muestra, recogiendo el haz luminoso que proviene del plano focal y eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. La MLC logra imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal en comparación con la microscopía óptica tradicional y, sobre todo, introduce la posibilidad de obtener secciones ópticas de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional.

La MLC ha surgido como una técnica no invasiva, no destructiva para el análisis de biopelículas por ejemplo en la rinosinusitis crónica, también se ha utilizado en la demostración directa de una biopelícula por *Staphylococcus* spp. en un drenaje ventricular externo de un paciente con antecedentes de fracaso recurrente en la derivación ventrículo-peritoneal o en la queratitis asociada al empleo de lentillas como parte del examen microscópico *in vivo* de la córnea para detectar quistes de *Acanthamoeba* spp. y hongos filamentosos



en el estroma corneal. Como se comentó previamente, gracias a la MLC se demostró que la OME crónica era un proceso infeccioso que cursaba con desarrollo de biopelículas bacterianas. Por lo tanto parece factible que con el tiempo se acabe desarrollando como una herramienta práctica en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Con la MLC es necesario realizar una tinción de fluorescencia para poder examinar la biopelícula a la luz del láser, esto podría complicar la preparación de las muestras pero al mismo tiempo resultaría útil para demostrar microorganismos vivos vs muertos.

Entre las principales desventajas figura el hecho de que en los estudios realizados, donde se ha evidenciado la presencia de biopelículas mediante MLC, no se haya encontrado correlación clínica ni con el cultivo microbiológico. En general, existe aún poca experiencia en diagnóstico clínico, se ha utilizado principalmente en investigación y con mayor frecuencia sobre implantes o superficies inertes y no tanto en tejidos. Es también una técnica que requiere de un equipamiento estructural complejo y costoso y una formación específica, por lo tanto, de momento no se puede apostar por ella como una técnica aplicable para el diagnóstico microbiológico de rutina de las infecciones asociadas a la formación de biopelículas.

### 3.3.3. Microscopía mediante hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH)

Esta técnica permite la visualización e identificación de microorganismos dentro de la biopelícula. Se basa en la utilización de sondas específicas marcadas o conjugadas con moléculas fluorescentes. Las sondas suelen estar formadas por anticuerpos dirigidos frente a proteínas específicas o fragmentos de ADN o ARN complementarios de regiones definidas del material genético de la bacteria.

Esta técnica se ha empleado con gran frecuencia para detectar microorganismos en secciones histológicas en los laboratorios de anatomía patológica. Es también una importante herramienta en el laboratorio de Microbiología ya que es muy útil, por ejemplo, para identificar especies bacterianas de las que no se pueden obtener cultivos puros. Su uso para localizar e identificar determinadas especies bacterianas en las biopelículas se ha extendido en los últimos años. Así hay trabajos que han estandarizado un nuevo método histo-FISH basado en sondas específicas que son

capaces de detectar *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. en las biopelículas de la superficie mucosa del tracto gastrointestinal a partir de cortes histológicos embebidos en parafina, pudiendo, así diferenciar bacterias probióticas o patogénicas. También se ha empleado para identificar específicamente biopelículas de *P. aeruginosa* sobre extensiones de esputo en pacientes con infección crónica por esta bacteria y descartar que no hubiera otras bacterias presentes en los agregados. Asimismo, como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado por microscopía confocal y PNA-FISH, que en las heridas crónicas, *S. aureus* se localiza principalmente en la superficie, mientras que los agregados de *P. aeruginosa* se encuentran en zonas más profundas de la herida.

En la actualidad las técnicas de FISH se emplean muchas veces para confirmar resultados obtenidos con las técnicas moleculares. La técnica de FISH es más sensible que el cultivo y sólo identifica las bacterias que están incrustadas o infiltradas dentro del tejido y por lo tanto no son susceptibles de contaminación. Sin embargo, al igual que sucede en la MLC, no siempre hay correlación con los hallazgos clínicos, además de requerir equipamiento y experiencia específicos.

### 3.3.4. Microscopía electrónica

En la microscopía electrónica de barrido el haz de luz es sustituido por un haz de electrones, esto hace que la sensibilidad aumente considerablemente respecto a la microscopía óptica. Es necesario preparar las muestras para que sean conductoras pulverizando sobre ellas una capa fina generalmente de oro o carbón. Esta preparación suele ser destructiva para la muestra y representará un problema en aquellas situaciones donde la muestra sea escasa. La microscopía electrónica ha sido la principal modalidad utilizada para documentar la presencia de biopelículas en el tejido del seno nasal, asimismo, también se ha utilizado para evidenciar la presencia de las biopelículas en otitis media aguda en la mucosa del oído medio y en tubos de timpanostomía en animales de experimentación, y en implantes de titanio en periodontitis. Sin embargo, los problemas inherentes asociados con la preparación del tejido y de muestreo, unidos al equipamiento específico que requiere y la preparación del personal técnico y facultativo, hacen que en la actualidad sea una técnica más bien relegada a la investigación que implantable de cara a la rutina asistencial del laboratorio de Microbiología.

### 3.4. CULTIVO

El cultivo microbiológico, tanto en el procesamiento previo de la muestra, como en la elección de los medios de cultivo y las condiciones de incubación, estará determinado por el tipo de infección concreto y por tanto, por la búsqueda de los microorganismos que con mayor frecuencia se encuentren implicados. En general, se comparte el hecho de que, al contrario de lo que sucedía en la observación microscópica donde el objetivo era evidenciar la existencia de biopelículas o agregados microbianos, de cara al cultivo, en muchas de las muestras, se necesitará liberar los microorganismos de la biopelícula para que puedan ser cultivados en los medios de cultivo. Para liberar las biopelículas de las superficies artificiales o disgregarlas de los tejidos puede ser necesario emplear procedimientos físicos como la sonicación, trituración y/o agitación. Estos métodos de liberación o procesamiento previo de la muestra serán tratados en el siguiente apartado. Es importante destacar que, las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas muchas veces cursan con una carga baja de microorganismos, lo que hace necesario emplear medios de enriquecimiento, y al mismo tiempo el procesamiento de las muestras es susceptible de contaminación, así que el punto clave será distinguir entre los microorganismos presentes en la biopelícula y aquellos que sean parte de la microbiota normal de la zona. Por lo tanto se recomienda especial atención en la recogida de muestras de boca, faringe, intestino, piel, área genital, etc y siempre que sea posible lavar o irrigar la zona previamente. Cabe señalar, sin embargo, que los miembros 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 semi-cuantitativos. Asimismo, siempre que sea posible, se recomienda realizar una toma múltiple de muestras ya que ayudará a aumentar la sensibilidad. También conviene recalcar que tratándose de infecciones relacionadas con la formación de biopelículas algunos microorganismos pueden ser viables y observarse microscópicamente pero no cultivables en los medios de rutina convencionales, en este caso se deberán emplear medios especiales y/o técnicas moleculares.

#### 3.4.1. Procesamiento previo de las muestras

El pre-tratamiento de las muestras está recogido en la sección 7.2.1. del Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología”. Las muestras se deben procesar con la mayor brevedad posible en una cabina de bioseguridad siguiendo las recomendaciones recogidas en el Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. En caso de sospecha de infección por hongos o micobacterias se seguirán las recomendaciones de los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC 9ª “Micobacterias” y 21 “Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos”.

En la actualidad no existe un protocolo general para el procesamiento de las muestras procedentes de infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. En este procedimiento se indica una serie de recomendaciones en función del tipo de infección, el tipo de muestra y los datos obtenidos en la literatura más reciente al respecto. Como se ha comentado en apartados previos, es muy importante que el laboratorio disponga de la máxima información posible respecto al tipo de muestra, la sospecha diagnóstica y la enfermedad de base del paciente. Es conveniente conservar una porción de las muestras refrigerada durante al menos siete días por si se necesitara realizar comprobaciones o estudios posteriores. Las muestras para estudios moleculares pueden conservarse congeladas a -70°C.

A continuación se detalla el procesamiento de las muestras para el cultivo en función de si deben ser sometidas o no una preparación previa, éste se haya también resumido en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico microbiológico en las infecciones asociadas a la formación de biopelículas

| Infección asociada a la formación de biopelículas   | Muestras adecuadas   | Observación microscópica | Procesamiento previo al cultivo   |
|---|--|--------------------------|---|
| <b>Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en Tejidos</b>   |  |                          |   |
| Infección pulmonar crónica  | Secreciones bronquiales (esputo espontáneo, esputo inducido, lavado broncoalveolar o broncoaspirado)                         | Gram                     | Agitación con solución salina, sonicación suave   |
| Rinosinusitis crónica   | Secreciones purulentas   | Gram                     | Agitación con solución salina, sonicación suave   |
| Otitis crónica  | Exudados, pus, aspirados (timpanocentesis)   | Gram                     | En función de la consistencia (agitación con solución salina, sonicación suave)   |
| Infección crónica de herida   | Biopsias   | Gram                     | Procesamiento de biopsias <sup>a</sup>  |
| Infección en pacientes quemados   | Biopsias   | Gram                     | Procesamiento de biopsias <sup>a</sup>  |
| Infección de válvula cardíaca nativa  | Hemocultivos   | Gram                     | No  |
| Infección prostática  | Orina comienzo micción, orina chorro medio, secreción prostática y orina post masaje prostático                              | Gram                     | No  |
| Vaginosis   | Secreción vaginal  | Gram                     | No (no se recomienda la realización de cultivo)   |
| <b>Infecciones relacionadas con la formación de biopelículas en cuerpos exógenos</b>  |  |                          |   |
| Infección asociada a catéter vascular   | Sin retirar catéter: hemocultivo   | Gram                     | No  |
|   | Con retirada de catéter: punta catéter   | Gram rodado <sup>b</sup> | Controvertido <sup>b</sup> (sonicación, lavado intraluminal, etc), método <i>standard</i> Maki sin procesamiento previo |
| Endocarditis sobre válvula cardíaca protésica   | Hemocultivos   | Gram                     | No  |
|   | Si reemplazo valvular o necropsia: vegetación  | Gram                     | Procesamiento de biopsias <sup>a</sup>  |
| Infección asociada a dispositivos de electroestimulación: Marcapasos, desfibriladores implantables y dispositivos de resincronización | Sin retirada dispositivo: hemocultivo  | Gram                     | No  |
|   | Con retirada dispositivo: dispositivo  | Gram                     | Sonicación dispositivo  |
| Neumonía asociada a ventilación mecánica  | Secreciones bronquiales (esputo espontáneo, esputo inducido, aspiración nasotraqueal, aspiración endotraqueal, broncoscopia) | Gram                     | Agitación con solución salina, sonicación suave   |
| Infección asociada a prótesis articular   | Líquido sinovial   | Gram                     | No  |
|   | Tejido periprotésico.  | No <sup>c</sup>          | Procesamiento de biopsias <sup>a</sup>  |
|   | Prótesis   | Gram sonicado            | Sonicación  |
| Infección asociada a sonda urinaria   | Orina (sonda)  | Gram                     | No  |
| Infección asociada a otro tipo de dispositivos biomédicos (implantes de mama, malla abdominal, pene, etc)                             | Dispositivo retirado   | Gram sonicado            | Sonicación  |
|   | Colección perimplante  | Gram                     | En función consistencia (agitación con solución salina, sonicación suave)   |

<sup>a</sup>Ver descripción del procesamiento de biopsias en el texto del documento.

<sup>b</sup>Infecciones con muestras en las que el procesamiento previo es controvertido, no están claras las ventajas frente al método convencional. Ver texto del documento.

<sup>c</sup>No se recomienda debido a su baja rentabilidad

### 3.4.1.1. Muestras líquidas o semilíquidas que no necesitan procesamiento previo

Aquí se incluirían: la sangre para hemocultivo (en infección de válvula cardíaca nativa o protésica, en infección asociada a catéter intravascular, en infección asociada a marcapasos y desfibriladores implantables, y en todas aquellas infecciones en las que sea necesario), los diferentes tipos de orina (o el semen) y la secreción prostática recogidos en la prostatitis, así como la orina obtenida a través de sonda en la infección asociada a sonda urinaria y el líquido articular en la infección de prótesis articular.

Las recomendaciones respecto a la obtención de la muestra de sangre así como todo el procesamiento de los hemocultivos están recogidos en el Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC “Hemocultivos”. El procesamiento de las muestras para el diagnóstico de la prostatitis y de la infección urinaria asociada a sonda está tratado en el Procedimiento en Microbiología 14a de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario”. El procesamiento del líquido articular asociado a infección de prótesis articular está detallado en la sección 6.4. del Procedimiento en Microbiología 34 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares”.

### 3.4.1.2. Muestras semilíquidas que necesitan procesamiento previo

Tales muestras son las secreciones bronquiales en la infección pulmonar crónica, las secreciones purulentas en rinosinusitis y las secreciones respiratorias en la NAVM.

En general, las muestras respiratorias en infecciones crónicas y en particular los esputos, presentan una elevada consistencia y deben someterse a un proceso de homogeneización antes de proceder a su cultivo. Habitualmente se emplean agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditiotreitól. El tiempo de contacto entre estos productos y el esputo previo a la siembra no debe ser prolongado ya que pueden inhibir o retrasar el crecimiento de diferentes patógenos. Para evitar esta acción deletérea también se ha recomendado emplear una homogeneización mecánica (sonicación suave) o utilizar simplemente suero salino.

El procesamiento general y la siembra de las muestras respiratorias asociadas a infección crónica en FQ y, debido a sus características similares, en EPOC o

bronquiectasias, debería seguir las recomendaciones establecidas en el Procedimiento en Microbiología 28 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística”. En el caso de la NAVM el procesamiento de las muestras está descrito en profundidad en el Procedimiento en Microbiología 25 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior”.

### 3.4.1.3. Muestras semilíquidas en las que el procesamiento previo depende de la viscosidad de la muestra

Dependiendo de su viscosidad será necesario o no realizar procesamiento previo en muestras de pus en otitis. En caso de precisar homogeneización previa al cultivo, estas muestras se podrían procesar, como en el caso de las secreciones respiratorias, agitando con suero salino o sonicando suavemente. Posteriormente la siembra se realiza inoculando con pipeta estéril los medios de cultivo. Si el material es demasiado denso, la inoculación de los medios se hará con un asa de siembra. Si la muestra se recibe en un contenedor de transporte para anaerobios (*portagerm* o similar), se extraerá con jeringa previa desinfección del tapón con povidona yodada.

### 3.4.1.4. Biopsias

Se incluirían en este grupo de muestras las biopsias de tejidos profundos en la infección crónica de herida, las biopsias en la infección en pacientes quemados, las biopsias óseas y de tejido peri-protésico 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. El procesamiento de las biopsias de tejidos blandos se encuentra detallado en el procedimiento en Microbiología 22 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. 2006”, el de las biopsias óseas en el procedimiento en Microbiología 34 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. 2009” y el de las biopsias de tejido peri-implantes en el procedimiento en Microbiología 52 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. 2015”.

Brevemente, según su tamaño, las muestras de biopsias se deben cortar en trozos en una placa de Petri estéril con un bisturí estéril. Los distintos fragmentos

se deben homogenizar en un homogeneizador tipo *stomacher* o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo BHI, antes de su siembra en los medios de cultivo. Ante la sospecha de infección por micobacterias, emplear agua destilada estéril. En el caso de sospecha de infección por hongos filamentosos no se deben triturar las muestras, se debe cortar en pequeños fragmentos que se colocarán directamente en los medios de cultivo para hongos. 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 homogenizado a los medios de cultivo.

Si se dispone de técnicas moleculares, de los tejidos adheridos a válvulas cardíacas protésicas o dispositivos extra corpóreos, se separará una parte para cultivo y otra para realizar PCR universal 16S ARNr y, si es posible, otra parte de la muestra se conservará en archivo a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.1.5. Prótesis, implantes retirados (procesamiento mediante sonicación)

En este grupo se incluirían los marcapasos y desfibriladores implantables retirados, las prótesis articulares, y los implantes (mama, pene, cocleares, etc) retirados.

Cuando se produce la retirada completa o parcial del material protésico se deben retirar los tejidos adheridos a la prótesis, implante, generador o cables (y por supuesto las verrugas), 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 biocapa de la superficie del implante. El procesamiento debe llevarse a cabo en campana de bioseguridad. La técnica de sonicación se describe detalladamente en el PNT-DBM-01 del procedimiento en Microbiología 52 de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. 2015" y en el PNT-IOA-04 del procedimiento en Microbiología 34 de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. 2009". Brevemente, para implantes grandes como prótesis mamarias, se añadirán 400 ml de solución Ringer lactato o PBS al recipiente que contiene el implante. Para implantes de

menor tamaño, se añadirá un volumen suficiente para cubrirlos, nunca inferior a 50 ml. Antes y después de la sonicación (frecuencia  $40 \pm 2$  kHz, densidad de potencia  $0,22 \pm 0,04$  watts/cm<sup>2</sup>; 5 minutos) el contenedor con la muestra debe agitarse en vórtex durante 30 segundos. Tras centrifugar (5 minutos a 3000 xg), se inoculará 0,1 ml del sedimento en cada uno de los medios de cultivo. 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", por lo que la interpretación de los resultados del cultivo deberá hacerse en conjunto con los resultados del resto de muestras obtenidas y en base a la información clínica de que se disponga. La bibliografía referente al diagnóstico de la infección asociada a estos implantes es muy escasa y por tanto 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 muestreen la superficie del dispositivo.

#### 3.4.1.6. Muestras de procesamiento previo al cultivo controvertido

Aquí se incluirían, por un lado, las sondas urinarias y por otro, los catéteres intravasculares.

Respecto a las primeras, el cultivo tras sonicación de la sonda extraída ha demostrado ser más sensible que el urinocultivo convencional para la detección de la infección urinaria asociada a sondaje. Este enfoque asegura la detección de la infección basada en la biopelícula debido al aislamiento únicamente de las bacterias adherentes, aunque aún no se han establecido protocolos estandarizados ni para la siembra tras la sonicación ni para los contajes e interpretaciones posteriores de los cultivos por lo tanto, hoy por hoy, no puede sustituir al urinocultivo obtenido a través de la sonda.

Dos cuestiones clave emergen respecto al procesamiento de los catéteres: si realizar sonicación previa a la siembra y si se debe determinar la colonización intraluminal. La especificidad de la técnica semicuantitativa de Maki es del 76%. Este método, por su sencillez ha sido aceptado por la mayoría de los



laboratorios de Microbiología y es la técnica de referencia. Sin embargo, tiene algunas limitaciones como la imposibilidad de calcular su sensibilidad, la disminución de la especificidad, si se disminuye el criterio de positividad de 15 a 5 UFC con el fin de aumentar la sensibilidad, y el hecho de que un 15% de bacteriemias de origen endoluminal no son diagnosticadas. También se ha demostrado una baja rentabilidad de este método en los catéteres de silicona de neonatos. Para determinar la colonización conjunta intra y extraluminal se pueden realizar diferentes técnicas: lavado del interior del catéter y sonicación, pero tanto éstas como la de Maki, no alcanzan por separado una sensibilidad superior al 58% en la detección de una colonización significativa del catéter. La sonicación detecta mejor la colonización intraluminal, 80% frente al 57% del método semicuantitativo, pero este último es más sensible para detectar la colonización extraluminal. Tampoco hay consenso sobre el umbral de positividad. De cara a distinguir por separado la colonización de la superficie interna del catéter de la externa, como se ha comentado anteriormente, se ha descrito por Liñares y cols. un método que combina una modificación del método de Cleri que permite conocer la colonización de la luz del catéter, lavando la superficie interna de la punta del catéter con 2 ml de caldo de cultivo, sembrando 0,1 ml en una placa de agar sangre y haciendo diluciones seriadas del caldo de cultivo para contabilizar los microorganismos en la superficie interna del catéter. A continuación, el catéter se siembra por el método semicuantitativo de Maki, para conocer la colonización de la superficie externa del mismo. La utilización conjunta de ambas técnicas tiene una sensibilidad del 100% en casos de infecciones relacionadas con catéter y bacteriemia relacionada con catéter; sin embargo la aplicación rutinaria de éste método en el laboratorio está limitada por su laboriosidad. El balance entre los valores de especificidad y sensibilidad y la laboriosidad de los distintos métodos hace que la técnica de Maki continúe siendo la técnica de referencia en la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica y dificulta el consenso sobre la recomendación rutinaria de otros métodos.

### 3.4.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación

Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para los hemocultivos están recogidos en el Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC "Hemocultivos", los de los dispositivos intravasculares se detallan en el Procedimiento en Microbiología 15

de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares", los de las muestras para el diagnóstico de la prostatitis y de la infección urinaria asociada a sonda en el Procedimiento en Microbiología 14a de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario", el del líquido articular asociado a infección de prótesis articular está detallado en la sección 6.4. del Procedimiento en Microbiología 34 de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares". En el caso de las infecciones crónicas respiratorias, los medios de cultivo y las condiciones de incubación se encuentran descritos en el Procedimiento en Microbiología 28 de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística" y en la NAVM estos están detallados en el Procedimiento en Microbiología 25 de la SEIMC "Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior".

En la vaginosis bacteriana el cultivo no es una herramienta diagnóstica adecuada debido a su baja especificidad.

La inoculación directa de las muestras de homogeneizados de biopsias, prótesis osteoarticulares y dispositivos biomédicos intra y extra vasculares debe realizarse en medios convencionales para bacterias aerobias (agar sangre, agar chocolate) y medio selectivo para aislamiento de bacilos gramnegativos (agar MacConkey o similar), medio para cultivo de bacterias anaerobias (agar Brucella o agar Schaedler) y si se considera necesario y hay muestra suficiente se sembrará también en medio selectivo para estreptococos (agar sangre ácido nalidíxico, CNA). Además se inoculará un medio líquido de enriquecimiento tipo caldo BHI, TSB o tioglicolato. En el caso de las biopsias de tejido blando el empleo de caldo de enriquecimiento sólo está indicado en las muestras invasivas, en las que la carga bacteriana puede ser baja y las características de obtención de la muestra obligan a apurar al máximo las posibilidades diagnósticas. En las muestras no invasivas no parece aportar ventajas y tiene el inconveniente de permitir el crecimiento de los microorganismos contaminantes de ciclo vital más rápido, que no reflejan la situación real de la infección. En caso de sospecha de infección por micobacterias se inocularan medios específicos, preferiblemente Middlebrook 7H10 en placa. En el caso de sospecha de *N. gonorrhoeae* en la infección osteoarticular, se inoculará una placa de medio Thayer-Martin y se incubará en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las placas de agar sangre, agar chocolate y CNA (colistina ácido nalidíxico) se incubarán a 35-37°C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las placas de agar Brucella y agar Schaedler para el cultivo de anaerobios se incubarán a 35-37°C en atmósfera de anaerobiosis. Los caldos se incubarán a 35-37°C en aire.

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. o micobacterias), este período se alargará convenientemente.

Las placas y los medios líquidos serán examinados diariamente para detectar la presencia de microorganismos. La primera lectura de las placas se hará a las 24 horas de incubación. Los medios líquidos se examinarán diariamente para ver si existe turbidez indicativa de crecimiento. Si se observa crecimiento en los medios sólidos, se intentará realizar una identificación presuntiva del microorganismo aislado mediante tinción de Gram, y las técnicas que estén disponibles en cada laboratorio, pruebas bioquímicas o espectrometría de masas. Es muy frecuente la observación en los cultivos de diferentes morfotipos coloniales y deben de realizarse los subcultivos necesarios para aislar cada uno de los morfotipos observados. Cuando proceda, se identificarán todos los aislados y se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos según los medios disponibles en cada laboratorio. Si no hay crecimiento se reincubarán todas las placas. Si se observa crecimiento en el caldo de cultivo, se realizará tinción de Gram y subcultivo en los medios generales y selectivos adecuados para su aislamiento.

### 3.5. TÉCNICAS MOLECULARES

Los métodos moleculares basados en técnicas de PCR son, tras el cultivo, la herramienta microbiológica más útil en cuanto a rendimiento diagnóstico. Permiten la identificación de microorganismos en casos 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 pero no hace desaparecer su ADN.

Se pueden realizar sobre la mayoría de muestras sobre las que se realiza el cultivo microbiológico (secreciones homogeneizadas, biopsias trituradas o sobre los caldos resultantes de la sonicación).

Existen multitud de técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos que forman parte de las biopelículas. A continuación se resumen las distintas técnicas que se pueden emplear:

#### 3.5.1. PCRs universales

La PCR universal del gen 16S ARNr en su variante cuantitativa permite la caracterización en pocas horas de los microorganismos presentes y cuantificarlos. Es un método prometedor para la caracterización rápida de las bacterias presentes en heridas crónicas y se usa para establecer la cantidad en diferentes muestras obtenidas de diferentes localizaciones de la herida.

Puesto que las técnicas de cultivo o independientes del cultivo (como PCR) no pueden distinguir entre crecimiento de biopelícula y microorganismos planctónicos, la identificación de las biopelículas se basa en la amplificación del gen que codifica para el ADN ribosomal 16S y posterior secuenciación, comparación de secuencias con bases de datos e identificación del microorganismo. Esta técnica ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de las infecciones asociadas a válvulas cardíacas protésicas (elevada sensibilidad [70-97%] y especificidad [91-100%]) y dispositivos intracardíacos y es claramente un método diagnóstico complementario al hemocultivo y al cultivo de los implantes y tejidos adyacentes. En las heridas crónicas estos métodos proporcionan información sobre la presencia, la prevalencia y el tipo de especies bacterianas y pueden identificar hasta un 40% más que mediante cultivo tradicional. Es previsible que en el diagnóstico de otras infecciones asociadas a biopelículas estas técnicas complementen el diagnóstico, y ayuden al microbiólogo a interpretar mejor los resultados de los cultivos.

Las PCRs universales tienen como principal inconveniente su baja sensibilidad analítica (son necesarias >100 UFC/ml) que no permite detectar bacterias/hongos directamente en sangre periférica, con lo que su utilidad queda limitada a pacientes en los que es necesaria la cirugía. Otro de los inconvenientes de este tipo de PCRs es que al detectar "cualquier bacteria" se pueden contaminar fácilmente y deben ser realizadas por personal con experiencia en su manejo e interpretación. Además, al haber pocos diseños comerciales se deben hacer en la mayoría de las ocasiones mediante "PCRs caseras" con los inconvenientes que ello conlleva. Otro de los inconvenientes es que no permiten detectar infecciones polimicrobianas.



Cuando la muestra resulte positiva, se emitirá un informe en el que conste la especie bacteriana identificada por el alineamiento de secuencias, considerando sólo la especie que presente una identidad  $\geq 99\%$  con una secuencia de una única especie bacteriana de la base de datos de GeneBank (como referencia ver PNT-DBM-02 del procedimiento en Microbiología 52 de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. 2015”).

### 3.5.2. PCRs específicas

#### 3.5.2.1. Detección de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano conservadas, empleando para ello cebadores específicos que permiten detectar la presencia de microorganismos concretos. Esta técnica podría resultar muy útil en la infección intracardiaca por microorganismos “no cultivables” que cursan, por tanto, con hemocultivos negativos como *Tropheryma whipplei*, *C. burnetii* o *Bartonella* spp. Se suelen realizar mediante PCRs “caseras” (no hay diseños comerciales) a tiempo real con sondas y tienen la ventaja de su alta sensibilidad y por tanto se pueden hacer en sangre periférica anticoagulada con EDTA, con lo que no es necesaria la obtención de la válvula cardíaca. Sería, sin embargo, siempre complementaria al hemocultivo que continúa siendo imprescindible para obtener los microorganismos en cultivo y realizar las pruebas de sensibilidad. Aún hay poca experiencia en el uso rutinario de estos métodos para diagnosticar pacientes con bacteriemia y poca literatura en endocarditis o bacteriemia asociada a dispositivos extra corpóreos.

El retraso de la incorporación de estas técnicas a la práctica clínica se debe a los siguientes factores: el tiempo requerido para el estudio, el coste, el número de falsos positivos asociados al método de la reacción en cadena de la polimerasa y la ausencia de información acerca de la sensibilidad del microorganismo a los antibióticos.

#### 3.5.2.2. Detección de ARN

Se ha propuesto la detección del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como posible indicador, utilizando para su detección una retrotranscriptasa inversa que permita su paso a ADN, antes de poder aplicar la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica

cuenta con un número prácticamente nulo de falsos positivos, sin embargo su sensibilidad está limitada por el bajo número de transcritos de ARNm presentes en una muestra clínica y la alta tasa de degradación tras la muerte celular. Finalmente se está estudiando el papel de la detección de ARN ribosómico (ARNr) como herramienta diagnóstica ya que cuenta con una sensibilidad mayor que la del ARNm al ser más abundante, constituyendo más del 95% del contenido total de ARN. El ARNr es además más resistente, tolerando mejor el proceso de extracción. Sin embargo, comparado con el ADN, es más lábil, constituyendo un buen marcador de viabilidad celular.

En la actualidad, las técnicas moleculares son aún complejas, no pueden sustituir a los métodos convencionales como el cultivo, sino sólo complementarlo y su uso todavía está mayoritariamente limitado a los laboratorios de investigación. 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 y aplicación concreta en dichas infecciones.

## 3.6. OTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

### 3.6.1. Marcadores inflamatorios

Hoy en día, no hay ninguna técnica de determinación de anticuerpos o marcadores inflamatorios específicos ampliamente disponible para todas las infecciones asociadas a la formación de biopelículas. Los marcadores inflamatorios no específicos como proteína C reactiva, procalcitonina, velocidad de sedimentación de eritrocitos, glóbulos blancos o diversas citoquinas no pueden distinguir entre infecciones planctónicas e infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.

### 3.6.2. Serología

La serología tiene una utilidad muy limitada en el diagnóstico de las infecciones asociadas a la formación de biopelículas. De hecho, no podría distinguirse en ningún caso entre infecciones planctónicas e infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Sin embargo, es un método sencillo y no demasiado caro, que en ocasiones puede complementar y ayudar al diagnóstico de algunas infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, si se dispone de otras herramientas y se ha realizado una eficiente orientación diagnóstica previa. Concretamente, la elevación de los títulos de anticuerpos IgG frente a

antígenos crudos o purificados de *P. aeruginosa* determinados por diversos métodos, incluyendo ELISA, tienen valor diagnóstico en las infecciones asociadas a la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ; tales pruebas han sido validadas y se encuentran disponibles comercialmente. También en estos pacientes (con FQ) se ha demostrado que en las infecciones asociadas a la formación de biopelículas por otras bacterias (complejo *B. cepacia*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*, etc), los anticuerpos frente a los antígenos bacterianos específicos se encuentran elevados, aunque no hay pruebas comerciales disponibles. Algunas de las pruebas anteriormente mencionadas se han utilizado en pacientes sin FQ con infecciones crónicas por *P. aeruginosa* de fenotipo mucoide y muestran, igualmente, respuestas con elevación significativa de los títulos de anticuerpos. Asimismo se ha detectado un aumento de anticuerpos IgM contra el antígeno polisacárido específico de biopelícula en *S. aureus* y de *S. epidermidis* en infecciones relacionadas con dispositivos aloplásticos. Una alta IgG y, en especial, un aumento en la fracción secretora de los anticuerpos IgA con cultivos negativos simultáneos puede promover la búsqueda de focos ocultos (por ejemplo, en los senos paranasales) mediante la toma de muestras adicionales a través de técnicas más invasivas (por ejemplo, BAL) y el uso de técnicas independientes del cultivo, como las moleculares, para detectar microorganismos inactivos o muertos debido a los tratamientos antibióticos.

En el caso de que se sospeche una endocarditis con hemocultivos negativos, se recomienda realizar pruebas de serología para *Bartonella* spp. y *C. burnetii*. Dentro de los criterios de Duke para el diagnóstico de endocarditis infecciosa sólo la serología positiva de fase I de *C. burnetii* (infección crónica) con títulos mayores de 1/800 se ha considerado un criterio mayor. La serología para *Brucella* spp. sólo se debe realizar en el caso de que existan factores de riesgo como vivir en áreas endémicas, exposición ocupacional o consumo de productos lácteos no pasteurizados. Aunque en las guías Europeas de 2015 se sigue recomendado realizar la serología para *Mycoplasma* spp. y *Legionella* spp., estos microorganismos muy rara vez causan endocarditis. De hecho, desde que existen métodos moleculares de diagnóstico, el número de casos de endocarditis por *Legionella* spp. o *Mycoplasma* spp. se ha reducido considerablemente (en épocas anteriores diagnosticados sólo por serología) y algunos autores postulan la posibilidad de falsos positivos o serología positiva en pacientes con endocarditis infecciosa de otra etiología, otros autores

han planteado reacciones cruzadas con *Bartonella* spp. y otros microorganismos.

#### 4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS A LOS ANTIMICROBIANOS

Los estudios clásicos de sensibilidad a los antimicrobianos, como la técnica de difusión en disco o los métodos de microdilución en caldo, que proporcionan la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizada para definir los puntos de corte de sensibilidad, sensible, intermedio y resistente (S, I y R) y los parámetros farmacodinámicos/farmacocinéticos (PK/PD), que predicen éxito terapéutico se realizan, aún hoy en día, con bacterias en estado planctónico. Como se ha comentado anteriormente, los microorganismos que forman parte de la biopelícula son significativamente más resistentes a los antimicrobianos que los que crecen planctónicamente, y no se han conseguido establecer por el momento puntos de corte para estas formas de crecimiento. Por lo tanto, en general, los resultados de las pruebas de sensibilidad clásicas no se deberían extrapolar para predecir el éxito terapéutico en las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, y no ofrecen directrices de cara al tratamiento de tales infecciones. Así, existe un interés creciente en desarrollar pruebas específicas para los microorganismos en forma de biopelículas.

En los últimos años, se han implementado y probado en diferentes especies bacterianas o levaduras varios modelos de desarrollo de biopelículas *in vitro*. 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.

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 de crecimiento de biopelículas que se han empleado en los estudios de sensibilidad pueden clasificarse en cerrados o estáticos (*batch cultures*) y en abiertos o continuos (cultivos continuos). De cara a la elección de un enfoque experimental óptimo es necesario tener en cuenta cuál es más adecuado para el ensayo a realizar. Las características de los modelos más relevantes se describen a continuación y están resumidas en [Tabla 2](#).

Tabla 2. Procesamiento de las muestras para el diagnóstico microbiológico en las infecciones asociadas a la formación de biopelículas

| Modelo de biopelícula                     | Placas microtiter  | Dispositivo de Calgary  | Modelo en celda de flujo   | Reactor CDC   |
|---|--|---|--|---|
| Disponibilidad de nutrientes <sup>a</sup> | Sistema cerrado (estático)   | Sistema cerrado (estático)  | Sistema abierto (dinámico)   | Sistema abierto (dinámico)  |
| Formación de biopelícula                  | Adherencia a los pocillos (poliestireno, polipropileno o policarbonato)  | Adherencia a los pinchos/púas (poliestireno, polipropileno o policarbonato)   | Adherencia a la superficie de vidrio de un cubre-objetos   | Adherencia a cupones (policarbonato, silicona, acero inoxidable, etc)   |
| Estudio antimicrobiano                    | Pocillos incubados con los antimicrobianos. Lavado, aclarado y renovación del medio diariamente  | Biopelículas en las púas incubadas con los antimicrobianos. Lavado, aclarado y renovación del medio diariamente   | Los antimicrobianos se añaden al bote de medio y circulan a través de la celda de flujo durante el tiempo necesario                                    | Los antimicrobianos se añaden a la fase fluida y así todos los cupones están expuestos simultáneamente        |
| Biomasa/recuento UFC                      | Tinción con CV<br>Disolución con etanol<br>Lectura de la absorbancia a 570 nm (lector de placas de micropocillos)  | Transferencia de las biopelículas por centrifugación o sonicación. Medida de la DO a 650 nm. (0-6h a 37°C)<br>Siembra de diluciones seriadas 1/10                       | Despegado de las biopelículas y recolección tras lavado de los canales con perlas de vidrio en solución salina.<br>Siembra de diluciones seriadas 1/10 | Transferencia de las biopelículas por sonicación y agitación vigorosa.<br>Siembra de diluciones seriadas 1/10 |
| Análisis microscópico                     | Estudios de viabilidad (proporción de vivos/muertos)   | MEB<br>MLC<br>Ambas requieren fijación y tinción, técnicas destructivas para las biopelículas   | MLC<br>Las bacterias están marcadas previamente con PF   | MEB<br>MLC<br>Se necesita tinción   |
| Análisis estructural                      | No se ha descrito  | Estudios de imagen 3D y viabilidad (proporción de vivos/muertos)  | Análisis de parámetros estructurales (biomasa, grosor, rugosidad, coeficiente de rugosidad, etc) con el <i>software</i> Comstat                        | Estudios de imagen 3D y viabilidad (proporción de vivos/muertos)  |
| Características relevantes                | Sencillo y reproducible.<br>Bajo riesgo de contaminación<br>Grosor de la biopelícula < 50 µm   | Sencillo y reproducible.<br>Bajo riesgo de contaminación<br>Grosor de la biopelícula < 50 µm  | Visualización directa y seguimiento en tiempo real no destructivo para la biopelícula<br>Grosor de la biopelícula > 50 µm                              | Permite el análisis simultáneo de las bacterias en crecimiento planctónico y en biopelícula                   |
| Microorganismos estudiados                | <i>Staphylococcus aureus</i><br><i>Candida albicans</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Streptococcus pneumoniae</i><br><i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Staphylococcus</i> spp.<br><i>Streptococcus</i> spp<br><i>Mycobacterium</i> spp.<br><i>Candida</i> spp.<br><i>Burkholderia</i> spp. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Staphylococcus</i> spp.  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Candida</i> spp.<br><i>Staphylococcus</i> spp                             |

<sup>a</sup>Sistema cerrado significa cultivo en lote y abierto en cultivo continuo; CV: cristal violeta; DO: densidad óptica; MEB: microscopía electrónica de barrido; MLC: microscopía láser confocal; PF: proteína fluorescente

## 4.1. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN MODELOS CERRADOS O ESTÁTICOS

Los modelos cerrados tienen la ventaja de ser sencillos, factibles, reproducibles, de bajo coste económico y resistentes a la contaminación lo cual los hace fácilmente aplicables en la rutina del laboratorio de Microbiología. Sin embargo, presentan como inconvenientes que emplean técnicas de fijación y tinción destructivas y que el grosor de las biopelículas no supera los 50  $\mu\text{m}$ , hecho que limita los estudios estructurales.

### 4.1.1. Estudios de sensibilidad en placas multipocillo

En este sencillo ensayo cuantitativo, los pocillos que contienen el medio de cultivo estéril se inoculan con una suspensión de los microorganismos y se dejan crecer. La capacidad de los antimicrobianos para prevenir o minimizar el crecimiento de las biopelículas se puede medir mediante su adición en distintas concentraciones sobre las biopelículas en formación o ya maduras. La cuantificación de la producción de biopelícula se logra tras eliminar el medio de cultivo agotado de los pocillos, un lavado opcional en tampón para eliminar las "células de baja adherencia", y la tinción con cristal violeta, que es un colorante catiónico que tiñe de manera no específica a los integrantes de la biopelícula a través de interacciones iónicas. Los protocolos se pueden modificar para incorporar diferentes colorantes. El cristal violeta se disuelve por la adición de un volumen estándar de etanol (o ácido acético glacial), y se mide entonces la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de microplacas.

La viabilidad bacteriana en la biopelícula se puede determinar mediante el uso del colorante azul resazurina, que reducido por las bacterias viables da lugar al compuesto rosa fluorescente, resorufina. Tras eliminar el medio, se lava con solución salina de fosfato tamponada, y las biopelículas se incuban con resazurina a temperatura ambiente en oscuridad, y por último se mide la fluorescencia a una longitud de onda de 590 nm, con una longitud de onda de excitación de 550 nm.

#### 4.1.1.1. Estudios de sensibilidad a antifúngicos en placas multipocillo

Los estudios de sensibilidad a antifúngicos por parte de *Candida* spp. se realizan sobre biopelículas pre-

formadas tras 24 horas de incubación de acuerdo a la metodología previamente descrita por Pierce y colaboradores con algunas modificaciones. En resumen, las cepas son inoculadas en una solución de 20 ml de medio YPD e incubadas durante 24 horas a 30°C; tras centrifugación y lavado de las células, estas se resuspenden en 10 ml de RPMI 1640 y la suspensión se ajusta a  $1 \times 10^6$  células/ml; 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión se inocula en las placas multipocillo durante 24 horas a 37°C. Estas biopelículas se incuban de nuevo con soluciones que contienen diferentes concentraciones de antifúngicos a 37°C durante 24 horas y la susceptibilidad a los mismos se mide estudiando la actividad metabólica de la biopelícula por medio del ensayo de reducción de XTT. La solución de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) se lee por medio de un espectrofotómetro a 490 nm para calcular la CMI50 sénil (SMIC50) y CMI80 sénil (SMIC80), respectivamente, definidas como una reducción de un 50% y 80% de la actividad metabólica de la biopelícula tratada con antifúngico en comparación con el control libre de antifúngico. El procedimiento detallado de este estudio de sensibilidad se recoge en el PNT-IRB-02 de este procedimiento. Otra posibilidad, aunque menos utilizada, consiste en hacer un recuento de UFC en los pocillos como medida de viabilidad de las células embebidas en el biopelícula.

Las cepas de *Candida* spp. son particularmente sensibles a las equinocandinas, aunque la sensibilidad de estas cepas en forma planctónica es superior a cuando están en forma sénil.

#### 4.1.1.2. Estudios de producción de biopelículas en cepas de *Candida* spp.

Las diferentes especies de *Candida* son capaces de producir biopelículas en diferente cuantía, incluso las cepas dentro de una misma especie producen biopelículas en diferente grado. Las biopelículas se pueden formar de acuerdo al método anteriormente citado. Generalmente se estudia cada cepa por triplicado para evitar problemas de reproducibilidad. La cuantificación de la biopelícula se puede llevar a cabo midiendo su biomasa (tinción con cristal violeta [CV]) o midiendo su actividad metabólica a través de la reducción del XTT. La tinción de cristal violeta consiste en teñir con este colorante la biopelícula preformada con este colorante y determinar la biomasa de biopelícula de acuerdo a la cantidad de colorante que esta es capaz de retener. El método de reducción de XTT no mide la biomasa sino la actividad



metabólica de la misma. Ambos métodos son complementarios y determinan dos parámetros diferentes por lo que no es de extrañar que no haya buena concordancia entre ambos métodos. De hecho hay un perfil específico de las cepas de cada especie dependiendo de la información obtenida por cada uno de los métodos. Existen puntos de corte para poder clasificar a las cepas de acuerdo a su capacidad de producir biopelículas por cualquiera de los dos métodos comentados. Aunque esto es algo que se realiza más bien con carácter experimental, algunos estudios recientes demuestran que las cepas altamente formadoras de biopelícula se asocian con una mayor mortalidad de los pacientes que aquellas que no la producen en suficiente cuantía.

#### 4.1.2. Estudios de sensibilidad en el dispositivo de Calgary

En este modelo las biopelículas se cultivan en púas o pinchos suspendidos de la tapa de una placa de microtitulación por incubación a 37°C durante 20 h, ya sea con agitación a 20 Hz o sin movimiento. Las tapas de púas se lavan con solución salina y se colocan sobre placas de microtitulación de fondo plano, donde se incuban (normalmente, 18-20 horas a 37°C) en presencia de diferentes concentraciones de los antibióticos. Tras la exposición a los antibióticos, las tapas de púas se aclaran de nuevo, y se sumergen en un medio sin antibióticos en una placa de microtitulación de fondo plano (placa de recuperación de biopelícula). Se puede realizar una centrifugación ligera (por ejemplo, 805 G, 20 min) o 5 minutos de sonicación a temperatura ambiente para transferir las biopelículas de las púas a los pocillos. Se mide la densidad óptica (DO) a 650 nm antes y después de una incubación a 37°C durante 6 h. El control positivo de crecimiento adecuado de la biopelícula se define como una diferencia (DO a 650 nm a las 6 horas menos DO a 650 nm a las 0 horas) media de la DO a 650 nm  $\geq 0,05$ . La concentración mínima inhibitoria sobre la biopelícula (CMIB) se define como las concentraciones más bajas de antibiótico que dan lugar a una diferencia de DO a 650 nm  $\leq 10\%$  de la media de dos lecturas de pocillos de control positivo. El punto de corte del 10% representa una diferencia de 1 log en el crecimiento tras 6 horas de incubación. Este sistema permite la incubación con antibióticos en diferentes puntos de tiempo, lavando, aclarando y renovando los antibióticos diariamente. Se han realizado modificaciones de este ensayo que han permitido la determinación del número de células viables y mutantes resistentes a los antibióticos simplemente

mediante la siembra de diluciones seriadas (1/10) de las biopelículas transferidas en medios de cultivo con y sin antibióticos (a las concentraciones adecuadas). Este estudio de sensibilidad se encuentra detallado en el PNT-IRB-03 de este procedimiento. La estructura de la biopelícula sobre las púas se puede estudiar con microscopía electrónica de barrido o MLC. Antes de la observación microscópica, las biopelículas se deberán fijar a la superficie de las púas. Algunas de las técnicas de fijación disponibles son destructivas para la biopelícula, y sólo permiten la observación de la estructura de las bacterias subyacentes o la observación de la matriz extracelular polimérica. Para el uso de MLC, es necesario teñir la biopelícula con fluoróforos apropiados.

#### 4.2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN MODELOS ABIERTOS O DINÁMICOS

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. 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.

##### 4.2.1. Estudios de sensibilidad en celda de flujo

Este sistema abierto está constituido por un tanque que proporciona medio de cultivo a través de una bomba peristáltica multicanal y por una cámara de flujo laminar donde se forman las biopelículas. Los microorganismos se inoculan directamente en las cámaras de flujo por inyección a través de los tubos de silicona o PVC. Las células se van adhiriendo a la superficie, donde se comienza a formar la biopelícula. Las superficies para la adhesión suelen ser cubreobjetos transparentes para permitir su observación al microscopio. Todo ello está conectado por tubos anteriormente citados. Las biopelículas que se forman con estos sistemas son más gruesas que con el método estático de Calgary y el CDC Reactor.

Con este sistema se puede analizar la sensibilidad de los antibióticos sobre estas biopelículas forma-

das. Además, permite el análisis de las células viables y los mutantes. Otra ventaja es que se proporciona un entorno constante definido por el flujo laminar. La monitorización a tiempo real se puede realizar mediante fluorescencia con MLC, obteniendo imágenes que permiten determinar parámetros estructurales como la biomasa, el grosor, o el coeficiente de rugosidad de la biopelícula. A pesar de sus muchas ventajas, como inconveniente, hay que destacar que es laborioso y se emplea mucho tiempo en su preparación. Además, los cubreobjetos son muy frágiles y pueden romperse fácilmente.

De cara a realizar los ensayos de sensibilidad con este modelo, los antibióticos se añaden directamente al medio de cultivo y se deben renovar diariamente. Para emplear la MLC, las bacterias se tienen que marcar con fluoroproteínas en verde (GFP), cian (CFP) o amarillo (YFP). Las células o áreas muertas pueden teñirse con yoduro de propidio y así cuantificar y observar el efecto bactericida. Las imágenes adquiridas por MLC, al ser tomadas sección por sección, se pueden reconstruir en imágenes tridimensionales, muy útiles y visuales para estudiar la estructura y el efecto de los antibióticos en las diferentes zonas de la biopelícula. Además, dichas imágenes pueden ser procesadas por *softwares* como el Comstat para estudiar los parámetros estructurales comentados anteriormente. Se necesita un número significativo de imágenes (al menos cuatro imágenes por canal por célula de flujo) para realizar este análisis. Las células viables y los mutantes resistentes a los antibióticos pueden determinarse al final de los experimentos lavando los canales de la celda de flujo con 1 ml de suspensión de NaCl al 0,9% y perlas de vidrio para despegar las biopelículas y, a continuación, realizando diluciones 1/10 y sembrando en medio y en medio con las concentraciones adecuadas de los antibióticos.

#### 4.2.2. Estudios de sensibilidad en biorreactores: reactor de biopelículas CDC

Es un sistema abierto que consta de un reactor de vidrio donde se insertan ocho barras que portan cada una tres discos sobre los que se forma la biopelícula y una varilla magnéticamente guiada que hace de agitador. El reactor de vidrio está conectado a un matraz con medio de cultivo que se va bombeando. Este medio entra por unos tubos por la parte superior del vaso y sale por unos tubos situados en el lateral, estableciéndose de esta forma un flujo continuo. Debido a la rotación, la biopelícula se forma bajo unas altas condiciones de flujo. Los discos pueden ser de diferentes

materiales como policarbonato, acero, PVC, vidrio, etc, según el ensayo y el microorganismo estudiado. El análisis de las biopelículas se realiza extrayendo las barras individualmente y analizando las muestras contenidas en los discos, mediante sonicación y vórtex para el cultivo y recuento de células o a través de visualización directa del disco por microscopía confocal para observar la estructura de la biopelícula. La principal ventaja de este método es que permite el análisis simultáneo de los microorganismos en crecimiento planctónico y en biopelícula.

#### 4.2.3. Sistema *Bioflux*

Es un sistema dinámico basado en la microfluídica. La novedad y lo que caracteriza a este método es permitir que un modelo abierto consiga un alto rendimiento, ya que admite la creación de múltiples biopelículas al mismo tiempo con flujos y temperaturas controlados. Consta de microcanales donde se va formando la biopelícula, estos están unidos por pocillos de entrada y salida de medio. Todo ello está integrado en una placa de poco tamaño que permite ser examinada microscópicamente a medida que la biopelícula se va formando. Cada microcanal está conectado a un pocillo de entrada de medio y uno de salida, de modo que el medio fluye de un pocillo a otro a través de una presión neumática que se puede regular. Estos canales tienen un tamaño 10 veces menor que el tamaño de las celdas de flujo, lo que permite un amplio rango de velocidades de flujo y resultados uniformes a lo largo del canal. El sistema incluye un compresor de aire y reguladores electroneumáticos para controlar la presión de forma precisa en cada canal. Un *software* integrado permite manejar todos los parámetros. Con este sistema se puede determinar la actividad de los antibióticos sobre las biopelículas formadas, así como la obtención de imágenes con MLC. Otra de las ventajas es la minimización de las contaminaciones, al desechar la placa después de cada ensayo.

### 4.3. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS/ FARMACODINÁMICOS (PK/PD) DE ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA

Gracias a los estudios de sensibilidad que se han realizado sobre los distintos modelos de crecimiento en biopelícula comentados en los apartados anteriores, se han podido definir, en los últimos años, parámetros PK/PD que cuantifican la actividad de los antimicrobianos sobre las biopelículas. Estos están resumidos en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Parámetros farmacodinámicos de actividad antimicrobiana sobre biopelículas

| Parámetro  | Abreviatura | Definición  |
|--|-------------|---|
| Concentración mínima inhibitoria de la biopelícula     | CMIB        | La mínima concentración de antimicrobiano que resulta en una diferencia de DO650 $\leq 10\%$ (1 log de diferencia en crecimiento tras 6 h de incubación) de la media de lectura de dos controles positivos (pocillos) |
| Concentración bactericida de la biopelícula            | CBB         | La mínima concentración de antimicrobiano que produce una reducción del 99,9% en las UFCs recuperadas del cultivo de la biopelícula comparado con un control de crecimiento   |
| Concentración mínima de erradicación de la biopelícula | CMEB        | La mínima concentración de antimicrobiano que previene un crecimiento visible en el medio de recuperación/recolección de las biopelículas   |
| Concentración preventiva de la biopelícula             | CPB         | Igual que la CMIB pero la inoculación y la exposición al antimicrobiano son simultáneos   |

De forma similar a la CMI convencional, la CMIB fue definida por Moskowitz y cols., utilizando el dispositivo de Calgary, como la concentración más baja de antibiótico que dar lugar a una diferencia de DO650  $\leq 10\%$  de la media de dos lecturas de pocillos de control positivo. Con respecto al recuento de células, la CMIB sería la concentración más baja de antibiótico a la que no hay un aumento dependiente del tiempo en el número de viables de la biopelícula cuando se compara un tiempo de exposición temprano con uno posterior. De igual modo que la concentración mínima bactericida (CMB), se ha definido en crecimiento planctónico la concentración bactericida de la biopelícula (CBB), que se define como la concentración más baja que elimina el 99,9% de las células recuperadas de un cultivo de biopelícula en comparación con el crecimiento control, y también ha sido utilizado para evaluar la eficacia de los antibióticos sobre las biopelículas. Otro parámetro que se ha utilizado es la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB), definida como la 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 (0 UFC/púa en los recuentos). Todos estos parámetros exploran la actividad de los antibióticos en biopelículas maduras, lo que significa que la biopelícula ya se ha establecido y por tanto, la infección crónica. Sin embargo, en el caso de los pacientes con FQ, por ejemplo, es en la etapa temprana de colonización cuando *P. aeruginosa* puede ser erradicada eficazmente si se usa la terapia antibiótica adecuada. En este sentido, la concentración de prevención de bio-

película (CPB) es un parámetro que podría utilizarse con el fin de reducir la densidad celular para prevenir la formación de la biopelícula. En la práctica, la determinación de la CPB implica una modificación del ensayo CMIB, que consiste en incubar las tapas con el inóculo planctónico en el momento de exposición a diferentes concentraciones de antibióticos.

#### 4.4. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Es importante destacar el hecho de que, en casi todos los casos, los parámetros descritos en el apartado anterior se han definido mediante el sistema de Calgary 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. Sólo el macrólido azitromicina, que no es activo en los estudios estándar de sensibilidad *in vitro*, mostró actividad bactericida sobre las biopelículas. Sin embargo, en otro estudio *in vitro*, utilizando el modelo de celda de flujo, se encontró que, a pesar de esta buena actividad sobre las biopelículas, la azitromicina seleccionaba fácilmente mutantes resistentes en particular en las cepas hipermutadoras. Además, el mecanismo de resistencia seleccionado, la sobreexpresión de Mex-CD-OprJ, también conferiría resistencia a otros agentes antipseudomonales tales como ciprofloxacino o cefepima, aunque en contraste, convertía a las cepas en hipersensibles a

otros agentes, como aminoglucósidos.

De forma similar, ciprofloxacino, que es uno de los antibióticos más activos en biopelículas (CMI igual que CMI), condujo a la selección y amplificación de mutantes resistentes en un modelo de PK/PD en celda de flujo de tratamiento de biopelículas de *P. aeruginosa*. En este modelo, una concentración de 2 mg/l de ciprofloxacino, que se correlaciona con la concentración de prevención de mutantes (CPM) y proporciona un área bajo la curva de concentración vs tiempo ( $\Delta UC$ )/MIC de 384, que debería predecir el éxito terapéutico, demostró, sin embargo, que los parámetros PK/PD no lograron suprimir el desarrollo de resistencia en las biopelículas.

Los resultados de otros estudios de modelos PK/PD que también emplearon biopelículas de *P. aeruginosa* mostraron que el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos seguía una cinética de muerte dependiente del tiempo, y dependiente de la concentración o dosis-dependiente para ciprofloxacino, colistina y tobramicina, similar a lo que se ha demostrado en crecimiento planctónico. Sin embargo, las concentraciones de antibiótico necesarias eran, en todos los casos, mucho más elevadas; más aún incluso en los casos de cinética tiempo-dependiente, cuando había sobreproducción de beta-lactamasa, el patrón de muerte de la ceftazidima pasaba a ser dependiente de la concentración.

Debido a la compartimentalización y diferenciación espacial, estructural y funcional de la biopelícula, comentado en apartados previos, los antibióticos no actúan de igual forma en toda ella. El análisis de la actividad antimicrobiana con el sistema de celda de flujo revela que algunos agentes (como el ciprofloxacino) es eficaz sólo en la zona externa (metabólicamente activa), mientras que otros (como la colistina) sólo tiene efecto bactericida sobre las zonas internas (atenuadas metabólicamente), proporcionando un fundamento racional para el establecimiento de la terapia basada en la combinación antibióticos.

Aunque *P. aeruginosa* se ha erigido en cierta manera la bacteria paradigma de los estudios de sensibilidad en biopelículas, muchos otros géneros bacterianos como *Staphylococcus*, también se han utilizado para ensayar antibióticos en crecimiento de biopelícula. Así por ejemplo, en un modelo estático de infección por *S. aureus* o *S. epidermidis* asociada a prótesis articular ninguno de los antibióticos utilizados (rifampicina, vancomicina, tigeciclina, clindamicina, cotrimoxazol, ciprofloxacino, cloxacilina, daptomicina y

fosfomicina) fue totalmente eficaz, obteniendo valores de MBECs >1024 mg/L, de un modo similar a lo que se ha encontrado en otros estudios con modelos cerrados. El efecto del linezolid sobre las biopelículas es controvertido, así dependiendo del microorganismo y del modelo utilizado, linezolid presentó la mayor actividad en monoterapia (frente a vancomicina y gentamicina) en un modelo de infección asociada a catéter central por *S. epidermidis* empleando el dispositivo de Robbins modificado y sin embargo no presentó actividad alguna (similar a los controles negativos) frente a SARM en un modelo de terapia de sellado catéter. En otro modelo similar de terapia de sellado catéter (estático y en celda de flujo) donde se ensayaban antibióticos frente a biopelículas de *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) y SARM, se demostró que los antibióticos con mayor efecto frente a las biopelículas maduras fueron la daptomicina, tigeciclina y rifampicina mientras que la vancomicina no logró erradicarlas.

#### 4.5. CORRELACIÓN CLÍNICA DE LOS ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BIOPELÍCULAS

Recientemente, en una revisión Cochrane se han analizado los ensayos clínicos que comparan el tratamiento de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en FQ basado en los ensayos de sensibilidad estandar versus el basado en los estudios de sensibilidad en biopelículas. En la revisión se han incluido dos ensayos clínicos controlados multicéntricos, aleatorios, doble ciego, con un total de 78 participantes. Un ensayo se realizó en pacientes estables y el otro en pacientes con exacerbaciones pulmonares. El resultado primario fue el cambio en la densidad de *P. aeruginosa* en el esputo desde el principio hasta el final de la terapia con antibióticos.

Aunque la intervención demostró ser segura, los datos de estos dos ensayos no proporcionaron evidencia de que las pruebas basadas en la sensibilidad de la biopelícula fueran superiores a las pruebas convencionales de sensibilidad ya fuera en términos microbiológicos o en función de los resultados de la función pulmonar. En uno de los ensayos también se determinaron el riesgo y el tiempo para la exacerbación posterior, así como parámetros de calidad de vida y no se encontró ninguna diferencia entre los grupos. Por lo tanto, se concluye que la evidencia actual es insuficiente para recomendar la elección de antibióticos basados en pruebas de sensibilidad antimicrobiana sobre biopelícula en lugar de pruebas convencionales para el tratamiento de la infección



crónica por *P. aeruginosa* en FQ. Se sugiere emplear las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en biopelículas para el desarrollo de nuevas formulaciones más efectivas o nuevas sustancias que luego se pueden probar en ensayos clínicos.

La evaluación de nuevas estrategias de tratamiento en la infección crónica por *P. aeruginosa*, fue, de hecho, uno de los objetivos de un trabajo reciente de Rojo-Molinero y cols. donde se comparaba la terapia secuencial de antibióticos inhalados con los mismos antibióticos en monoterapia. El uso secuencial de antibióticos estaba basado en los mecanismos antagónicos de resistencia, donde el tratamiento con aminoglucósidos conduce con frecuencia a la hiperproducción de la bomba de expulsión Mex-XY-OprM que produce hipersensibilidad a los beta-lactámicos por inactivación de la bomba Mex-AB-OprM. En este trabajo se demostró que el tratamiento de la biopelícula con aztreonam seguido de tobramicina, y viceversa, fue superior a las terapias individuales en términos de recuento de viables y parámetros estructurales.

Entre las razones que pueden explicar la falta de correlación clínica con los estudios de sensibilidad en biopelículas se encuentra la dificultad de reproducir en un método la gran diversidad ecológica de las biopelículas, es prácticamente imposible imitar la arquitectura de una biopelícula *in vivo* y que ésta pueda ser usada a nivel universal. Al mismo tiempo parece también inalcanzable desarrollar un modelo de biopelículas para cada tipo de infección. En una revisión publicada recientemente, se evalúan estas cuestiones y la conclusión que subyace es que lo más urgente es la estandarización de un método sencillo, que permita ser calibrado y que sea capaz de predecir éxito en los resultados *in vivo* como paso intermedio a los ensayos clínicos.

#### 4.6. CONCLUSIONES PRÁCTICAS PARA LOS ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS A LOS ANTIMICROBIANOS

1. Los sistemas cerrados para el estudio de sensibilidad de biopelículas son prácticos, sencillos, baratos y fáciles de implementar en el laboratorio de Microbiología. Los sistemas abiertos son más caros, complejos y laboriosos y su ámbito está más relegado a los laboratorios de investigación.
2. Se recomienda el uso de los sistemas cerrados para realizar un cribado de qué antimicrobianos convencionales no se deberían usar y cuáles sí podrían funcionar en el

tratamiento de cada infección relacionada con la formación de biopelículas en concreto.

3. Se recomienda el uso de los sistemas abiertos para seguir investigando nuevas estrategias de tratamiento así como nuevos antimicrobianos y sustancias con actividad sobre las biopelículas.
4. Se alienta al desarrollo de nuevos estudios *in vivo* y ensayos clínicos que apliquen la información obtenida de los estudios de sensibilidad sobre biopelículas.

## 5. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 5.1. INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El informe microbiológico en una infección relacionada con la formación de biopelículas debería contener los resultados de la observación microscópica confrontados con los del cultivo y los estudios de sensibilidad. Aunque las tinciones de Gram se deben visualizar e informar lo más rápidamente posible, para el resultado final se deberán interpretar conjuntamente los hallazgos de las diferentes metodologías empleadas. Así, se pueden proporcionar informes preliminares (por ejemplo, de la tinción de Gram) y finales donde se cotejen con los resultados del cultivo y del (o de los) estudio(s) de sensibilidad.

#### 5.1.1. Tinción de Gram

Respecto a la observación microscópica, se debe visualizar la extensión o las extensiones completas, ya que la observación de microorganismos puede entrañar dificultades dependiendo del tipo de infección, la obtención de muestras representativas y la distribución no homogénea de los agregados bacterianos. Aún así, la tinción de Gram no deberá condicionar el procesamiento de la muestra, es decir, aunque no se observen estructuras de biopelícula, ni siquiera microorganismos, se deberá realizar el cultivo con su procesamiento previo pertinente cuando proceda. Se valorará e informará la observación de leucocitos polimorfonucleares que indica la presencia de reacción inflamatoria. Si se detecta una biopelícula microbiana mediante microscopía, puede informarse utilizando términos descriptivos, por ejemplo, "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".

### 5.1.2. Cultivos

Los microorganismos en los cultivos se encuentran en crecimiento planctónico, así que la lectura se realizará de la misma manera que la convencional.

Si en la observación microscópica se evidenció la presencia de una biopelícula y posteriormente se aísla un cultivo puro de un microorganismo que coincide en la tinción de Gram se podrá atribuir con bastante probabilidad a dicho microorganismo la formación de la biopelícula; también tendrá sentido realizar el estudio de sensibilidad sobre dicho microorganismo empleando un modelo de crecimiento en biopelícula. Cuando no exista concordancia entre la observación microscópica y el cultivo, 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, en este caso se debe tener en cuenta la posibilidad de que el paciente haya recibido tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra o que se trate de bacterias no cultivables. Si se encuentran disponibles para el laboratorio, en este caso, sería muy útil la realización de técnicas moleculares sobre la muestra. También se podría dar la situación en la que la observación microscópica fuera negativa pero los resultados de los cultivos positivos. Ésta quizá sea la que plantea mayor complejidad ya que dependiendo del tipo de infección, los microorganismos que podrían causarla podrían ser también responsables de la contaminación de la muestra durante su procesamiento. Así, en muchas infecciones (como en las relacionadas con dispositivos exógenos) se deberían valorar como significativos los aislados de microorganismos que en otras circunstancias se considerarían como microbiota normal de la piel (estafilococos coagulasa negativos, corinebacterias, *P. acnes*, estreptococos del grupo viridans, etc) y la valoración de un aislado como patógeno se facilitaría cuando el mismo microorganismo (biotipo y perfil de sensibilidad) se encontrara en más de una muestra del paciente; de ahí la importancia de la obtención de varias muestras en estas infecciones. De igual modo, los cultivos mixtos deberán ser valorados por el microbiólogo en función del tipo de infección, la observación microscópica y el aislamiento repetido en diferentes muestras, y éste deberá decidir si realizar el estudio de sensibilidad convencional o en biopelícula de cada microorganismo aislado. Los resultados negativos tanto de las tinciones como de los cultivos no excluyen una infección relacionada con la formación de biopelículas. En general, se recomienda guardar

las placas de la siembra directa, así como una porción de las muestras, por si fuera necesario realizar pruebas adicionales.

### 5.1.3. Información de los resultados del estudio de sensibilidad

Excepcionalmente, en algunos casos los estudios de sensibilidad clásicos se pueden aplicar a infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, en concreto en aquellas que con frecuencia constituyen un foco para la infección sistémica, por ejemplo, las asociadas a dispositivos intravasculares o a catéteres urinarios. También tiene sentido tratar las exacerbaciones de la infección pulmonar crónica según los resultados de los estudios de sensibilidad clásicos ya que éstas se deben, generalmente, al aumento de la masa bacteriana total originado por el crecimiento exponencial (planctónico) de los microorganismos. Dichas infecciones pueden ser tratadas con éxito basándose en los resultados de las pruebas de sensibilidad convencionales que se deben informar. Sin embargo, los facultativos responsables del paciente deben ser informados por el microbiólogo de que se puede producir una recurrencia de la infección por el foco de la biopelícula si éste no se puede eliminar por el tratamiento antimicrobiano.

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. Sin embargo, la realización rutinaria de estos ensayos podría proporcionar información útil y contribuir a la estandarización de los métodos. Se deberían registrar parámetros como la CMIB para los distintos antibióticos y microorganismos. Hasta que los puntos de corte (S, sensible; I, intermedio y R, resistente) de los antibióticos no estén definidos para las biopelículas por las agencias oficiales (CLSI y EUCAST a nivel internacional y COESANT en España) no es viable informarlos. Se podría informar la CMIB pero debería ir acompañada de una interpretación de lo que podría significar realmente en la práctica. En la actualidad, al no contar con normas consensuadas para la realización sistemática de estos estudios ni para el diagnóstico microbiológico general de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, en el informe de resultados debería figurar una llamada del tipo: "Para información adicional o asesoramiento en materia de tratamiento póngase en contacto con el laboratorio de Microbiología Clínica".

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. 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* 2014; 153586.
2. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clinical Microbiol* 1998; 36:2932-9.
3. Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Ped Pulmonol* 2009; 44:547-58.
4. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013; 136:1-51.
5. Bonkat G, Rieken M, Rentsch CA, Wyler S, Feike A, Schafer J, et al. Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication. *World J Urol* 2011; 29:133-8.
6. Brun-Bruissson C, Abrouk F, Legran P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987; 147:873-7.
7. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1771-6.
8. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 996-1006.
9. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:403-34.
10. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J Infect Dis.* 1980; 141:781-6.
11. Cobo J, Del Pozo JL. Prosthetic joint infection: diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9:787-802.
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
13. Del Pozo JL, Auba C. Role of biofilms in breast implant associated infections and capsular contracture. *Adv Exp Med Biol.* 2015;831:53-67.
14. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *New Engl J Med.* 2009; 361:787-94.
15. 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.
16. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mu-  
cosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002; 287:1710-5.
17. Guembe, M., Guinea J, Marcos-Zambrano L, Fernández-Cruz A, Peláez T, Muñoz P, Bouza E. Is biofilm production a predictor of catheter-related candidemia? *Med Mycol* 2014; 52: 407-10.
18. Guembe M, Martín-Rabadán P, Cruces R, Pérez Granda MJ, Bouza E. Slicing silicone neonatal vascular catheter tips improves colonization detection by the roll-plate technique. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Jan 18. pii: S1198-743X(17)30017-4.
19. Hurley JC. Impact of selective digestive decontamination on respiratory tract *Candida* among patients with suspected ventilator-associated pneumonia. A meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016; 35:1121-35.
20. Hengzhuang W, Ciofu O, Yang L et al. High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:196-204.
21. Heydon A, Nielsen AT, Hentzer M et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 2000; 146:2395-2407.
22. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Holá 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. ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21 (Suppl 1):S1-25.
23. 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.
24. Klug D, Balde M, Pavin D, Hidden-Lucet F, Clementy J, Sadoul N, Rey JL, Lande G, Lazarus A, Victor J, Barnay C, Grandbastien B, Kacet S; PEOPLE Study Group. Risk factors related to infections of implanted pacemakers and cardioverter-defibrillators: results of a large prospective study. *Circulation.* 2007; 116:1349-55.
25. 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.
26. Luján AM, Maciá 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(11):e27842.
27. Machado A, Cerca N. The influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2015;15;212(12):1856-61.
28. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda 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: 3382-86.
29. 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.
  30. Macia MD, Rojo-Moliner E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20:981-90.
  31. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296:1305-9.
  32. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and *non-Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol*. 2014; 304:1192-98.
  33. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Peláez T, Bouza E, Guinea J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity. *Med Mycol* 2016; 54:155-61.
  34. Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Perosanz M, Escribano P, Zaragoza O, Bouza E, Guinea J. Biofilm production and antibiofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin B in echinocandin-resistant yeast species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:3579-86.
  35. 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(2):147-156.
  36. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:1-45.
  37. 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.
  38. Mulet X, Macia MD, Mena A, Juan C, Perez JL, Oliver A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of nfxB mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1552-60.
  39. 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-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 2009; 169:463-73.
  40. Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate* 1993; 23:107-14.
  41. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; 288: 1251-54.
  42. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 2008; 68: 223-40.
  43. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62: e1-e50.
  44. Pierce CG, Uppuluri P, Tummala S, Lopez-Ribot JL. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp*. 2010, 44. pii: 2287.
  45. 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.
  46. Riu M, Terradas R, Sala M, Comas M, Knobel H, Grau S, Cots F. Costs associated with nosocomial bacteraemias in a University Hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30:137-42.
  47. Rodríguez-Créixems M, Muñoz P, Martín-Rabadán P, Cercenado E, Guembe M, Bouza E. Evolution and aetiological shift of catheter-related bloodstream infection in a whole institution: the microbiology department may act as a watchtower. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:845-51.
  48. Rojo-Moliner E, Macià MD, Rubio R, Moyà B, Cabot G, López-Causapé C, Pérez JL, Cantón R, Oliver A. Sequential treatment of biofilms with aztreonam and tobramycin is a novel strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:2912-22.
  49. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MA, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, Barnes RA, Williams DW. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care*. 2016; 37:30-37.
  50. 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.
  51. Tumbarello M, Fiori B, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e33705.
  52. Waters V, Ratjen F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015 5;(3):CD009528.



|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 1 de 8 |

## PNT-IRB-01

# Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas

| ELABORADO      |       | REVISADO Y APROBADO |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| Nombre / Firma | Fecha | Nombre / Firma      | Fecha |
|                |       |                     |       |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01      |       | Edición inicial               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 2 de 8 |

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se resume el procesamiento previo al cultivo de las muestras para el diagnóstico microbiológico de las infecciones más frecuentes relacionadas con la formación de biopelículas. El procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología en los que se pretenda determinar si existe una infección asociada a biopelículas.

## 2. FUNDAMENTO

Las infecciones asociadas a la formación de biopelículas son difíciles de diagnosticar. La sospecha frente a una infección relacionada con la formación de biopelículas debe realizarse desde una perspectiva global que integre tanto la historia clínica del paciente, sus signos y síntomas en el momento del estudio, así como los hallazgos microbiológicos. Estos se basan fundamentalmente en la observación microscópica, donde el objetivo es evidenciar la existencia de biopelículas o agregados microbianos, y en el cultivo, para el cual se necesitará liberar los microorganismos de la biopelícula a través de procedimientos físicos como la sonicación, trituración y/o agitación. También son útiles en estas infecciones las técnicas moleculares. Hasta el momento, no hay métodos microbiológicos de referencia establecidos, ni recomendaciones concretas sobre cómo procesar las muestras para realizar el diagnóstico microbiológico de una infección asociada a biopelículas. Este procedimiento se centrará en el procesamiento previo al cultivo de las muestras. La recogida de este tipo de muestras requiere, muchas veces, de métodos invasivos, por lo que su procesamiento y manipulación deben realizarse bajo estrictas condiciones de asepsia, ya que los microorganismos que pueden estar causando la infección (por ejemplo, *S. epidermidis*) son, en muchas ocasiones, indistinguibles de los contaminantes. Lo ideal es que tanto los cultivos como la observación microscópica sean cuantitativos o semicuantitativos. Asimismo, siempre que sea posible, se recomienda realizar una toma múltiple de muestras ya que ayudará a aumentar la sensibilidad.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Procedimiento en Microbiología nº 52 de la SEIMC: “Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Procedimiento en Microbiología 28ª de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
5. Procedimiento en Microbiología 25ª de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
6. Procedimiento en Microbiología 34ª de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
7. Procedimiento en Microbiología 22ª de la SEIMC “Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 3 de 8 |

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser estrictamente cumplimentado y en él deberán constar los siguientes datos:

- demográficos del paciente y servicio de ingreso hospitalario
- fecha
- tratamiento antibiótico previo
- enfermedad de base
- identificación del clínico responsable de la solicitud
- juicio clínico
- tipo de muestra (localización anatómica de la muestra)
- determinaciones microbiológicas solicitadas

### 4.2. GRUPOS DE MUESTRAS

#### 4.2.1. Muestras fluídas (semilíquidas)

Se incluyen aquí las secreciones bronquiales en la infección pulmonar crónica, las secreciones purulentas en la rinosinusitis, las secreciones respiratorias en neumonía asociada a ventilación mecánica y los exudados purulentos en otitis crónica.

#### 4.2.2. Biopsias

Se incluyen en este grupo las biopsias de tejidos profundos en la infección crónica de herida, las biopsias en la infección en pacientes quemados, las biopsias óseas y de tejido periprotésico en la infección asociada a prótesis articular, las vegetaciones en infección de válvula cardiaca nativa o protésica cuando haya reemplazo valvular o necropsia y las biopsias del bolsillo subcutáneo en la retirada de marcapasos.

#### 4.2.3. Prótesis, implantes retirados

En este grupo se incluirían los marcapasos y desfibriladores implantables retirados, las prótesis articulares, y los implantes (mama, pene, cocleares, etc) retirados.

### 4.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La obtención de las muestras debe realizarse bajo estrictas condiciones de asepsia para evitar la contaminación con la microbiota de la piel o área orofaríngea (en las muestras respiratorias) y preferentemente antes de iniciar el tratamiento antibiótico. En las biopsias de tejidos, se debe previamente, eliminar el pus, el material necrótico y los tejidos desvitalizados y lavar a chorro con suero salino estéril. Las muestras de tejido se obtienen mediante biopsia (con sacabocados o procedimiento quirúrgico abierto). La toma de muestras de biopsias de hueso y de tejidos adyacentes en la mayoría de los casos, se realiza por un traumatólogo mediante cirugía abierta. Cuando se toman varias biopsias del mismo paciente, se deben utilizar bisturíes distintos para cada muestra, para evitar contaminaciones que dificulten la interpretación de los resultados de los cultivos, las muestras múltiples deberán identificarse y enviarse por separado. Las prótesis se explantarán siguiendo los correspondientes protocolos quirúrgicos en quirófano.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 4 de 8 |

#### 4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Tras su extracción, las muestras serán manejadas con las máximas condiciones de asepsia, e introducidas en contenedores estériles adecuados para su tamaño que se cerrarán de forma hermética. En las biopsias o prótesis/implantes retirados se podrá añadir suero salino estéril para evitar la desecación. Las muestras se enviarán inmediatamente para su procesamiento al laboratorio de Microbiología. Es importante indicar a los servicios quirúrgicos responsables que antes de enviar este tipo de muestras contacten con el laboratorio de Microbiología. El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible a su llegada al laboratorio. Si no es posible el procesamiento inmediato, las muestras se conservarán refrigeradas entre 2°C-8°C, hasta su procesamiento, durante un tiempo no mayor de 24 h. Las muestras en medio de transporte para anaerobios se deben mantener a temperatura ambiente. Si se dispone de suficiente muestra es aconsejable separar una parte para archivo a -70°C para la posterior realización de técnicas moleculares.

#### 4.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Tras su extracción, las muestras serán manejadas con las máximas condiciones de asepsia, e introducidas en contenedores estériles adecuados para su tamaño que se cerrarán de forma hermética. En las biopsias o prótesis/implantes retirados se podrá añadir suero salino estéril para evitar la desecación. Las muestras se enviarán inmediatamente para su procesamiento al laboratorio de Microbiología. Es importante indicar a los servicios quirúrgicos responsables que antes de enviar este tipo de muestras contacten con el laboratorio de Microbiología. El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible a su llegada al laboratorio. Si no es posible el procesamiento inmediato, las muestras se conservarán refrigeradas entre 2°C-8°C, hasta su procesamiento, durante un tiempo no mayor de 24 h. Las muestras en medio de transporte para anaerobios se deben mantener a temperatura ambiente. Si se dispone de suficiente muestra es aconsejable separar una parte para archivo a -70°C para la posterior realización de técnicas moleculares.

#### 4.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

El manejo de la muestra a su llegada al laboratorio, implica el cumplimiento de los criterios de calidad de la muestra, indicados en el Procedimiento de Microbiología Clínica SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología".

Estos criterios incluyen entre otros:

- Una correcta identificación de la muestra y del paciente
- El empleo de contenedores adecuados al tipo de muestra
- Unas condiciones adecuadas de transporte y conservación

Ante este tipo de muestras clínicas, muchas de ellas de difícil obtención y algunas de ellas únicas, en caso de no cumplirse los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, se consultará siempre con el clínico responsable de la solicitud, para solventar cualquier duda o problema pre-analítico. Si finalmente se indica el procesamiento de la muestra, se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados.



|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 5 de 8 |

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Reactivos necesarios para realizar tinción de Gram.
- Suero salino estéril o caldo BHI.
- Agua destilada estéril
- N-acetil cisteína o ditiotreitól
- Solución Ringer lactato o PBS

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Sonicador de baño de baja potencia (frecuencia, 40±2 kHz)
- Vórtex
- Tubos de fondo cónico de 50 ml
- Jarras de incubación o estufa de CO<sub>2</sub>
- Estufa de aerobiosis 35°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Centrífuga refrigerada
- Sistemas de anaerobiosis
- Recipientes de material plástico rígido estériles de diversos tamaños
- Pipetas Pasteur estériles
- Asas de cultivo calibradas
- Portaobjetos
- Micropipetas de 200 µL
- Puntas de pipeta 100 µL estériles
- Microscopio óptico
- Asas de siembra estériles desechables o asas de siembras
- Tubos de reacción de 1,5 ml tipo *sarstedt* o similar
- Placas de Petri estériles
- Bisturíes estériles
- Homogenizadores de muestra o morteros estériles

## 7. PROCEDIMIENTO

Las muestras se deben procesar en una cabina de seguridad biológica. El objeto de este procedimiento es sólo el procesamiento previo al cultivo de las muestras, para el cultivo de éstas, se recomienda consultar el apartado 3.4. del documento científico.

### 7. 1. MUESTRAS FLUIDAS (SEMILÍQUIDAS)

Cuando sea posible, las extensiones para las tinciones deberían realizarse antes de la homogeneización. Para la homogeneización y fluidificación de la muestra se debe añadir al envase en el que se remita la muestra (ha de ser estéril y de boca ancha) la solución de N-acetil cisteína o ditiotreitól (en las muestras respiratorias) o suero salino estéril. Anotar el volumen añadido. Agitar en *vórtex* o agitador similar hasta conseguir una fluidificación y homogeneización de la muestra.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 6 de 8 |

## 7.2. BIOPSIAS

Las extensiones para las tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el portaobjetos o bien a partir de la muestra homogeneizada. Según su tamaño, las muestras de biopsias se deben cortar en trozos en una placa de Petri estéril con un bisturí estéril. Los distintos fragmentos se deben homogeneizar en un homogeneizador tipo *stomacher* o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo BHI, antes de su siembra en los medios de cultivo. Ante la sospecha de infección por micobacterias, hay que emplear agua destilada estéril. En el caso de sospecha de infección por hongos filamentosos no se deben triturar las muestras, se debe cortar en pequeños fragmentos que se colocarán directamente en los medios de cultivo para hongos. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el homogenizado a los medios de cultivo.

## 7.3. PRÓTESIS, IMPLANTES RETIRADOS

Las extensiones para las tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el portaobjetos, hisopado de algunas zonas de la prótesis/implante o, si esto no es posible, a partir del líquido del sonicado. Para implantes grandes como prótesis mamarias, se añadirán 400 ml de solución Ringer lactato o PBS al recipiente que contiene el implante. Para implantes de menor tamaño, se añadirá un volumen suficiente para cubrirlos, nunca inferior a 50 ml. Antes y después de la sonicación (frecuencia 40 +/- 2 kHz, densidad de potencia 0,22 +/- 0,04 watts/cm<sup>2</sup>; 5 minutos) el contenedor con la muestra debe agitarse en vórtex durante 30 segundos. Tras centrifugar (5 minutos a 3000 xg), se inoculará 0,1 ml del sedimento en cada uno de los medios de cultivo. En el caso de no disponer de sonicador, se seguirá el mismo procedimiento realizando únicamente agitación en *vórtex*.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El informe microbiológico en una infección relacionada con la formación de biopelículas debería contener los resultados de la observación microscópica confrontados con los del cultivo y los estudios de sensibilidad. Aunque las tinciones de Gram se deben visualizar e informar lo más rápidamente posible, para el resultado final se deberán interpretar conjuntamente los hallazgos de las diferentes metodologías empleadas. Así, se pueden proporcionar informes preliminares (por ejemplo, de la tinción de Gram) y finales donde se cotejen con los resultados del cultivo y del (o de los) estudio(s) de sensibilidad.

### 8.1 TINCIÓN DE GRAM

Respecto a la observación microscópica, se debe visualizar la extensión o las extensiones completas, ya que la observación de microorganismos puede entrañar dificultades dependiendo del tipo de infección, la obtención de muestras representativas y la distribución no homogénea de los agregados bacterianos. Aun así, la tinción de Gram no deberá condicionar el procesamiento de la muestra, es decir, aunque no se observaran estructuras de biopelícula, ni siquiera microorganismos, se deberá realizar el cultivo con su procesamiento previo pertinente cuando proceda. Se valorará e informará la observación de leucocitos polimorfonucleares que indica la presencia de reacción inflamatoria. Si se detecta una biopelícula microbiana mediante microscopía, puede informarse utilizando términos descriptivos, por ejemplo, "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".

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 7 de 8 |

## 8.2 CULTIVOS

Este apartado no es objeto de este procedimiento y se comenta específicamente en el apartado 5.1.2. del documento científico.

## 9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de Microbiología. El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras. El personal técnico del laboratorio de Microbiología es responsable de los procedimientos microbiológicos de procesamiento previo de la muestra, tinciones y cultivo, así como del registro de resultados. El personal facultativo es responsable de la valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, comunicación telefónica de los resultados preliminares, validación y emisión de informes preliminares y definitivos, archivo de hojas de trabajo y de responder a las interconsultas.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas es complejo; debería ser multidisciplinar y requiere una comunicación estrecha y fluida entre el personal facultativo (clínicos y microbiólogos). Se recomienda insistir a los servicios médicos sobre la toma aséptica y múltiple de las muestras. El personal técnico y facultativo del laboratorio de Microbiología deberá recibir una formación específica respecto al diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- No existe un consenso específico sobre qué muestras tomar, la realización de tinciones y el procesamiento previo al cultivo en cada infección relacionada con la formación de biopelículas.
- La contaminación durante la extracción y procesamiento de las muestras es una importante limitación.
- Si el paciente recibe antibioterapia previa a la extracción de la muestra, los resultados pueden ser negativos.
- La sensibilidad de la tinción de Gram en estas muestras es baja.
- Resultados negativos tanto de las tinciones como de los cultivos no excluyen una infección relacionada con la formación de biopelículas.
- La interpretación de los resultados globales puede ser compleja.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Procesamiento previo al cultivo de las muestras en el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas | PNT-IRB-01    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 8 de 8 |

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Oates A, Bowling FL, Boulton ALM, Bowler PG, Metcalf DG, McBain AJ. The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *J Diabetes Res* 2014. 2014:153586
2. Del Pozo JL, Auba C. Role of biofilms in breast implant associated infections and capsular contracture. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 831: 53-67.
3. 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.
4. 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.



|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 1 de 6 |

## PNT-IRB-02

### Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de *Candida* spp. mediante placas multipocillo

| ELABORADO      |       | REVISADO Y APROBADO |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| Nombre / Firma | Fecha | Nombre / Firma      | Fecha |
|                |       |                     |       |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01      |       | Edición inicial               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 2 de 6 |

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este documento pretende definir la metodología para la realización de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos en biopelículas de los aislados clínicos de *Candida* spp. y otras levaduras causantes de micosis en placas multipocillo.

## 2. FUNDAMENTO

Los procedimientos de referencia para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos se basan en métodos de microdilución en caldo usando como inóculo una suspensión de las levaduras en estado planctónico. Los métodos comerciales o los de difusión en placa requieren de la misma forma de preparación del inóculo. Con estas técnicas, los aislados son clasificados como resistentes, sensibles, o intermedios (sensibles dosis dependientes) a un antifúngico concreto de acuerdo a puntos de corte especies específicos validados de acuerdo a parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD).

Las levaduras que están en forma de biopelícula no están en forma libre como células independientes y por tanto su comportamiento en este tipo de procedimientos de estudio de la sensibilidad antifúngica no tiene por qué ser equivalente a cuando se estudian en su estado planctónico. Por ese motivo, los aislados en forma de biopelícula son significativamente más resistentes a los antifúngicos que cuando están en estado planctónico. Desafortunadamente no se dispone de puntos de corte validados para poder clasificar a los aislados como resistentes o sensibles cuando estos están en forma de biopelícula, motivo por el cual el estudio de la sensibilidad a antifúngicos en estos casos se debe restringir al ámbito de la investigación y no establecerse como una determinación asistencial en este momento. De los diferentes modelos que se pueden desarrollar en el laboratorio para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos en levaduras formadoras de biopelículas, los estudios desarrollados en placas multipocillo son los más utilizados considerando la facilidad de su realización y la mayor evidencia científica con la que cuentan. En este documento se describe este método mencionado.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 11 “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. 2012. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clin Microbiol Infect 18:E246 –E247.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

## 4. MUESTRAS

Para los estudios aquí descritos se estudiarán los aislados levaduriformes en cultivo puro originarios de cultivos primarios de muestras clínicas. A partir de estos aislados, se formarán las biopelículas que se expondrán a diferentes concentraciones de antifúngicos para determinar su sensibilidad a los mismos.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 3 de 6 |

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Antifúngicos en forma de sustancia valorada
- Suero salino estéril
- Medio líquido RPMI 1640
- Ácido morfolinopropano sulfónico (MOPS)
- Agua destilada estéril
- XTT y menadiona
- Medio YPD
- Agar Sabouraud

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Placas de microtitulación
- Tapas para placas de microtitulación
- Balanza de precisión
- Agitador tipo *vórtex*
- Tubos de fondo cónico de 50 ml
- Estufa de aerobiosis 37°C
- Centrífuga refrigerada
- Lector de densidad óptica para placas de microtitulación
- Pipetas Pasteur estériles
- Micropipetas de 200 µL
- Micropipetas multicanal de 200 µL
- Micropipetas multicanal de 100 µL
- Puntas de pipeta 100 µL estériles
- Asas de siembra estériles desechables o asas de siembra
- Tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml
- Placas de Petri estériles
- Matraces Erlenmeyer
- Filtros Millipore (o equivalentes) de 0,22 micras
- Autoclave
- Controles de esterilización (cintas o tiras)

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS

#### **RPMI 1640 1L:**

- 34,53 gramos de MOPS
- 1 frasco de RPMI 1640 (10,4 g)
- 1 litro de H<sup>2</sup>O destilada estéril
- Ajustar pH a 7
- Filtrar la solución con filtros que aseguren esterilidad

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 4 de 6 |

**PBS 1L:**

- Introducir 10 pastillas de PBS en 1 litro de agua estéril / 2 Sobres de PBS en 1L de H<sub>2</sub>O.
- Autoclavar 10 minutos a 121°C
- Conservar en nevera

**YPD 1L:**

- Pesar 50 gr de YPD en polvo y diluir en 1 litro de agua estéril (20 g de glucosa + 10 g de extracto de levadura + 20 g peptona)
- Autoclavar 10 minutos a 121°C
- Conservar en nevera

**XTT:**

- Pesar 100 mg y diluir en 200 mL de solución Ringer lactato o PBS
- Filtrar la solución

**Menadiona: (cuidado con la manipulación, es tóxica)**

- Pesar 172 mg y diluir en 100 mL de acetona (solución stock: 10 mM)
- Alicuotar en tubos *sarsted* en volúmenes de 10, 20, 50 y 1000 µL
- Conservar a -70°C

**7.2. FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN PLACAS MULTIPOCILLO**

Se debe tener en cuenta que este protocolo requiere 4 días consecutivos para su realización.

**Día 1:** Subcultivo de cepas a medio sólido

**Día 2:** Incubación en YPD (18-24 horas)

**Día 3:** Formación de la biopelícula

**Día 4:** Exposición al antifúngico e incubación 24 h

**Día 5:** Revelado con XTT

**7.2.1. Subcultivar las cepas a estudiar en medio sólido agar Sabouraud.****7.2.2. Preparación del inóculo**

- Añadir 20 mL de YPD en un tubo e inocular el tubo con un asa bien cargada con el cultivo a estudio.
- Incubar 30°C en agitación a 165 rpm

**7.2.3. Ajuste de la solución y montaje de placas multipocillo**

- Centrifugar 5 minutos a 3.000 rcf y descartar el sobrenadante
- Añadir 20 mL de PBS. Vórtex vigoroso
- Centrifugar 5 minutos a 3.000 rcf y descartar el sobrenadante
- Añadir 10 mL de PBS. Vórtex vigoroso
- Centrifugar 5 minutos a 3.000 rcf y descartar el sobrenadante
- Añadir 5 mL de RPMI (37°C) (tubo madre). Vórtex vigoroso
  - o preparar tubos de cristal (tubo final) con 11 mL de RPMI e ir añadiendo (empezando por 20 µL) solución del tubo madre hasta ajustar a 10<sup>6</sup> céls/mL en el nefelómetro = 0,3 McFarland. NOTA.- La cantidad de RPMI en el tubo dependerá de la cantidad de antifúngicos a testar. Se calcula: 100 µL RPMI x 12 pocillos x n antifúngicos x n repeticiones



|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 5 de 6 |

- Del McFarland colocar 100 µL de cada muestra por triplicado para cada antifúngico
- Tapar las placas y sellar con parafilm
- Incubar 24 h en estufa a 37°C

#### 7.2.4. Lavado de placas multipocillo

- Sacar las placas de la estufa y aspirar el medio de RPMI de los pocillos (con cuidado de no arrastrar la biopelícula)
- Añadir 100 µL de PBS para lavar y aspirar (x 3 veces)
- Dejar las placas escurrir boca abajo hasta que estén completamente secos los pocillos

#### 7.2.5. Preparación del antifúngico

- Seguir esquema de microdilución de paneles del CLSI
- Una vez preparadas todas las concentraciones se dispensará en los paneles comenzando por la columna 12 en la que se añadirá solamente RPMI y avanzando a continuación a soluciones de mayor concentración hasta terminar en la columna 1 con la concentración mayor
- Tapar las placas y sellar con *parafilm*
- Incubar 24 h en estufa a 37°C

#### 7.2.6. Lavado de placas multipocillo

- Sacar las placas de la estufa y aspirar el medio de RPMI de los pocillos (con cuidado de no arrastrar la biopelícula)
- Añadir 100 µL de PBS y aspirar (x 3 veces)
- Dejar las placas escurrir boca abajo hasta que estén completamente secos los pocillos

#### 7.2.7. Lectura de la biopelícula por XTT

- Mezclar la menadiona con el XTT. (1µL de solución de menadiona por cada 10 ml de XTT)
- Añadir 100 µL a los pocillos. Cubrir las placas con la tapa y envolver en papel aluminio
- Incubar en estufa a 37°C unos 1,30 min
- Aspirar el medio (80 µL) y transferir a otra placa nueva
- Llevar al espectrofotómetro para lectura a 490 nm

## 8. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados individuales para cada antifúngico y cada aislado se reportan como concentración mínima de la biopelícula o CMI sénil. En ausencia de consenso, se cuenta con dos formas de calcular este parámetro. La CMI sénil SMIC<sub>50</sub> y SMIC<sub>80</sub> se definen como una reducción del 50% o 80%, respectivamente, en la actividad metabólica de la biopelícula tratada con antifúngicos comparado con el pocillo control libre de antifúngico. Una vez calculado este parámetro para cada cepa, la actividad para cada fármaco para un set de cepas se expresa como percentil 50 y 90 (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>), media geométrica de la CMI sénil y rangos de CMI sénil.

Desafortunadamente, no existen recomendaciones sobre cómo informar estos resultados en informes clínicos.

|   |   |               |               |
|---|---|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudios de sensibilidad a antifúngicos en biopelículas de <i>Candida</i> spp. mediante placas multipocillo | PNT-IRB-02    |               |
|   |   | Edición N° 01 | Página 6 de 6 |

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de los estudios de sensibilidad en biopelículas y de la lectura de los mismos. El facultativo será responsable de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados y de su interpretación.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas es complejo; debe ser multidisciplinar y requiere una comunicación estrecha y fluida entre clínicos y microbiólogos. El personal técnico y facultativo del laboratorio de Microbiología deberá recibir una formación específica respecto al diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas y respecto a los estudios de sensibilidad a los antifúngicos en biopelículas. Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como se ha comentado no existen estudios de PK/PD para determinar cuál es el punto de corte que permita establecer si una cepa formando biopelículas puede o no ser tratada con un antifúngico concreto.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Micafungin is more active against *C. albicans* biofilms with high metabolic activity. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:2984-7.
2. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Intern J Med Microbiol* 2014; 304: 1192-8.
3. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Peláez, Bouza E, Guinea J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity. *Med Mycol* 2016;54:155-61.

|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 1 de 6 |

## PNT-IRB-03

### Estudio de sensibilidad en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el dispositivo de Calgary modificado

| ELABORADO      |       | REVISADO Y APROBADO |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| Nombre / Firma | Fecha | Nombre / Firma      | Fecha |
|                |       |                     |       |

| EDICIÓN | FECHA | ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES |
|---------|-------|-------------------------------|
| 01      |       | Edición inicial               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |
|         |       |                               |

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 2 de 6 |

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización e interpretación de los estudios de sensibilidad en el sistema cerrado dispositivo de Calgary modificado a los antibióticos de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de las muestras de los pacientes con infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.

## 2. FUNDAMENTO

Los estudios clásicos de sensibilidad a los antimicrobianos, como la técnica de difusión en disco o los métodos de microdilución en caldo, que proporcionan la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizada para definir los puntos de corte de sensibilidad, sensible, intermedio y resistente (S, I y R) y los parámetros farmacodinámicos/farmacocinéticos (PK/PD), que predicen éxito terapéutico se realizan, aún hoy en día, con células en estado planctónico. Los microorganismos que forman parte de la biopelícula son significativamente más resistentes a los antimicrobianos que los que crecen planctónicamente, no se han establecido los puntos de corte correspondientes para estas formas de crecimiento, por lo tanto, en general, los resultados de las pruebas de sensibilidad clásicas no se deberían extrapolar para predecir el éxito terapéutico en las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, y no ofrecen directrices para los clínicos de cara al tratamiento de tales infecciones. En los últimos años, se han implementado y probado varios modelos de desarrollo de biopelículas *in vitro* en diferentes especies bacterianas o levaduras. Existen modelos cerrados y abiertos; los modelos cerrados tienen la ventaja de ser sencillos, factibles, reproducibles, de bajo coste económico y resistentes a la contaminación lo cual los hace fácilmente aplicables en la rutina del laboratorio de microbiología. En los últimos años, un modelo cerrado que se ha utilizado ampliamente en *Pseudomonas aeruginosa* (y en otros microorganismos) y para el que se han definido parámetros PK/PD de actividad de los antibióticos sobre las biopelículas es el dispositivo de Calgary modificado.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
2. Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 11 “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
3. 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; 42:1915-1922.

## 4. MUESTRAS

Las muestras de partida para la realización de los estudios de sensibilidad serán las colonias de *P. aeruginosa* aisladas en las placas de siembra de las muestras recogidas de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Si existieran diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* es probable que fuera necesario estudiar cada uno de los morfotipos de forma individual (un estudio de sensibilidad por cada morfotipo) dependiendo de cada infección en concreto y de la información clínica al respecto.



|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 3 de 6 |

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Antibióticos
- Suero salino estéril
- Agua destilada estéril
- Caldo Mueller-Hinton
- Caldo Luria-Bertani
- Agar Mueller-Hinton

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Placas de microtitulación (Nunc, Denmark),
- Tapas con púas/pinchos para placas de microtitulación (Nunc, Denmark)
- Balanza de precisión
- Agitador tipo *vortex*
- Tubos de fondo cónico de 50 ml
- Estufa de aerobiosis 37°C
- Centrífuga refrigerada con rotores tanto para tubos como para placas de microtitulación
- Lector de densidad óptica para placas de microtitulación
- Pipetas Pasteur estériles
- Micropipetas de 200 µL
- Micropipetas multicanal de 200 µL
- Micropipetas multicanal de 100 µL
- Puntas de pipeta 100 µL estériles
- Asas de siembra estériles desechables o asas de siembras
- Tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml
- Placas de Petri estériles
- Matraces Erlenmeyer
- Autoclave
- Controles de esterilización (cintas o tiras)

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS BACTERIANOS

Coger una colonia de la placa de cultivo de 18 a 24 horas e inocularla en 5 ml de un medio líquido (por ejemplo Luria-Bertani) e incubar en la estufa a 37°C en agitación *overnight*. Al día siguiente se realiza una dilución del cultivo en fase estacionaria en caldo Mueller-Hinton hasta una conseguir una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml.

### 7.2. FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

Se inoculan las placas de microtitulación mediante una pipeta multicanal con la suspensión bacteriana preparada previamente, se sumergen las proyecciones (o pinchos) de las tapas y en contacto con la suspensión bacteriana, durante la incubación, a 37°C durante 24 h, estática, se formarán las biopelículas. Se reservará una columna (suele ser la número 11) solo con caldo Mueller-Hinton para controles negativos.

|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 4 de 6 |

### 7.3. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE MICROTITULACIÓN CON ANTIBIÓTICOS

Las recomendaciones respecto al procedimiento de preparación de las soluciones madre de antibióticos están recogidas en el procedimiento de la SEIMC n° 11 “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”. No existen recomendaciones de cara a elección de los antibióticos a ensayar en las biopelículas, pero en el caso de *P. aeruginosa*, parece recomendable estudiar los antipseudomónicos más frecuentemente utilizados en los estudios convencionales, como por ejemplo: ceftazidima, cefepima, aztreonam, ciprofloxacino, tobramicina, gentamicina, amikacina, imipenem, meropenem, colistina, fosfomicina, azitromicina, etc. Como las placas tienen 96 pocillos (12x8), se podrían seleccionar 8 antibióticos en función, principalmente, del tipo de infección u otras informaciones (por ejemplo, sensibilidad o resistencia de aislados previos). Las diluciones del antimicrobiano se prepararán en progresión geométrica en base 2 utilizando Mueller-Hinton caldo. Para el mismo microorganismo se pueden estudiar 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. El volumen final de cada pocillo es de 100 µl, La primera columna se rellena con 200 µl de la solución más alta de antimicrobiano. Las columnas de 2 a 11 se rellenan con un volumen de 100 µl de caldo sin antimicrobiano y así se realiza la dilución en la forma habitual empleando la pipeta multicanal de 100 µl, desechando los últimos 100 µl y dejando así los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano)- y de la columna 11 como negativos.

### 7.4. REALIZACIÓN DEL ESTUDIO DE SENSIBILIDAD Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA BIOPELÍCULA

Las tapas con las proyecciones o pinchos en las que previamente se formaron las biopelículas (ver 7.2.) se lavan con solución salina (3 lavados, con el fin de despegar las células que no estén formando la biopelícula) y posteriormente se sumergen en las placas multipocillo preparadas con las diluciones de los antibióticos. Se incuban unas 18-20 horas a 37°C de manera estática. Tras la exposición a los antibióticos, las tapas de púas se aclaran de nuevo, y se sumergen en un medio sin antibióticos en una placa de microtitulación de fondo plano (placa de recuperación de biopelícula). Las biopelículas se transfieren al medio con una centrifugación ligera (por ejemplo, 805 G, 20 min) o 5 minutos de sonicación a temperatura ambiente. Se mide la densidad óptica (DO) a 650 nm antes y después de una incubación a 37°C durante 6 h. El control positivo de crecimiento adecuado de la biopelícula se define como una diferencia (DO a 650 nm a las 6 horas menos DO a 650 nm a las 0 horas) media de la DO a 650 nm  $\geq 0,05$ . La concentración mínima inhibitoria sobre la biopelícula (CMIB) se define como las concentraciones más bajas de antibiótico que dan lugar a una diferencia de DO a 650 nm  $\leq 10\%$  de la media de dos lecturas de pocillos de control positivo. El punto de corte del 10% representa una diferencia de 1 log en el crecimiento tras 6 horas de incubación.

### 7.5. MODIFICACIONES DEL PROCEDIMIENTO

#### 7.5.1. Determinación de la concentración de prevención de biopelícula

Este parámetro se describe en el apartado 4.3. del documento científico. En la práctica, la determinación de la concentración de prevención de biopelícula (CPB) consiste en incubar las tapas con el inóculo planctónico en el momento de exposición a diferentes concentraciones de antibióticos. Se deberían ajustar los volúmenes finales de las placas preparadas con antibióticos a 50 µl y tener en cuenta que las concentraciones deben ser el doble de las finales ya que se añadirán 50 µl de las suspensiones bacterianas. Para el resto del procedimiento se pueden seguir las instrucciones descritas en el punto 7.4.

|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 5 de 6 |

## 7.5.2. Determinación del número de viables y mutantes persistentes

### 7.5.2.1. Preparación de las placas con y sin antibióticos

Las placas con medio de Mueller-Hinton se prepararán según se ha descrito anteriormente en el apartado C.3.2.1. del procedimiento de la SEIMC n° 11 “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”.

### 7.5.2.2. Realización del ensayo y determinación de la concentración bactericida de la biopelícula

Al final de los experimentos, se realiza una siembra de diluciones seriadas (1/10) de las biopelículas transferidas en medios de cultivo con y sin antibióticos en distintas concentraciones. Este procedimiento permite la determinación de la concentración bactericida de la biopelícula (CBB) definida como la concentración más baja de antibiótico que elimina el 99.9% de las células recuperadas de un cultivo de biopelícula en comparación con el crecimiento control. Además, mediante este ensayo también se pueden determinar los mutantes resistentes a los antibióticos en la biopelícula y posteriormente, estudiar sus mecanismos de resistencia. Los fines de este ensayo están más encaminados a la investigación que a la rutina asistencial.

## 8. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

El informe microbiológico en una infección relacionada con la formación de biopelículas debería contener los resultados de la observación microscópica confrontados con los del cultivo y los estudios de sensibilidad. 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. Sin embargo, la realización rutinaria de estos ensayos podría proporcionar información útil y contribuir a la estandarización de los métodos. Se deberían registrar parámetros como la CMIB para los distintos antibióticos y microorganismos. Hasta que los puntos de corte (S, sensible; I, intermedio y R, resistente) de los antibióticos no estén definidos para las biopelículas por agencias oficiales (CLSI, EUCAST, MENSURA) no es viable informarlos. Se podría informar la CMIB pero debería ir acompañada de una interpretación de lo que podría significar realmente en la práctica. En la actualidad, al no contar con normas consensuadas para la realización sistemática de estos estudios ni para el diagnóstico microbiológico general de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, en el informe de resultados debería figurar una llamada del tipo: “Para información adicional o asesoramiento en materia de tratamiento póngase en contacto con el laboratorio de microbiología clínica”.

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de los estudios de sensibilidad en biopelículas y de la lectura de los mismos. El facultativo será responsable de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos, y de responder a las interconsultas.

|   |  |               |               |
|---|--|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Estudio de sensibilidad en biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mediante el dispositivo de Calgary modificado | PNT-IRB-03    |               |
|   |  | Edición N° 01 | Página 6 de 6 |

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas es complejo; debería ser multidisciplinar y requiere una comunicación estrecha y fluida entre el personal facultativo (clínicos y microbiólogos). El personal técnico y facultativo del laboratorio de Microbiología deberá recibir una formación específica respecto al diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas y respecto a los estudios de sensibilidad a los antibióticos en biopelículas. Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No existe un consenso respecto a la realización sistemática de estudios de sensibilidad sobre biopelículas, ni recomendaciones sobre cómo informar los resultados que de estos se derivan ya que no hay puntos de corte definidos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. Clin Microbiol Infect. 2014; 20:981-90.
2. 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.
3. Mulet X, Macia MD, Mena A, Juan C, Perez JL, Oliver A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:1552-60.