



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL

“DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE TINCIÓN

HISTOLÓGICA PARA LA DEMOSTRACIÓN DE BIOPELÍCULAS

BACTERIANAS EN HERIDAS CRÓNICAS Y EN SUS CULTIVOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

DERMATOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA ABRIL MARTÍNEZ VELASCO

TUTOR:

DR. JOSÉ CONTRERAS RUÍZ

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

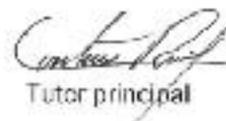
Este trabajo fue realizado en la Secretaría de Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea González; División de Dermatología, por la Dra. María Abril Martínez Velasco con la dirección y supervisión del Dr. José Contreras Ruíz y el Dr. Rigoberto Hernández Castro.

Este trabajo de Tesis con No. PROT 06-52-2013 presentado por el alumno María Abri Martínez Velasco se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. José Contreras Ruiz, y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del 28 de julio del 2013 para su impresión final.



Dirección de Enseñanza e Investigación

Dr. Octavio Sierra Martínez



Tutor principal

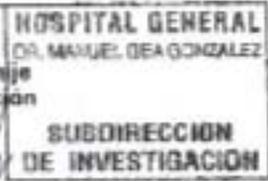
Dr. José Contreras Ruiz

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza

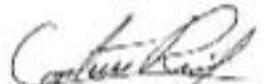


Dra. María Elisa Vega Menjíe
Subdirectora de Investigación



Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología




Dr. José Contreras Ruiz
Asesor de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A mi Gonzalo y a María Sofía por ser la luz de mi vida.

A mi mama por siempre estar ahí y enseñarme que no importan las circunstancias si no la actitud que decides tomar ante la vida.

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE TINCIÓN HISTOLÓGICA PARA LA
DEMOSTRACIÓN DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN HERIDAS CRÓNICAS Y EN SUS
CULTIVOS

Colaboradores:

Dra. María Abril Martínez Valesco



Dr. José Contreras Ruiz



Dr. Rigoberto Hernández Castro



Dra. Sonia Toussaint Ceire



Dra. Adriana Irazo Platonoff



Dra. Ana María Cano



Dra. Melissa Desiree Florida Mejía Mendoza



INDICE

Glosario	IV
Relación de figuras y tablas	V
Resumen	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Generalidades.....	
2.2. Etc.....	
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos.....	15
5.1. Objetivo General.....	15
5.2. Objetivos Particulares	15
6. Material y Métodos	16
6.1. Tipo de estudio	
6.2. Ubicación temporal y espacial	
6.3. Criterios de selección de la muestra	
6.4. Variables	
6.5. Tamaño de la muestra	
6.6. Procedimiento	
6.7. Análisis estadístico	
6.8. Descripción operativa del estudio	
7. Resultados.....	24
8. Discusión	33
9. Conclusiones	36
10. Perspectivas	37
11. Bibliografía.....	38
12. Anexos.....	45
12.1. Anexo No. 1	45

GLOSARIO

E. coli: Escherichia coli

A. baumannii: Acinetobacter Baumannii

P. aeruginosa: Pseudomonas Aeruginosa

S. aureus: Staphilococcus aureus

DO630 nm: Espectrofotometría a 630 nm

PAS: Acido Peryódico de Shift

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Formación de la biopelícula.

Figura 2. Microscopía electrónica de biopelícula sobre ulcera venosa

Figura 3. Imagen de tinción Gram, mostrando bacterias embebidas en la biopelícula.

Figura 4. Imagen de biopelícula teñida con cristal violeta, las flechas señalan la presencia de bacilos embebidos en la biopelícula.

Figura 5. Imagen de biopelícula teñida con Acido peryódico de Shift.

Figura 6. Imagen de biopelícula teñida con Azul Alciano

Figura 7. Imagen de biopelícula teñida con Rojo Congo

Figura 8. Colonias bacterianas productoras de biopelícula, el color negro indica la presencia de la biopelícula en distintas intensidades.

Figura 9. Cultivo de cepas productoras de biopelícula, obsérvese los pozos 4, 5 y 6 que evidencian la producción de biopelícula antes de ser teñida con cristal violeta

Figura 10. Alta producción de biopelícula correspondientes a *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes

Tabla 2. Características de las Bacterias productoras de biopelículas

Gráfica 1. Producción individual de biopelícula por espectrofotometría a 630 nm

RESUMEN

Las heridas crónicas representan un problema de salud pública que genera importantes costos en las instituciones de salud. Recientemente se ha identificado que un factor importante en la mala evolución de las heridas crónicas es la presencia de la biopelícula bacteriana.

Objetivo: Identificar la presencia de la biopelícula bacteriana por medio de tinciones histológicas para carbohidratos en heridas crónicas de difícil manejo. Además de evaluar la producción individual de biopelícula de las especies bacterianas aisladas en estas heridas.

Material y métodos: Se reclutaron 20 pacientes a los que se les realizó una biopsia del lecho de la herida. Estas biopsias fueron analizadas mediante microscopía electrónica y microscopía de luz, las biopsias fueron teñidas con cristal violeta, azul alciano, ácido periódico de Schiff y Rojo Congo. Se tomaron cultivos y a las bacterias aisladas se les realizó la prueba fenotípica de crecimiento en agar rojo Congo y el ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos.

Resultados: En los 20 pacientes se identificó la biopelícula bacteriana mediante microscopía electrónica, con cristal violeta se identificaron 17 de 20 casos, con una sensibilidad del 85%. Del total de los cultivos se aislaron 30 especies bacterianas, el 50% de los cultivos eran polimicrobianos. El método de identificación fenotípica de productores de biopelícula de rojo Congo mostró una correlación positiva con la producción de biopelícula con una $P=0.005$, así mismo la cantidad de biopelícula medida por espectrofotometría mostró una relación directamente proporcional con la mala evolución de los pacientes, con una $P=0.003$.

Conclusiones: En este estudio se demostró la utilidad de 4 métodos diferentes para demostrar la presencia de biopelícula en heridas crónicas, dos métodos directos y dos métodos indirectos. La combinación de las pruebas proporcionó información a nivel celular, microbiológico y clínico. Logrando establecer una relación con el pronóstico de los pacientes.

ABSTRACT

Chronic wounds represent a public health problem, which cause significant costs in health institutions. The presence of bacterial biofilm has recently been identified as a major factor in the poor outcome of chronic wounds.

Objective: Identify the presence of bacterial biofilm using histological stains for carbohydrates in chronic wounds. Evaluate individual biofilm production of the bacterial species isolated in these wounds.

Methods: We recruited 20 patients who underwent a biopsy of the wound bed. These biopsies were analyzed by electron microscopy and light microscopy biopsies were stained with crystal violet, Alcian blue, peryodic acid of Shift and Congo Red. Cultures were taken and the bacteria isolated underwent phenotypic testing of Congo red agar and quantitative biofilm Biofilm production assay in 96-well microplate (spectrophotometry).

Results: Electron microscopy identified the bacterial biofilm in the 20 patients, crystal violet identified 17 of 20 cases, with a sensitivity of 85%. A total of 30 bacterial species were isolated, 50% of the cultures were polymicrobial. The Congo red agar test, showed a positive correlation with biofilm production with a $P = 0.005$, also the amount of biofilm measured by spectrophotometry showed a direct relationship with patients poor outcome with a $P = 0.003$

Conclusions: This study demonstrated the utility of four different methods to demonstrate the presence of biofilm in chronic wounds two direct methods and two indirect methods. The combination of tests provided information to the cellular level and clinical microbiology. Establishing a relationship with the prognosis of patients.

1.INTRODUCCION

Las infecciones cutáneas, incluyendo las de quemaduras, infecciones del sitio quirúrgico y úlceras en pie diabético, son una importante causa de mortalidad y de acuerdo a cifras de los Estados Unidos, generan costos muy altos en el sistema de salud Costerton JW1995), (Geesey GG1977), (Gottz F.2002), (Mack D1999), (Sauer K 2002), (Nickel JC1994), (Singh PK 2000). En países en desarrollo, la mortalidad y los costos son aún mayores (Marrie TJ 1994) . Los individuos con diabetes son particularmente vulnerables, en Estados Unidos hay aproximadamente 23.6 millones de diabéticos (7.8% de la población), aproximadamente el 15% desarrollara pie diabético durante el transcurso de su enfermedad y de esos del 14 al 24% requerirá amputación (Mack D1999,), (Presterl E 2005,) (Davis SC 2001,) .

2. ANTECEDENTES

En nuestro país, las úlceras crónicas en especial de pie diabético crónicamente infectadas son un problema creciente en el sistema de salud y en el cuidado de las heridas, desconociéndose aun el costo exacto. Además de los pacientes diabéticos, hay otros grupos de pacientes con úlceras crónicas, entre ellos pacientes quemados y pacientes con úlceras por presión.

Una herida crónica se define como una herida que no ha seguido el proceso ordenado y en tiempo para producir integridad anatómica y funcional. Se sabe que la mayoría de las heridas crónicas se generan porque la fase inflamatoria se prolonga y afecta la fase proliferativa. En ello están involucrados diversos factores algunos de tipo local bien descritos, como el aumento de metaloproteinasas que degradan de manera continua la matriz o la existencia de carga bacteriana que puede formar biopelículas. También se sabe que la presencia de tejido necrótico o de cuerpos extraños genera, un estímulo inflamatorio constante que facilita que las heridas se infecten o se reinfecten. Se observa una disminución de la actividad de los fibroblastos, a los cuales se les denomina fibroblastos senescentes los cuales ya no son capaces de sintetizar matriz, ni de proliferar en la tasa necesaria para la reparación de una lesión. Durante el proceso de cicatrización se forma el tejido de granulación el cual consiste en abundante tejido conectivo y múltiples vasos sanguíneos, el cual es apto para cubrir una herida y posteriormente facilitar la reepitelización y el cierre de la esta. Cuando el proceso de cicatrización de una herida se hace crónico, también se cronifican las señales intra y extracelulares de proliferación fibroblástica y migración de células epiteliales, lo cual produce fibroplasia y aumento de la angiogénesis, esto recibe el nombre de tejido de

hipergranulación. Clínicamente este tejido se observa como un tejido rojo claro o rosa oscuro, exuberante, con aspecto en empedrado, friable y de fácil sangrado , el cual el paciente refiere como extremadamente doloroso. (*Contreras-RuizJ2012)

En resumen un ambiente hostil y el desorden generalizado en el proceso de cicatrización son los principales responsables de la persistencia de una herida crónica.

Debe tenerse en cuenta que cualquier herida independientemente de su origen es susceptible de infectarse ya que se genera una pérdida de continuidad en el estrato corneo, el riesgo de infección varía con la extensión, profundidad, tipo de herida, y las condiciones generales del hospedero. En el desarrollo de la infección de una herida existen 3 factores fundamentales: la resistencia del hospedero, la carga bacteriana y la virulencia de los microorganismos. La resistencia del hospedero se refiere a la capacidad del organismo para combatir a los microorganismos. La carga bacteriana es importante, ya que la infección ocurre en el momento en que el número de microorganismos excede la capacidad de las defensas tisulares locales para manejarlos y finalmente la virulencia de un microorganismo es tan importante como la cantidad, ya que esta le brinda a ciertas bacterias la capacidad producir infecciones más agresivas, por ejemplo, en algunos grupos bacterianos la virulencia les permite sintetizar ciertas enzimas o toxinas que destruyen los tejidos de forma acelerada, así mismo existen otras bacterias que cuando están presentes aunque sea en números pequeños pueden generar lesiones graves.

El proceso que existe desde la contaminación hasta la infección de la herida es un fenómeno dinámico, se habla de contaminación cuando al haber una pérdida

de la solución de continuidad de la piel, las bacterias que se encuentran más próximas aprovechan la situación e ingresan al organismo, estas bacterias suelen ser comensales de la piel, que en condiciones normales el sistema inmune del organismo es capaz de autolimitar, sin embargo cuando esto no ocurre, el siguiente paso en este proceso hacia la infección es la colonización.

En la colonización puede ocurrir que el inóculo bacteriano sea mayor o la resistencia del hospedero este disminuida, tras lo cual las bacterias pueden multiplicarse con mayor eficiencia y producir factores que les ayudan a defenderse de manera más eficiente del sistema inmune, además de sintetizar factores de adherencia que les permiten agruparse y proliferar en la superficie de la herida, completando así el proceso de colonización. Sin embargo, en las heridas colonizadas, el hospedero mantiene el control y las heridas suelen cicatrizar sin problemas.

Se habla de colonización crítica cuando la carga bacteriana, la virulencia de las bacterias o una combinación de ambos factores igualan fuerzas con un hospedero debilitado, tras lo cual, el primer signo indicativo de que existe colonización crítica (también llamada infección superficial) es que las heridas cesan su proceso de cicatrización. En esta fase la herida no muestra los datos cardinales de inflamación pero puede acompañarse de áreas nuevas de necrosis, aumento del exudado, fetidez y mala evolución.

Finalmente si este proceso de infección superficial continua y las bacterias invaden las capas más profundas del lecho de la herida, se presenta lo que se conoce como una infección profunda, esta fase suele acompañarse de los signos y síntomas frecuentes de infección, como eritema perilesional, edema, aumento de

volumen, dolor y pérdida de la función, en algunos casos puede incluso observarse necrosis y síntomas sistémicos. (*Contreras-RuizJ2012,)

En la naturaleza, las bacterias pueden encontrarse en distintas formas , la forma en las que tradicionalmente crecen en cultivo que es la planctónica (flotando libres), como microcolonias, en forma de dispersión y como biopelículas que es la forma en la que se adhieren y colonizan superficies. La importancia de esto radica en que, ya esta bien establecido que estos fenotipos bacterianos no solo difieren en estructura, sino también en fisiología, procesos bioquímicos y su biología molecular. (Sauer K 2002,)

Las biopelículas son organizaciones microbianas (que pueden formarse por bacterias, hongos, e incluso protozoos o combinaciones de los mismos) que se adhieren a una superficie biológica o no biológica y se encuentran embebidas en una matriz extracelular, que es un exopolímero compuesto que forma un glicocálix (75%), el cual es producido por ellas mismas.

El desarrollo del biopelícula es dinámico. Inicia con la adherencia reversible e irreversible de las bacterias a una superficie, seguido de la formación de una micro colonia. Las bacterias que se encuentran en ese microambiente inician una comunicación de célula a célula con la consiguiente formación de una sustancia extracelular polimérica, estableciendo así una biopelícula. Esta sustancia esta principalmente constituida por polisacáridos, aunque también contiene ácidos nucleicos, proteínas y detritos celulares (Castrillón-Rivera LE2010). Las microcolonias iniciales ya embebidas en la matriz de polisacarido, continúan

creciendo hasta que la biopelícula alcanza un equilibrio estructural, convirtiéndose en una biopelícula madura. En un ambiente apropiado los microorganismos se comunican unos con otros, a esto es lo que se ha denominado “quórum sensing”, esto permite que ocurra la transferencia de genes, incluyendo la transformación, la transducción y la conjugación, que son la forma en la que las bacterias comparten factores de virulencia, se reproducen y perpetúan su supervivencia. (Mack D1999) Una vez que las colonias de bacterias han formado un biopelícula, las bacterias pueden separarse individualmente a través de un proceso llamado dispersión, mediante el cual éstas pueden viajar y depositarse en nuevos nichos de colonización manteniendo las mismas características de una biopelícula adherida a una superficie. (Gottz F.2002), (Mack D1999) (Figura 1)

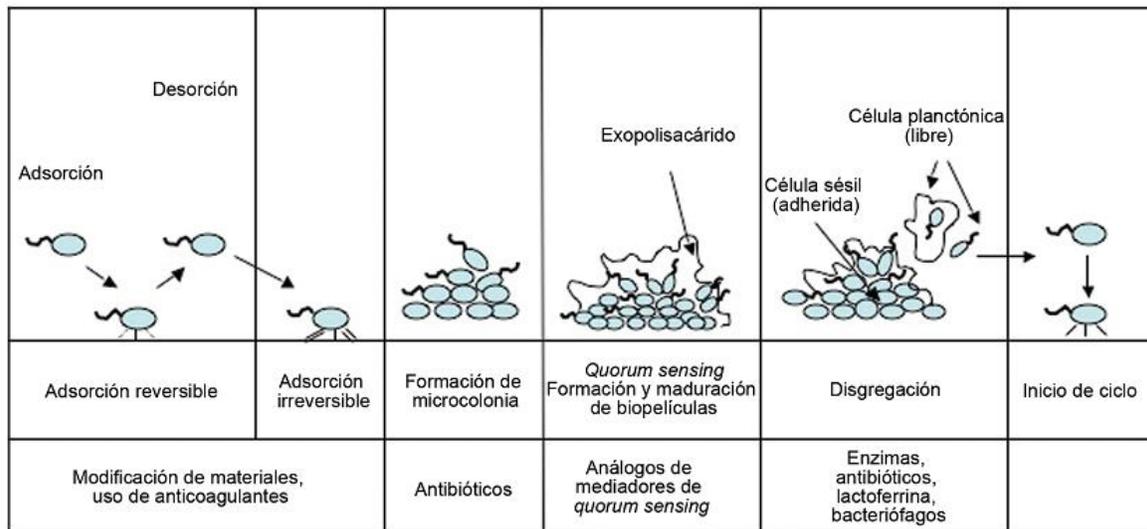


Figura 1. Formación de la biopelícula. La formación de biopelículas ocurre como una serie de eventos secuenciales que dependen de la interacción de microorganismos sobre superficies inertes o vivas, venciendo las fuerzas de repulsión hasta lograr la adsorción irreversible seguida de la formación de una microcolonia. Al alcanzar una densidad de población determinada, se induce la síntesis de metabolitos secundarios (quorumsensing) que produce la formación de un exopolisacárido hasta lograr la maduración de la biopelícula. La disgregación permite la formación

de una nueva colonia o su eliminación. Se muestran las opciones de tratamiento según la fase de desarrollo de la biopelícula .(Castrillón-Rivera LE2010)

La heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a las defensas del hospedero y a los agentes antimicrobianos, así como su capacidad de comunicación intercelular, convierte a las biopelículas en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen. Mientras que los microorganismos aislados son susceptibles a estos factores de control, las colonias organizadas e incluidas en el exopolímero forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados. Los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos no tienen acceso a los microorganismos más profundos; además estos se encuentran en un estado metabólico reducido lo que los hace menos susceptibles a la acción de estos últimos. (Hendricks KJ2001,)

Por otra parte se ha visto que en la biopelícula coexisten distintos tipos de bacterias, los cuales establecen entre ellas una sinergia bacteriana, la cual se define como una interacción cooperativa entre dos o más especies de bacterias, produciendo un resultado que no se lograría por una sola especie. (Bjornson HS1982,) En el contexto de una infección, el resultado de esta sinergia es frecuentemente un aumento en la virulencia, lo cual se ha observado en las infecciones polimicrobianas tanto en animales como en humanos (Mastro Paolo MD2005,) (Hendricks KJ2001,)

El papel de las biopelículas bacterianas en medicina es aún algo no muy bien entendido. Las biopelículas bacterianas juegan un rol importante en la patogénesis de las caries dentales, infecciones del tracto urinario, bronquitis crónica en la fibrosis quística, colonización de instrumental médico, endocarditis y heridas crónicas. (Nickel JC1994), (Singh PK2000) (Presterl E2005,)

La importancia reciente de las biopelículas como fuente de infecciones se refleja en las estadísticas, ya que para el año 2008 se reportaron en Estados Unidos 99,000 muertes y 1.7 millones de procesos infecciosos asociados a la formación de biopelículas, así mismo en la Comunidad Europea se reportaron 50,000 muertes anuales y 3 millones de pacientes afectados, encontrándose en primer lugar infecciones en las vías urinarias (32%), seguidas de neumonías (15%), septicemias (14%) e infecciones de otros sitios (22%). En México aún no existen reportes que permitan establecer el número exacto de infecciones asociadas a biopelículas, sin embargo ya se ha demostrado su participación importante en infecciones nosocomiales, derivadas de catéteres. (Castrillón-Rivera LE2010)

Aunque las biopelículas han sido implicadas en las heridas crónicas, hay muy poca información que describa su papel en la de este tipo de infección. Aun no existen un criterio estricto ni definitivo para establecer una enfermedad asociada a una biopelícula, por este motivo ha sido difícil el trasladar la investigación in vitro de las biopelículas a la práctica clínica de las heridas infectadas.

Recientemente (James GA 2008) se han propuesto algunos criterios que pueden ayudar a establecer cuando se está ante una infección causada por una

biopelícula; a) Las bacterias infectantes están adheridas a un substrato o están adheridas a una superficie, b) La examinación directa del tejido infectado muestra conglomerados o microcolonias de bacterias, embebidas en una matriz extracelular, c) La infección está confinada a un solo lugar, aunque pueda haber diseminación, este es considerado un fenómeno secundario, d) La infección es difícil o imposible de erradicar con antibióticos a pesar de que los microorganismos responsables sean susceptibles en sus formas planctónicas. Este último criterio sería una de las razones por las que erradicar la infección de una herida crónica es tan difícil.

La mayoría de la investigación de las biopelículas patogénicas y no patogénicas en la piel es *in vitro*, aunque esto tiene sus ventajas incluyendo bajos costos y control en el número de bacterias no considera otros factores como los fluidos producidos por la herida, factores de crecimiento, proteasas y péptidos antimicrobianos. Una vez entendido esto se debe dejar de considerar a las bacterias como entes individuales, causando infecciones unicelulares, más bien deben ser entendidas como estructuras multicelulares con una organización tisular.

Previamente las enfermedades de base asociadas a las heridas crónicas, como la insuficiencia venosa, diabetes o la patología subyacente a una úlcera por presión, habían sido consideradas como la única explicación de una herida crónica o de difícil cicatrización, por esta razón la prioridad en el manejo de estos pacientes era manejar la perfusión, el control de la glucosa, mejorar la nutrición o evitar la presión repetitiva sobre la herida. Sin embargo en muchos casos a pesar de la

modificación de estos factores las heridas siguen avanzando hacia la cronicidad. La formación del biopelícula ha sido identificada en publicaciones recientes como una posible explicación para la cronicidad de las heridas (Jensen PO 2006,) (James GA 2008,) (Davis SC 2008,) (Percival S 2008,) (Davies D 2003,) (Bjarnsholt T 2008,) (Fux CA 2005,) (Allesen-Holm M 2005,) (Klausen M 2003,) (Wolcott RD 2008,) (Donlan RM 2002,) (Costerton JW 1999,) (Widgerow AD 2008,)

Ya se ha visto que la biopelícula interviene directamente rompiendo el equilibrio en el proceso de cicatrización. Existen reportes de casos donde se han elegido heridas con diversas patologías de base, todas resistentes a tratamiento tradicional y con sospecha de la presencia de biopelícula, las cuales han sido tratadas con terapia específicamente dirigida a destruir el biopelícula, obteniéndose resultados muy prometedores. (Smart H2010,)

Como ya habíamos explicado, en las heridas agudas, las bacterias son rápidamente destruidas o inactivadas por el sistema inmune humoral y celular. Así mismo en estas heridas las bacterias son fácilmente identificadas y cultivadas. En las heridas crónicas las bacterias presentan otro fenotipo, se encuentran adheridas a la superficie de la herida por medio de la matriz extracelular, donde se multiplican y desarrollan factores de resistencia y crean un desequilibrio en el proceso normal de cicatrización, haciendo que la herida se estanque y eventualmente empeore. Por lo que al entender el comportamiento de las biopelículas en las heridas crónicas e intervenir a este nivel, permitiría a la herida regresar al proceso normal de cicatrización.

El aislamiento de un biopelícula en la superficie de una herida crónica no es algo sencillo, ni barato. El método definitivo de diagnóstico es con microscopia electrónica, la cual es poco práctica y su precio es excesivo para usarse en la práctica clínica cotidiana. (Akiyama H2002)

In vitro, se ha utilizado otros métodos para valorar la presencia de biopelículas como el blanco de calcofluor que tiñe los polisacáridos. (. Donlan R 2002)) Otros ensayos que se han utilizado in vitro son cristal violeta (Moter 2000) (Crémet L2013), resazurina y una prueba patentada llamada "Biofilm ring test". Nuevas pruebas de DNA (FISH) (Malic S2009) se han tratado de desarrollar, sin embargo, los costos hacen que esto sea poco útil en la práctica clínica

In vivo, sin embargo, ninguno de estos análisis ha trascendido a la práctica clínica diaria, y no se han explorado otros métodos más sencillos y baratos como tinciones específicas para los componentes de la matriz de la biopelícula como carbohidratos, entre las que se encuentran el Acido Peryodico de Shift, el Rojo congo, el lugol, el cristal violeta y el mucicarmin

El reconocimiento de la biopelícula bacteriana en las heridas crónicas puede darnos la oportunidad de entender otros aspectos del comportamiento de las heridas crónicas. La presencia de las biopelículas podría explicar porque muchas heridas crónicas, no sanan a pesar de distintos tratamientos, incluyendo la corrección de la condición de base. En un futuro el tener herramientas accesibles para estudiarlo podría guiar al desarrollo de nuevas terapias.(Bjarnsholt et al. 2008)

Es por eso que en el presente estudio se tratan de valorar otros métodos mucho más accesibles y sencillos para valorar la presencia del biopelícula mediante el uso de una simple biopsia del lecho de la herida y tinciones especiales para correlacionarlo con el estándar de oro que es la microscopía electrónica. El presente estudio servirá para poder incluso inventar y patentar un método diagnóstico (por ejemplo tiras reactivas o hisopos con indicadores) que permitan determinar en un tiempo corto y de manera barata si existe o no biopelícula en la superficie de la herida (o bien, en catéteres, en prótesis, etc.)

3. JUSTIFICACION

No existe aún un método fácil y rápido para diagnosticar biopelículas en las heridas crónicas. Un método de estas características sería un excelente adyuvante en la práctica clínica diaria de quienes se dedican al manejo de heridas infectadas u otras infecciones asociadas a las biopelículas.

4. HIPOTESIS

Si las tinciones para carbohidratos son útiles para visualizar la biopelícula en las heridas crónicas, entonces mostrarán al menos la misma positividad en comparación con la microscopía electrónica.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar cuáles tinciones para carbohidratos son útiles para visualizar biopelículas en heridas crónicas.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

Comparar la utilidad para detectar biopelículas de diversas tinciones para carbohidratos con el estándar de oro (microscopía electrónica).

Determinar la producción individual de la biopelícula de las bacterias aisladas del lecho de la herida y correlacionarla con la evolución del paciente.

Probar distintos métodos de identificación de biopelícula en heridas crónicas.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio

Estudio observacional, transversal, comparativo, abierto y de pruebas de detección

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas. División de Dermatología.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión.

Pacientes con heridas crónicas de cualquier etiología que tengan más de 6 meses de evolución.

Pacientes con heridas crónicas que hayan requerido antibiótico por vía sistémica en mínimo 3 ocasiones en el transcurso de esos 6 meses o más.

Criterios de exclusión.

Pacientes cuya herida sea a causa de neoplasia maligna activa.

Pacientes que se encuentren recibiendo antimicrobianos por vía tópica o sistémica

Pacientes que hayan recibido antimicrobianos por vía tópica o sistémica 15 días previos.

Heridas menores a 1 cm de diámetro mayor.

Criterios de eliminación.

Pacientes cuya biopsia no contenga material suficiente para realizar los cortes y tinciones necesarias

6.4. Variables

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Método de evaluación de la biopelícula (categórica politómica)	Microscopia electrónica = 1	Presencia de biofilm por microscopia electrónica (Categórica dicotómica)	Presente o ausente
	Acido peryodico de Shift = 2	Presencia de biofilm por tinción con PAS (Categórica dicotómica)	Presente o ausente
	Gram = 3	Presencia de biofilm por tinción de Gram (Categórica dicotómica)	Presente o ausente

	Cristal Violeta = 4	Presencia de biofilm por tinción con Cristal Violeta (Categoría dicotómica)	Presente o ausente
	Rojo Congo = 5	Presencia de biofilm por tinción con Rojo Congo (Categoría dicotómica)	
	Azul Alciano =6	Presencia de biofilm por tinción con Azul Alciano (Categoría dicotómica)	Presente o ausente
	Producción de biopelícula individual por espectrofotometría a 630 nm		
	Producción fenotípica biopelícula en agar rojo congo		

6.5. Tamaño de la Muestra

Debido a que no existen estudios previos que detectar biopelícula mediante tinciones especiales para carbohidratos contra el estándar de oro (microscopia electrónica), en este estudio se evaluará 20 úlceras

6.6. Análisis Estadístico

Para valorar la técnica de tinción de cristal violeta, Azul Alciano, rojo Congo y PAS se realizó un análisis de sensibilidad teniendo como “gold standard” a las muestras declaradas como positivo por el método de microscopia electrónica. (Fisher y Van Belle, 1993).

Se realizó un análisis descriptivo consistente en obtener la media, desviación estándar o típica y los valores máximo y mínimo a la variable edad y CV 630.

A las variables género, localización, comorbilidad, bacteria, microorganismo, los antibióticos: amikacina, Amoxiclav, ampicilina, cefazolina, cefepima, ceftazidima, cetriaxona, ertapenem, ciproflo, gentamicina, imipenem, notrofurantoina, fosfomicina, norflo, tigeciclina, ticarcilina, trim sulfa y levoflo se les obtuvo su distribución por frecuencia absoluta y relativa expresada ésta como proporción.

De igual forma se realizó el mismo análisis de frecuencias a las variables rojo congo, producción de biofilm, evolución, evolución de la bacterial principal y prodbiofilm2.

Con el objeto de detectar la asociación entre el tipo de microorganismo con evolución, localización y cada uno de los antibióticos en estudio, producción de biopelícula y evolución de los pacientes se obtuvieron tablas de contingencia y el estadístico de prueba fue la clásica Ji-cuadrada de Pearson. (Fisher y Van Belle, 1993).

Se efectuó un análisis de correlación lineal simple de Pearson entre las variables CV 630 con cada uno de los antibióticos en estudio. (Fisher y Van Belle, 1993).

Para comparar la mayor efectividad en la identificación de la presencia de biopelícula, se realizó la prueba de hipótesis de igualdad de medianas de SV 630 con evolución de la bacteria principal y con rojo congo mediante la prueba de Mann-Whitney (Hollander y Wolfe, 1999).

Se realizó una prueba de hipótesis de igualdad de medias de edad para cada género, mediante el estadístico t de Student. (Fisher y Van Belle, 1993).

En el caso de que la prueba de Levene indicara heterogeneidad de varianzas se asumían varianzas desiguales en la aplicación del estadístico t de Student. (Kuehl, 2001).

Antes del procesamiento de la información se elaboró una base de datos en Excel, de Microsoft, y el análisis estadístico se realizó con el paquete computacional Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 19.

6.7. Descripción Operativa del Estudio

Se eligieron pacientes que acudieron a la Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas. División de Dermatología. Hospital General “Dr. Manuel Gea González” que cumplían con los criterios de inclusión. Se explicó el procedimiento y una vez aceptado, previo consentimiento informado se tomó del lecho de la herida una biopsia por huso de 1 cm de largo.

La biopsia se partió en 2 y una mitad se procesó para microscopía electrónica y la segunda para tinciones especiales con Acido Peryodico de Shift, Rojo Congo, cristal violeta, Azul Alciano

De las biopsias obtenidas la mitad del huso se procesó para microscopía electrónica, estas era fijadas en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2 durante 60 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con una duración de 10 minutos cada uno con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2. Las muestras se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% durante 45 minutos, se hicieron 3 nuevos lavados de 10 minutos con cacodilato de sodio al 0.1M, pH 7.2, se deshidrataron con alcohol etílico de forma ascendente; alcohol al 30%, 10 minutos a temperatura ambiente, hasta llegar a una concentración del alcohol al 100% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después las muestras se desecaron a punto crítico en un desecador Samdry-780 utilizando CO₂; una vez desecadas se colocaron en un porta especímenes, evaporados con carbón e ionizados con oro durante 6 minutos, utilizando un ionizador JEOL. Se colocaron en un evaporador de alto vacío para cubrir con oro durante 6 minutos y finalmente se observaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950. Una vez procesadas las imágenes de microscopía electrónica se compararon con las imágenes obtenidas con tinciones para carbohidratos valorando positividad en la superficie de la herida.

Se tomaron cultivos del lecho de la herida y las bacterias aisladas se analizaron para determinar la producción de biopelícula por medio del ensayo de producción en Microplaca de 96 pozos y de la siembra de colonias en agar de rojo Congo.

Las muestras fueron sembradas en agar sangre y agar MacConkey y los aislamientos fueron identificados con el sistema automatizado Vitek 2, asimismo

se determinó la presencia de beta-lactamasas y la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante el mismo sistema.

Ensayo de producción de Biopelícula en Microplaca de 96 pozos

Para la realización del ensayo se tomo una colonia de cada cultivo positivo y se coloco en 3 ml de caldo infusión cerebro corazón y se incubó a 37°C por 18 horas, del cultivo inicial se realizó un dilución de 1:100 en el medio BHI-TT y se tomaron 100 µl, se transfirieron por triplicado a una microplaca de polivinil de 96 pozos de fondo en U. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se removieron las células planctónicas mediante decantación y se realizaron 3 lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril. Posteriormente se adicionaron 125 µl de cristal violeta al .1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se removió el excedente de colorante mediante 2 lavados. A la microplaca se le agregaron 200 µl de etanol al 95% y la biopelícula teñida a otra microplaca estéril de fondo plano donde se efectuó la lectura con espectofotómetro a una densidad de 630 nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la biopelícula. Se incluyeron como cepas control la *E. coli* DH5-α y *P. aeruginosa* 27853, se tomaron como referencia sus valores de producción de biopelícula, a *E. coli* DH5-α como productor débil y la *P. aeruginosa* 27853 como productor fuerte.

Siembra de colonia en agar de Rojo Congo

Para elaborar el medio agar rojo Congo se colocaron 37 g/L de cado infusión cerebro corazón, 50 gr de sucrosa, 10 gr de agar bacteriológico y 800 mg de rojo Congo. La mezcla se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 lb, 15 min, se dejaron

polimerizar por 24 horas, al mismo tiempo se sembraron los aislamientos en estudios en agar sangre (5% sangre de ovino) se incubaron a 37 °C durante 36 horas, en un ambiente enriquecido en CO₂ al 5%, los cultivos obtenidos a partir del agar sangre se inocularon en el medio con rojo Congo, mediante el método de estría cruzada y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los aislamientos que produjeron colonias negras opacas de consistencia firme y seca al medio, se consideran como productoras de biopelícula y aquellos aislamientos que produjeron colonias de color rosa brillante se consideraron negativas para la producción de biopelícula

7. RESULTADOS

De acuerdo a los criterios de inclusión se incluyeron 20 pacientes, de los cuales 11 fueron hombres y 9 mujeres, la edad promedio para cada género fue de 47 y 61 años respectivamente. En esta población se encontraron 5 (25%) úlceras por presión, 7 (35%) pies diabéticos y 8 (40%) úlceras venosas. En 18 de los pacientes presentaron comorbilidades, 9 pacientes con diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2, 4 con lesión medular, 2 con hipertensión arterial sistémica, 2 con obesidad mórbida y 1 con esquizofrenia. Ver tabla 1

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes

Tabla 1					
Género	Edad	Tipo de herida	Comorbilidad	Bacteria 1	Bacteria 2
M	45	Úlcera por presión	Esquizofrenia	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>
F	72	Úlcera Venosa	DM2	<i>Shewanella algae</i>	<i>A. baumannii</i>
M	45	Pie diabético	DM2	<i>A. baumannii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
F	72	Pie diabético	DM2	<i>A. baumannii</i>	
M	48	Úlcera por presión	Lesión medular	<i>A. baumannii</i>	
M	63	Úlcera por presión	Lesión medular	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
F	64	Úlcera Venosa	HAS	<i>P. mirabilis</i>	
M	33	Úlcera por presión	Lesión medular	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
F	48	Úlcera Venosa	Obesidad	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
F	62	Pie diabético	DM2	<i>P. aeruginosa</i>	
F	59	Úlcera Venosa		<i>E. coli</i>	
M	65	Pie diabético	DM2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
M	63	Úlcera Venosa		<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
F	41	Úlcera Venosa	DM2	<i>Pseudomona stutzeri</i>	<i>S. aureus</i>
M	49	Pie diabético	DM2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
M	35	Úlcera Venosa	Obesidad	<i>E. coli</i>	
F	72	Úlcera Venosa	HAS	<i>P. aeruginosa</i>	
M	36	Úlcera por presión	Lesión medular	<i>A. baumannii</i>	
F	61	Pie diabético	DM2	<i>A. baumannii</i>	
M	43	Pie diabético	DM2	<i>S. aureus</i>	

Por medio de microscopia electrónica se trabajaron el total de las muestras y se encontró positividad en todas ellas. De las tinciones para carbohidratos, se encontraron 17 biopsias positivas mediante el método de cristal violeta (sensibilidad 85%), mediante el método de Acido peryodico de Shift y Azul Alciano se localizaron 13 biopsias positivas para la biopelícula respectivamente, ambos métodos con una sensibilidad del 65%. Mediante el método de rojo congo, solo se identifico 1 biopsia positiva. Figura 2, 3, 4, 5, 6 Y 7

Figura 2. Microscopía electrónica de biopelícula sobre ulcera venosa

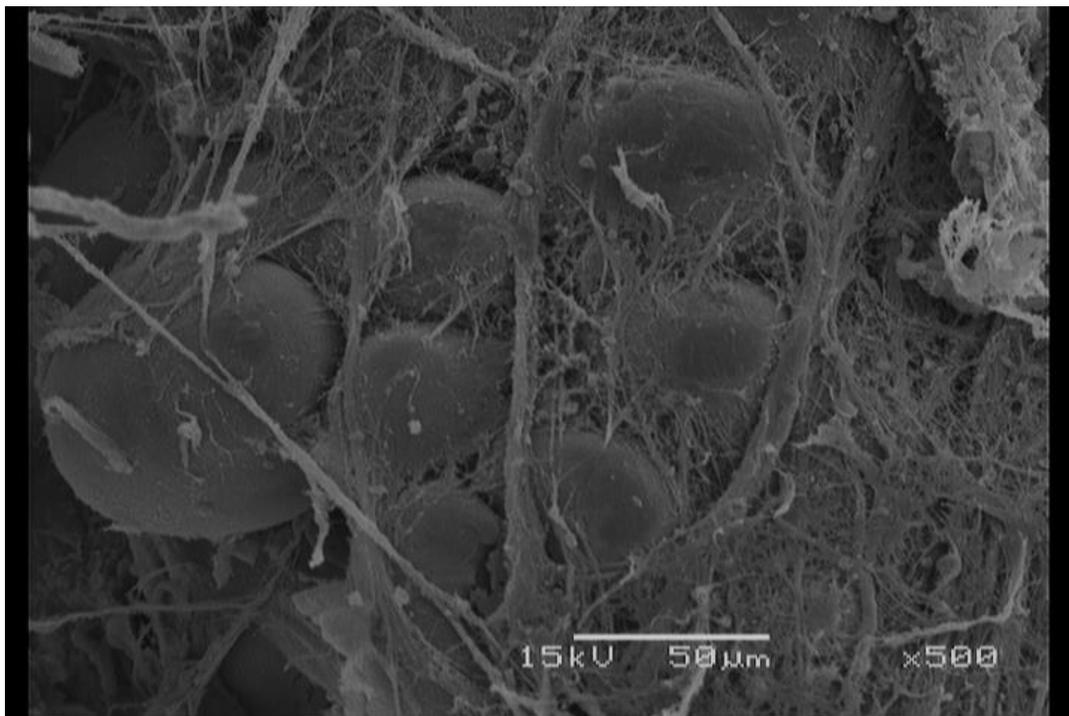


Figura 3. Imagen de tinción Gram, mostrando bacterias embebidas en la biopelícula.

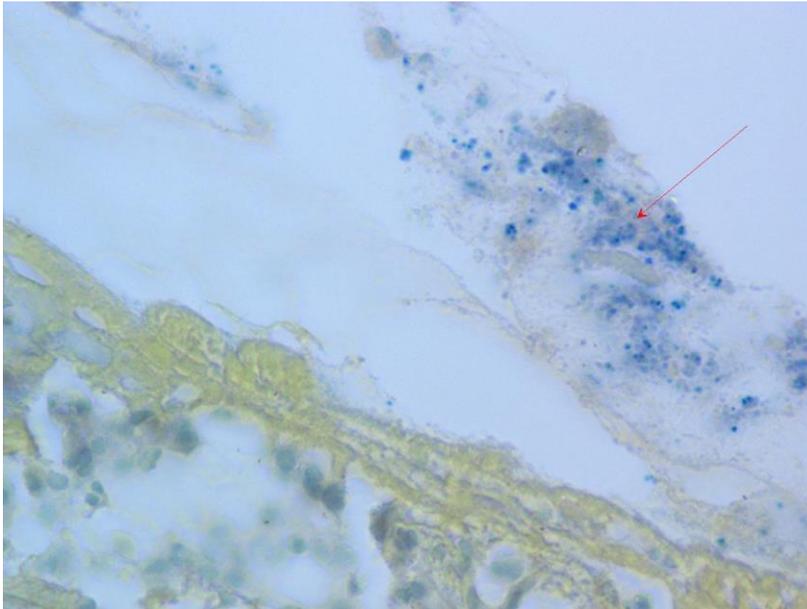


Figura 4. Imagen de biopelícula teñida con cristal violeta, las flechas señalan la presencia de bacilos embebidos en la biopelícula.

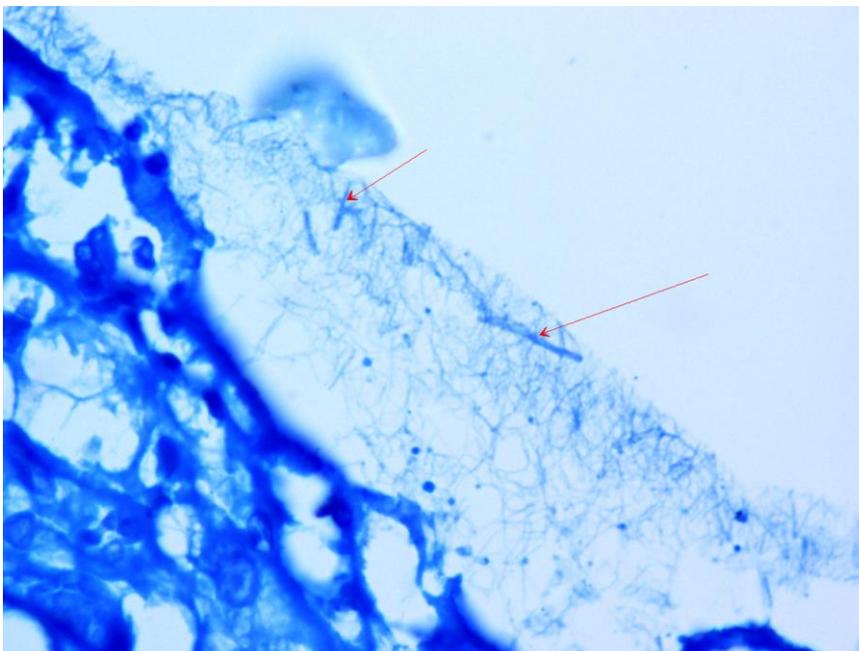


Figura 5. Imagen de biopelícula teñida con Acido peryódico de Shift.

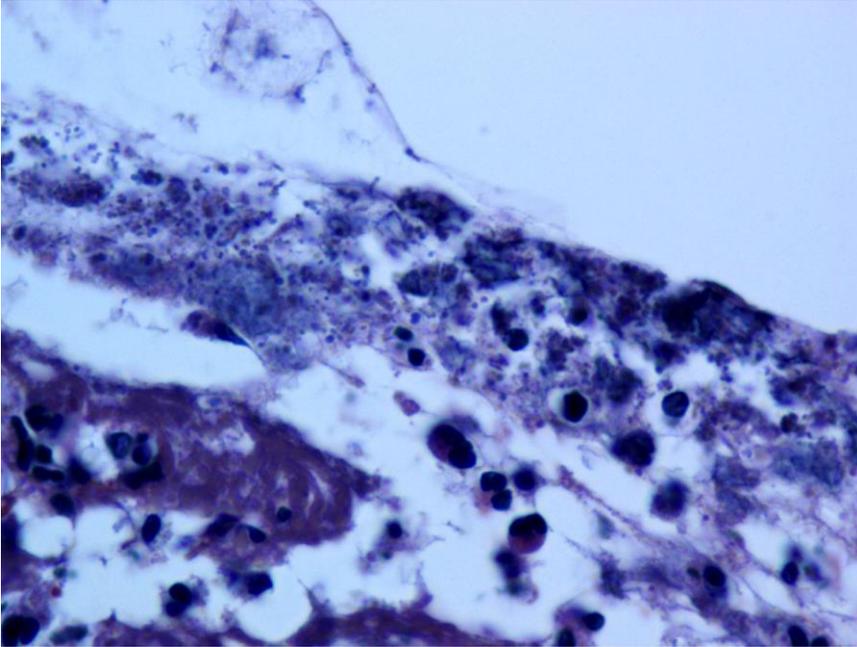


Figura 6. Imagen de biopelícula teñida con Azul Alciano

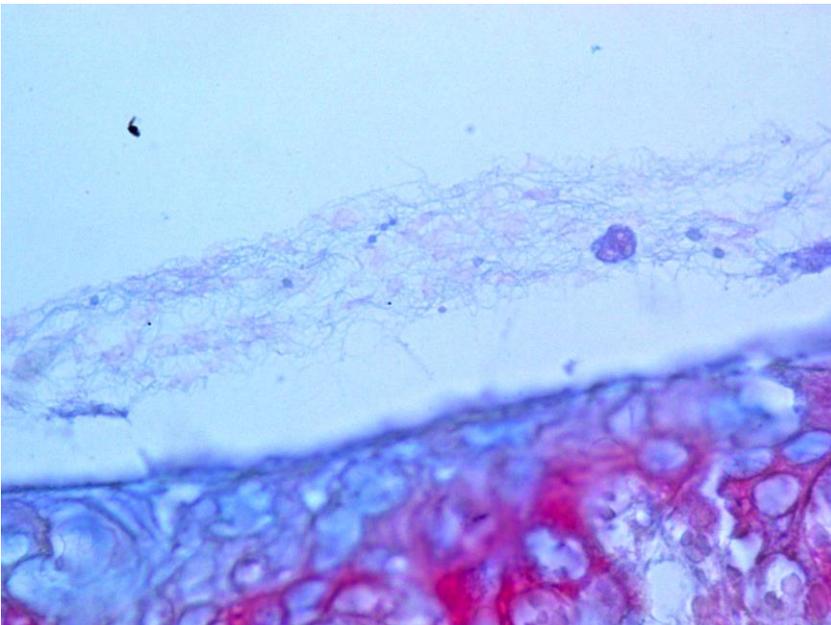
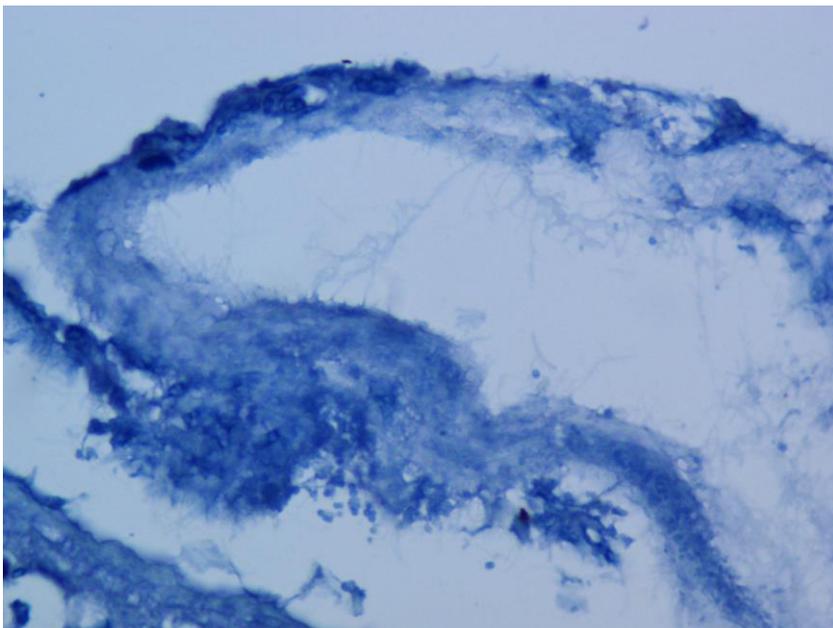


Figura 7. Imagen de biopelícula teñida con Rojo Congo



En total se aislaron 30 cepas bacterianas, 10 cultivos fueron polimicrobianos, por frecuencias las bacterias encontradas fueron *Acinetobacter baumannii* 29% (9 cultivos), *E. coli* 16.1% (5 cultivos), *P. aeruginosa* 19.4% (6 cultivos), *S. aureus* 19.4% (6 cultivos). Tabla 1.

Cada una de las cepas aisladas fue resembrada en agar de rojo Congo para realizar la detección cualitativa (fenotípica) de la biopelícula, encontrándose positiva en 25 de las cepas sembradas, la intensidad de la positividad se dividió en altamente positivo, designándose con 2 cruces, moderadamente positivo con 1 cruz y negativo. 18 cepas fueron altamente positivas, 7 cepas moderadamente positivas y 5 negativas. Tabla 2 y figura 8.

Tabla 2. Características de las Bacterias productoras de biopelículas

Cepas	Microorganismo	Biopelícula en Agar Rojo Congo	DO₆₃₀ nm	Biopelícula
1	<i>E. coli</i>	0	0.062	Baja
2	<i>Shewanella algae</i>	0	0.076	Baja
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	0.086	Baja
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	0.187	Moderadamente Baja
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0.099	Baja
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.212	Moderadamente Alta
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.197	Moderadamente Baja
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.283	Alta
9	<i>E. coli</i>	+	0.150	Moderadamente Baja
10	<i>pseudomona aurginosa</i>	++	0.194	Moderadamente Baja
11	<i>Proteus mirabilis</i>	+	0.194	Moderadamente Baja
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0.120	Baja
13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.390	Muy alta
14	<i>E. coli</i>	++	0.107	Baja
15	<i>Pseudomina aurginosa</i>	++	0.300	Alta
16	<i>Pseudomona Aurginosa</i>	++	0.141	Moderadamente Baja
17	<i>E. coli</i>	++	0.274	Moderadamente Alta
18	<i>Pseudomona Aurginosa</i>	0	0.133	Baja
19	<i>E. coli</i>	++	0.211	Moderadamente Alta
20	<i>Pseudomona stutzeri</i>	++	0.165	Moderadamente Baja
21	<i>E. coli</i>	++	0.148	Moderadamente Baja
22	<i>Pseudomona Aurginosa</i>	++	0.158	Moderadamente Baja
23	<i>E. coli</i>	++	0.134	Baja
24	<i>Pseudomona Aurginosa</i>	++	0.278	Moderadamente Alta
25	<i>E. coli</i>	++	0.158	Moderadamente Baja
26	<i>Pseudomona Aurginosa</i>	++	0.134	Baja
27	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.278	Moderadamente Alta
28	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.207	Moderadamente Baja
29	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.416	Muy Alta
30	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	0.405	Muy Alta

Figura 9. Colonias bacterianas productoras de biopelícula, el color negro indica la presencia de la biopelícula en distintas intensidades.



Por el método de producción de biopelícula en placa de 96 pozos, se encontraron 9 cepas con baja producción, 11 con producción moderadamente baja, 5 moderadamente alta, 2 altas productoras y 3 altamente productoras (Tabla 2, Grafica 1, Figuras 8, 9, 10). Se realizó un análisis de correlación de las resistencias bacterianas y la producción de biopelícula, solo encontrándose una correlación de 0.386 con una $P= 0.035$ entre la producción de biopelícula y la resistencia a fosofomicina. Asimismo se realizó un Chi cuadrada entre la producción de biopelícula y la evolución de los pacientes (definiéndose como mala evolución aquellos pacientes que no presentaron mejoría en 8 semanas posteriores a tratamiento), la cual fue altamente significativa con una $P=0.003$.

Se realizó Chi cuadrada para la producción de biopelícula y la positividad para la biopelícula en cultivos en rojo congo, con una $P= 0.005$.

Figura 10. Cultivo de cepas productoras de biopelícula, obsérvese los pozos 4, 5 y 6 que evidencian la producción de biopelícula antes de ser teñida con cristal violeta

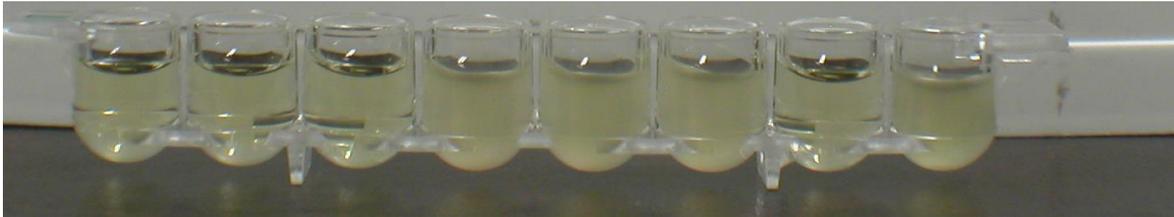
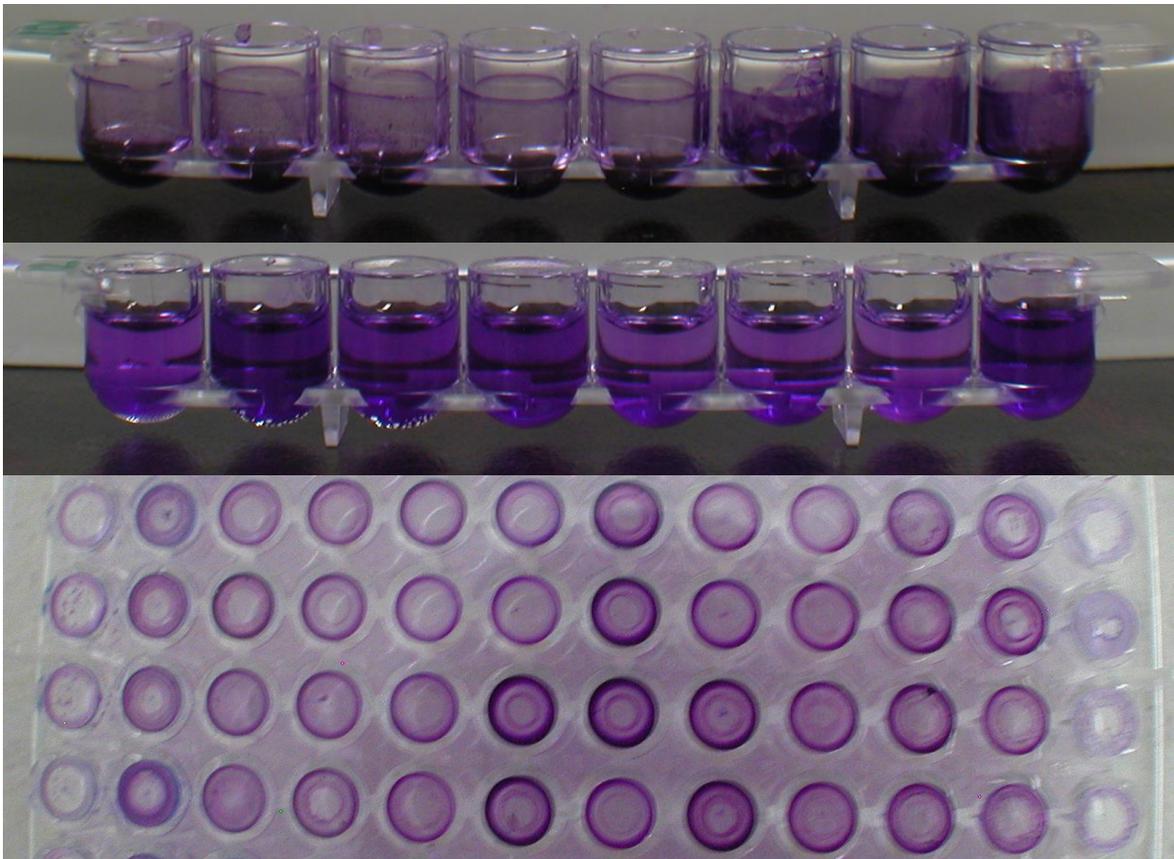
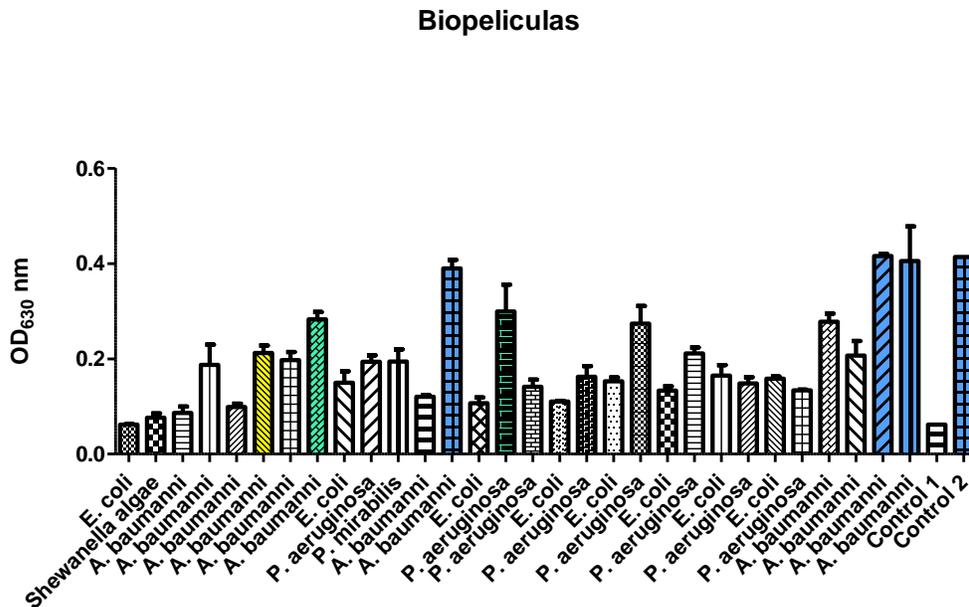


Figura 11. Alta producción de biopelícula correspondientes a *Acinetobacter baumannii*.



Grafica 1. Producción individual de biopelícula por espectrofotometría a 630 nm



Del total de las cepas aisladas el 90% mostró resistencia a trimetoprim sulfametoxazol y 43% fueron resistentes a ciprofloxacino. Los principales microorganismos aislados por tipo de herida fueron *Acinetobacter baumannii* en los 5 casos (100%) de úlceras por presión, *Acinetobacter baumannii* en 4 (50%) casos y *P. aeruginosa* en 3 (42%) casos de pie diabético y *E. coli* en 6 (85%) casos de úlceras venosas.

8. DISCUSION

En nuestra población de pacientes la presencia de biopelícula se encontró en el 100% de los casos mediante microscopía electrónica. No existe una serie previa donde la presencia de biopelícula fuera positiva en el 100%, James y colaboradores., (2008) evaluaron por microscopia electrónica 50 heridas crónicas y 16 agudas, encontrando que el 60% de las heridas crónicas se observaba la biopelícula, mientras que solo el 6% de las heridas agudas. Esta diferencia podría explicarse debido a los criterios de selección de nuestros pacientes ya que incluían varias características de las heridas sospechosas, como la falla a tratamiento antibiótico dirigido, además de 6 meses de mala evolución.

Del total de los 20 cultivos el 50% eran polimicrobianos, lo es un factor que influye en la mala evolución de estas heridas, ya que es conocido que unos de los mecanismos de resistencia de la biopelícula es la interacción y cooperación entre distintas especies bacterianas. En estudios previos ya se había caracterizado por métodos de biología molecular las poblaciones bacterianas de las biopelículas en heridas crónicas. Hill y colaboradores., (2003) evalúan el uso de las técnicas de biología molecular para caracterizar la microflora de las úlceras venosas, ya que mediante estos métodos se aíslan mucho mas microorganismos que por métodos comunes. Los autores amplificaron mediante PCR la subunidad ribosomal 16S en muestras obtenidas de úlceras venosas y compararon los microorganismos aislados con los obtenidos mediante hisopado del lecho de la herida. Los principales microorganismos aislados por hisopado fueron *Acinetobacter* y *Staphylococcus epidermidis*, mientras que por el otro método se aislaron *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus spp.*,

Acinetobacter haemolyticus, *Bacteroides ureolyticus*, *Lactosphaera pasteurii* *Acinetobacter Iwoffii* y *Morganella Morganii*. Esto es interesante ya que en nuestro estudio el microorganismo más frecuentemente aislado fue el *Acinetobacter baumannii*, encontrándose también *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Lo cual confirmo que el haber obtenido los cultivos mediante hisopado nos permitió aislar los microorganismos responsables de la formación de biopelícula en nuestros pacientes.

En este estudio se encontró una relación estadísticamente significativa entre la producción de biopelícula y la mala evolución de los pacientes, hasta este momento no se ha reportado ningún otro estudio que analizara esta relación en las heridas crónicas. No se encontró una relación entre la mala evolución y las resistencias bacterianas, situación que se puede asociar a que la biopelícula tiene otras maneras de afectar la evolución de la heridas crónicas. Gurjala., 201, desarrollo un modelo cuantitativo *in vivo* para estudiar como la biopelícula interfería en el proceso de cicatrización, encontrando que la biopelícula crea un estado de inflamación crónico de bajo grado, que impide la migración epitelial y la formación de tejido de granulación, lo cual explicaría lo observado en nuestro grupo de pacientes. Además la biopelícula les brinda a las bacterias protección del sistema inmune del huésped (Edwards R2004).

El uso del medio con rojo Congo, mostro una relación estadísticamente significativa con la presencia de biopelícula por espectrometría (Crémet L 2013), por lo que este método sería útil como prueba de valoración rápida de la presencia de organismos productores de biopelícula presentes en la herida, ya que en 24 horas se tienen resultados, y aunado a los criterios de selección que utilizamos

permitieron captar 100% de pacientes con biopelícula asociada a la herida lo que aumentaría la especificidad de identificar una herida con biopelícula.

Respecto al uso de tinciones especiales para carbohidratos, mediante el cristal violeta se logró identificar 17 de 20 lesiones positivas para biopelícula con una sensibilidad del 85%, aunque el tamaño de la muestra no permitió establecer el valor predictivo positivo para este método, los resultados son prometedores para utilizarlo como una prueba de tamizaje para heridas con presencia de biopelícula.

El hecho de que la biopelícula sea un factor de riesgo independiente de la resistencia bacteriana, apoya la necesidad de realizar un tratamiento antibiopelícula en pacientes sospechosos. Van der Plas y colaboradores (Van der Plas MJ2008) compararon el efecto de las excreciones y secreciones de la larva de la mosca *Lucilia sericata*, vancomicina, daptomicina y clinadamicina, así como sus combinaciones contra la biopelícula de la cepa ATCC 29213 de *S. aureus*. Encontrando que la combinación de la secreciones con los antibióticos fue efectiva para eliminar la biopelícula de las heridas. Asimismo en otros estudios se ha demostrado la buena evolución de las heridas una vez que se realiza desbridamiento de la herida para eliminar la biopelícula. (Wolcott RD2008b) (Tregove NJ1996).

9. CONCLUSIONES

En este estudio se utilizaron 4 métodos diferentes para demostrar la presencia de biopelícula en heridas crónicas, dos métodos directos y dos métodos indirectos. La combinación de las pruebas proporcionó información a nivel celular, microbiológico y clínica. Logrando establecer una relación con el pronóstico de los pacientes.

Los criterios de selección utilizados en este estudio permitieron identificar un 100% de pacientes con heridas con biopelícula, por lo que podrían ser extrapolables para utilizarse en la consulta de la clínica de heridas.

De las tinciones para carbohidratos la que mostro mayor sensibilidad para identificar la biopelícula fue el cristal violeta, por lo que podría ser una técnica candidata a evaluarse como rutina para determinar la biopelícula *in situ* en pacientes con heridas crónicas.

La prueba fenotípica de rojo congo podría utilizarse como un método de tamizaje para heridas infectadas por bacterias productoras de biopelícula.

La técnica cuantitativa de producción de biopelícula permitió analizar los grados de producción de acuerdo al microorganismo o microorganismos asociados, asimismo se observó una correlación directamente positiva a la mala evolución.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos se propone realizar un estudio con mayor número de pacientes para validar nuestros resultados y proponer una o dos técnicas como alternativas de diagnóstico.

11. Bibliografía

1. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilm. In: Ornston LN, Balows A, Greenberg EP, editors. Annual reviews in microbiology,49. Palo Alto, CA: Annual Reviews, Inc., 1995: 711–45.
2. Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT, Costerton JW. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol* 1977;23: 1733–6.
3. Götz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1367–78.
4. Mack D. Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. *J Hosp Infect* 1999; 43: S113–25.
5. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184: 1140–54.
6. Nickel JC, Costerton JW, McLean RJ, Olson M. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33 (Suppl. A): 31–41.
7. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; 407: 762–4.
8. Marrie TJ, Costerton JW. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* 1984;19: 687–93.

9. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 45–50.
10. Davis SC, Eaglstein WH, Cazzaniga AL, Mertz PM. An octyl- 2-cyanoacrylate formulation speeds healing of partialthickness wounds. *Dermatol Surg* 2001; 27: 783–8.
11. Contreras Ruíz José. Abordaje y Manejo de las Heridas. Primera edición, Intersistemas Editores; 2012: cap 3, 65-8612.
12. Jensen PO, Bjarnsholt T, Rasmussen TB, et al. Rapid necrotic killing of PMNs is caused by quorum sensing controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2006;3:225–231.
13. James GA, Swogger E, Wolcott, R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Rep Reg* 2008;16:37–44.
14. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, et al. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Rep Reg* 2008;16:23–29.
15. Percival S, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Rep Reg* 2008;16:52–57.
16. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114–122.
17. Bjarnsholt T, Kirketerp-Muller K, Østrup Jensen P, Madsen KG, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Rep Reg* (2008) 16 2–10.
18. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:34–40.

19. Allesen-Holm M, Barken Bundvig K, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2005;59:1114–1128.
20. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003;50:61–68.
21. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008;17:145-155.
22. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–193.
23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–1322.
24. Widgerow AD. Persistence of the chronic wound: implicating biofilms. *Wound Healing Southern Africa* 2008;1(2):5-9.
25. Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Padilla-Desgarenes MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *DermatolRevMex* 2010;54(1):14-24.
26. Smart H, RN. Combatting biofilm: a targeted approach to a range of wounds. *Wound Healing Southern Africa* 2010; 3 (2): 28-30
27. Bjornson HS, Colley R, Bower RH, Duty VP, Schwartz-Fulton JT, et al. Association between microorganism growth at the catheter insertion site and colonization of the catheter in patients receiving total parenteral nutrition. *Surgery* 1982;92: 720–727.

28. Malic S, Hill KE, Hayes A, Percival SL, Thomas DW, Williams DW. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology* 2009; 155(8):2603-11
29. Cutting KF, Harding KG. Criteria for identifying wound infection. *J Wound Care* 1994;3:198-201.
30. Cutting KF, White RJ. .Defined and refined: criteria for identifying wound infection revisited. *British Journal of Community Nursing* 9,3 Wound Care Supplement: 2004; S6-S15
31. Cutting KF. Wound healing, bacteria and topical therapies. *EWMA Journal*. 2003;3(1):17–19),
32. Gardner S, Frantz R, Trola C . A tool to assess clinical signs and symptoms of localized infection in chronic wounds: development and reliability. *Ostomy Wound Mgt* 2001; 47:40-47)
33. Sue E. Gardner, Rita A. Frantz, Bradley N. Doebbeling . The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound Repair and Regeneration* 2001; 9(3): 178–186
34. Edwards R, Harding KG Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17(2):91–96)
35. Bill TJ, Ratliff CR, Donovan AM, Knox LK, Morgan RF, Rodeheaver GT Quantitative swab culture versus tissue biopsy: a comparison in chronic wounds. *Ostomy Wound Manage* 2001; 47(1):34–37

36. Robson MC, Stenberg BD, Hegggers JP Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg* 1990; 17(3):485–492
37. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD (2008) Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8, 43
38. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):37–44
39. Trengove NJ, Stacey MC, McGeachie DF, Mata S Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *J Wound Care* 1996; 5(6):277–280
40. Davies CE, Hill KE, Wilson MJ et al Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3549–3557
41. Davies CE, Wilson MJ, Hill KE et al Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: chronic wounds reevaluated. *Wound Repair Regen* 2001; 9:332–340
42. Akiyama H, Huh WK, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K Confocal laser microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in vitro. *J Dermatol Sci* 2002; 29(1):54–61
43. Akiyama H, Kanzaki H, Tada J, Arata J *Staphylococcus aureus* infection on cut wounds in the mouse skin: experimental staphylococcal botryomycosis. *J Dermatol Sci* 1996; 11(3):234–238

44. Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Sci* 2003;32(3):193–199
45. Schaber J Andy , Adrienne Hammond, Nancy L. Carty, Simon C. Williams, Jane A. Colmer-Hamood, Ben H. Burrowes, Vijian Dhevan , John A. Griswold, Abdul N. Hamood Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2007;;56:738-48.
46. Davies, C. E., Hill, K. E., Wilson, M., Stephens, P., Hill, C. M., Harding, K. G. & Thomas, D. W.). Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 3549–3557.
47. Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8):2717–2722
48. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):37–44
49. Gurjala AN, Geringer MR, Seth AK, Hong SJ, Smeltzer MS, Galiano RD, Leung KP, Mustoe TA. Development of a novel, highly quantitative in vivo model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*. 2011 May-Jun;19(3):400-10
50. Wolcott RD, Rhoads DD) A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008;17(4):145–2, 154

51. Van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Legendijk EL, van, Gulpen C, van Dissel JT, Bloemberg GV, Nibbering PH. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1):117–122
52. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Kroghfelt K, Hoiby N, Givskov M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):2–10
53. Hill y colaboradores (Hill, K. E., Davies, C. E., Wilson, M., Stephens, P., Harding, Molecular analysis of the microflora in chronic venous leg ulceration. *J Med Microbiol* 2003; 52, 365–369.)
54. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, Dauvergne S, Caroff N. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Mar;75(3):252-57

12. ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

Se me ha explicado que tengo una herida que puede tener la presencia de biopelícula bacteriana (ulcera con bacterias), y para confirmar la presencia de la biopelícula se requiere de una biopsia (tomar una parte del lecho de la ulcera con un bisturi), con lo que se sabrá si tengo biopelícula bacteriana en lecho de mi ulcera.

Si acepto participar, permitiré de forma inicial la toma de fotografías clínicas para ser evaluadas en dicho estudio.

Me han expuesto los efectos esperados o complicaciones (dolor de leve a moderado durante el procedimiento de toma de biopsia, edema, eritema, infección y sangrado) por ello me comprometo a seguir indicaciones de personal médico. Así mismo se me ha explicado que las posibles complicaciones que se deriven del procedimiento serán resueltas por la Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Herida y Estomas. División de Dermatología

Puedo preguntar hasta aclarar todas mis dudas y mi decisión respecto al estudio no modificaré la manera en que se me atiende en Dermatología o en el hospital.

Autorizo la publicación de los resultados del estudio a condición de que en todo momento se mantenga el secreto profesional y que no se publique mi identidad.

Con la fecha _____, comprendí de lo que se trata el estudio: “Estudio comparativo de diferentes métodos de tinción histológica para la demostración de biopelículas bacterianas en heridas crónicas y en sus cultivos” en pacientes de la de Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Herida y Estomas. Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, y acepto participar.

Nombre y firma del paciente o responsable legal

Nombre y firma del testigo 1

Relación con el paciente

Nombre y firma del testigo 2

Relación con el paciente

Nombre y firma del Investigador Responsable Dr. José Contreras Ruíz.

Teléfono 40 00 30 00. Ext. 3502.

Se entrega original al paciente y se conserva una copia como parte del protocolo.

En caso de duda comunicarse con el Dr. Jorge Andrés Peña Ortega, Presidente de los Comités de Investigación y Ética en Investigación al tel. 40 00 30 00 ext. 3279.

