



Artículo de revisión

Biopelículas bacterianas en heridas crónicas

Bacterial biofilms in chronic wounds

Biopelículas bacterianas em feridas crónicas

Recibido: 12 | 01 | 2019

Aprobado: 21 | 03 | 2019

DOI: <https://doi.org/10.18270/rsb.v9i1.2643>

Resumen

En las últimas tres décadas, el estudio de las biopelículas bacterianas ha tomado gran relevancia gracias a su identificación como uno de los factores más importantes en el desarrollo de infecciones crónicas. Una de las patologías de mayor interés en el área de la salud, y de la cual se ha logrado profundizar en mayor medida, corresponde a las heridas crónicas, en donde se estima que las biopelículas bacterianas están presentes en el 60%, comparadas con las heridas agudas en donde se presentan solo en el 20%.

Las heridas crónicas representan el 1-2% de todas las heridas a nivel mundial, pero la carga socioeconómica y emocional que generan, repercute notablemente debido a los costos en curaciones, tratamientos convencionales y en complicaciones tan graves como las amputaciones de extremidades. El objetivo de este artículo de revisión es proporcionar información relevante sobre el concepto de las biopelículas bacterianas, su implicación en el desarrollo de heridas crónicas, el diagnóstico y los posibles tratamientos.

Palabras clave: biopelículas; infección de heridas; farmacorresistencia microbiana; fisiopatología; diagnóstico clínico; terapéutica.

Cristian Camilo Becerra G

orcid.org/0000-0001-8820-3117

María Paula García A

orcid.org/0000-0001-7580-5899

Yeisson David Reyes M

orcid.org/0000-0002-4778-2877

Mónica Gabriela Huertas

orcid.org/0000-0001-6568-4595

Facultad de Medicina, Universidad El Bosque,
Bogotá D.C., Colombia.

Correspondencia: huertasmonica@unbosque.edu.co

Abstract

In the last decades, the study of bacterial biofilms has become relevant due to its significance in the development of chronic infections. Chronic wounds constitute a disease that holds great interest for health care. It is estimated that bacterial biofilms are present in 60% of chronic wounds as opposed to acute wounds in which the presence of bacterial biofilms is 20%. Chronic wounds account for 1% to 2% of all injuries worldwide but socioeconomic and emotional burden plays a major role in healing costs; traditional treatments and severe complications such limb amputations. The aim of the present review article is to provide relevant information on the concept of bacterial biofilms, its implication in the development of chronic wounds, its diagnosis and prospective treatments.

Keywords: Biofilms, Wound Infection, Indicators, Microbial Drug Resistance, Physiopathology, Clinical Diagnosis, Therapeutics

Resumo

Resumo. Ao longo das últimas três décadas, o estudo das biopelículas bacterianas tem tido grande relevância pela identificação de um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de infecções crônicas. Uma das patologias de maior interesse na área da saúde, são as feridas crônicas, as biopelículas bacterianas estão presentes em aproximadamente 60% (enquanto nas feridas agudas só se apresentam em aproximadamente 20% dos casos). Embora mundialmente as feridas crônicas representam entre 1 e 2% do total das feridas, a carga emocional e econômica que elas implicam, tem grande repercussão, chegando nos piores casos à amputação. O objetivo do presente artigo é proporcionar informação clara a respeito deste tema.

Palavras chave: biopelículas, infecção de feridas, indicadores, farmacoresistência, fisiopatologia, diagnóstico clínico, terapêutica.

Introducción

Las biopelículas bacterianas se definen como conformaciones tridimensionales de bacterias adheridas a una superficie y envueltas sobre una matriz de exopolisacárido y otros compuestos que, al ser producidos por ellas mismas, les brinda atributos específicos para adaptarse a un medio, además de conferirles propiedades de resistencia antimicrobiana no convencional (1).

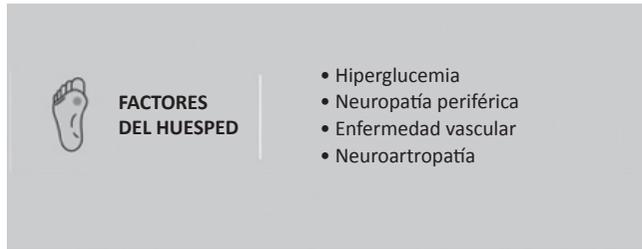
La relevancia médica de las biopelículas bacterianas inicia a principios de los años 70 gracias al microbiólogo danés Niels Hoiby, quien mediante trabajos de observación bajo microscopio de muestras de esputo en pacientes con fibrosis quística describió la presencia de colonias agregadas de *Pseudomonas aeruginosa*. Con este hallazgo se abrió una nueva incógnita sobre el papel que representaba esa clase de conjunto bacteriano en las muestras obtenidas (2); sin embargo, no fue hasta 1985 que se adoptó el término de “biopelículas”, esto gracias al médico y microbiólogo clínico Bill Costerton, quien desarrolló el concepto que plantea que los microorganismos se encuentran predominantemente adheridos a superficies y no “flotando libremente” como unidades autónomas, lo que se conoce como el estado planctónico de los microorganismos (3).

A partir de la profundización en el tema durante las últimas tres décadas, se ha logrado comprender la importancia que tienen las biopelículas bacterianas como uno de los factores relacionados de forma directa con el desarrollo de infecciones, y más puntualmente en infecciones crónicas, donde los mecanismos de resistencia bacteriana no convencionales y el daño permanente en tejido generan una prolongación en la erradicación bacteriana y el curso normal de la sanación del tejido afectado (4).

En el caso de las heridas crónicas, la presencia de biopelículas bacterianas se ha propuesto como el factor más importante en su desarrollo y cronificación (5); se estima que estas están presentes en el 60% de los casos de este tipo de heridas, mientras que solo en el 20% de las heridas agudas (6).

Las heridas crónicas representan un problema creciente de salud a nivel mundial y se relacionan de forma directa con un incremento de enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y patologías cardiovasculares. Estas últimas, junto con la edad y estados de inmunosupresión, se han visto asociadas con el desarrollo de úlceras crónicas (7,8), en especial las úlceras de pie diabético y sus factores de riesgo (9) (figura 1).

Figura 1. Factores del huésped en el desarrollo de úlceras de pie diabético



Fuente. Elaboración con base en Kalan & Brennan (9).

Los costos en sistemas de salud se ven afectados debido a la carga económica que representa el manejo a largo plazo de un paciente con una herida crónica, los cuales van desde el costo de curaciones diarias y manejo frecuente con medicamentos indicados, hasta procesos quirúrgicos por complicaciones como la amputación de extremidades (10). En Estados Unidos se reportan más de 5,7 millones de pacientes con heridas crónicas, de los cuales el tratamiento anual excede los 20 millones de dólares (11). La carga socioeconómica que implica este tipo de patologías es alta; se estima que las heridas crónicas tiene una prevalencia aproximada del 1-2% en la población de países desarrollados (12). En Latinoamérica aún no se tienen estadísticas sobre la prevalencia de pacientes con este tipo de patologías (13,14); sin embargo, en Colombia se ha reportado que enfermedades crónicas como la diabetes y la obesidad tienen una prevalencia de 8,5% y 22%, respectivamente (15,16), que junto a las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad en el país (17). Por tanto, se puede inferir que la prevalencia de úlceras crónicas podría ser mayor que la reportada en países desarrollados.

Debe resaltarse que las heridas crónicas tienen una repercusión muy alta en la calidad de vida de las personas, pues afectan de forma negativa su funcionalidad, autoimagen y perspectiva social. Son muchas las causas que explican este tipo de desenlaces, pero destaca su difícil diagnóstico, tratamiento y pronóstico, lo que lleva a complicaciones tan graves como la ablación de extremidades, que afecta todo el ámbito biopsicosocial en este tipo de pacientes (18).

El objetivo de este artículo de revisión es brindar información de manera precisa sobre el concepto de una biopelícula bacteriana y su importancia clínica en el desarrollo de heridas crónicas; se pretende abordar el tema desde una perspectiva histórica en

conocimientos básicos sobre biopelículas bacterianas y su implicación en el desarrollo de heridas crónicas, en su diagnóstico y en los posibles tratamientos.

Recuento histórico del descubrimiento de las biopelículas bacterianas

A pesar de que la existencia de los microorganismos se conoce desde el siglo XVII —gracias al descubrimiento de Leeuwenhoek, inventor de la microscopía y quien halló “animalcules” en su propia placa dental (19,20)—, el estudio de las biopelículas bacterianas es un campo relativamente nuevo, en especial en la medicina. Desde entonces y hasta principios del siglo XX se refería a las bacterias como microorganismos aislados o en estado planctónico, o como agregados de bacterias adheridos a superficies sumergidas en agua (2). Aun así, y como ya se mencionó antes, no fue hasta 1978 cuando Costerton y colaboradores introdujeron el término de biopelícula bacteriana, describiéndolo como agregados bacterianos envueltos en su propia matriz que se adhieren a superficies vivas y no vivas de la naturaleza (2,20).

Los primeros avances sobre el entendimiento de su estructuración y función surgieron mediante el estudio de las biopelículas en sistemas de aguas industriales, describiendo conceptos clave como la matriz extracelular polimérica, su heterogeneidad microbiológica y la comunicación célula-célula (21). En los últimos años, su aplicación en el ámbito médico ha tomado relevancia gracias a la investigación de biopelículas sobre placas dentales y, más recientemente, sobre su papel en el desarrollo de infecciones crónicas, donde patologías como la fibrosis quística han sido gran objeto de estudio en consecuencia a la presencia de biopelículas de *P. aeruginosa*, encontradas tanto en esputo de pacientes como en biopsias de pulmón (2,22).

Gracias al advenimiento de la biología molecular y los avances tecnológicos biomédicos —incluyendo la microscopía electrónica, de fluorescencia y confocal—, se ha expandido la investigación y la comprensión sobre las biopelículas con el fin de encontrar nuevos tratamientos para combatir las heridas crónicas (4,21)

¿Qué es una biopelícula?

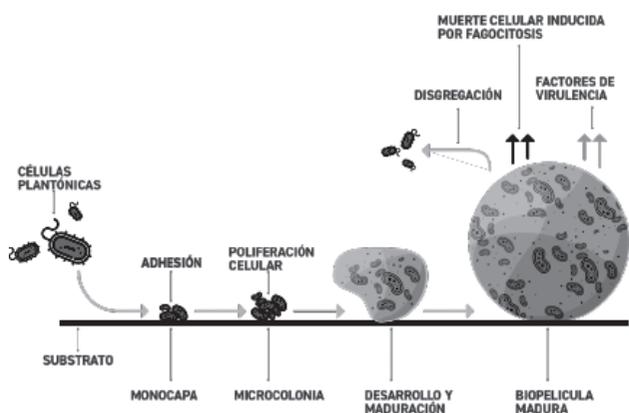
El proceso evolutivo bacteriano de adaptación, que en sí es uno de los más sorprendentes de la naturaleza por la complejidad de procesos que conlleva, se puede evidenciar con el análisis de la estructura de una biopelícula bacteriana (23,24). En específico, se

definen como agregados multibacterianos envueltos en una matriz propia de exopolisacárido, DNA y componentes proteicos que brindan propiedades particulares a las bacterias, tales como la capacidad de adhesión a una superficie, además de características físicas y fisiológicas distintas a las de bacterias en su estado planctónico o estado individual bacteriano (25,26). De esta manera, se generan mecanismos de resistencias adicionales y no convencionales a los antibióticos y se activa una respuesta inmunitaria alterada en donde las bacterias o microorganismos en estado de biopelícula pueden mantenerse viables en ese nicho (microambiente) por tiempo prolongado, generando así inflamación y daño tisular crónico (27-30).

Formación de una biopelícula bacteriana

La formación de la biopelícula se desarrolla en cinco pasos descritos por primera vez en el año 2002 por el microbiólogo estadounidense Paul Stoodley y colaboradores; sin embargo, se han incluido más especificaciones de acuerdo con los avances en biología molecular, aunque en esencia continúan siendo los mismos (31,32) (figura 2).

Figura 2. Pasos en la formación de una biopelícula bacteriana



Fuente. Elaboración con base en Høiby *et al.*, (23).

El primer paso es la adhesión reversible de la bacteria —que se encuentra en estado planctónico— a una superficie con características que favorecen esta adhesión, las cuales incluyen rugosidad, composición de la superficie o presencia de nutrientes en medio sólido/líquido (como lo es el tejido animal o vegetal); esto se da mediante el uso de estructuras especializadas de la bacteria como flagelos, pilis o receptores específicos, formándose de esta manera una monocapa bacteriana.

En el segundo paso ocurre la producción de exopolisacárido por las bacterias, el cual, además de fortalecer la unión entre las mismas, convierte de forma irreversible la adhesión a la superficie (32). Es importante aclarar que las bacterias pueden producir incluso dos o más polisacáridos diferentes en una estructura de biopelícula.

En el tercer paso las bacterias empiezan a proliferar conformándose en microcolonias aisladas, las cuales empiezan a expresar el fenotipo de biopelícula o biopelícula madura por la presencia de colonias rodeadas de canales de agua que permiten el suministro de nutrientes y paso de moléculas de señalización (24).

En el cuarto paso ocurre un crecimiento y proliferación de la biopelícula; sin embargo, es de resaltar que el crecimiento al interior de la estructura no es uniforme. Al mismo tiempo que las bacterias se van distribuyendo en los tres planos, se van desarrollando canales que permiten la entrada e incorporación de oxígeno y nutrientes para la suplencia energética de las mismas, haciendo de la biopelícula un sistema complejo desde el punto de vista metabólico en consecuencia al gradiente de oxígeno que incorpora para la supervivencia de la comunidad bacteriana.

Por último, en el quinto paso ocurre una dispersión de las células de forma individual, mediado en su mayoría por la disminución de nutrientes y por la presencia de D-aminoácidos los cuales en estudios *in vitro* han demostrado ser potenciales inhibidores de la formación de biopelículas en *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* (33). Una vez se inicia la dispersión de la biopelícula bacteriana, las unidades independientes de bacterias pueden movilizarse hasta encontrar otra superficie donde colonizar y generar una nueva biopelícula bacteriana (19,32).

Presencia de biopelículas bacterianas en heridas crónicas

El término de herida crónica ha sido usado en el ámbito médico, pero hasta el momento no existe una definición concreta y universal (31). De la manera más común, se conoce como un tipo de úlcera que posterga su resolución por un tiempo >3 meses o una herida que ha precedido a través del proceso de reparación sin un resultado anatómico o funcional esperado (11).

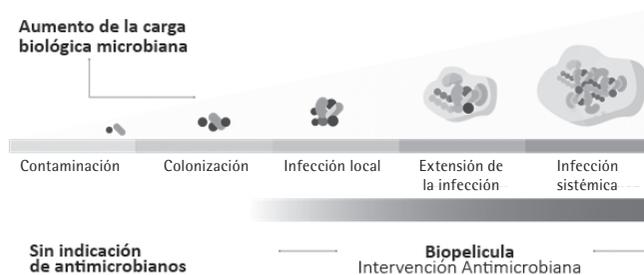
Basándose en su etiología, la Sociedad de Reparación y Heridas clasifica las heridas crónicas en cuatro categorías: úlceras de pie diabético, úlceras de presión, úlceras venosas y úlceras de insuficiencia arterial. Sin embargo, podría

incluirse otro tipo: las heridas con presencia de infecciones en el sitio quirúrgico o causadas por crecimiento de tejido maligno (11,12). En este sentido, se considera que una herida crónica es el resultado del fallo en el proceso de sanación normal del tejido durante un tiempo prolongado o tiempo en el cual debería sanar normalmente (11).

Una de las teorías más aceptadas que explica por qué las úlceras generan un estado de cronicidad se asocia de forma directa con la presencia de biopelículas, no solo de contenido bacteriano sino también a conformaciones multiespecies (hongos, bacterias y virus) como resultado de interacciones en comunidad que les trae beneficios de supervivencia (34,35). La consecuente alteración en la sanación debido al fallo de la erradicación de los microorganismos se ha visto asociado con presencia de patógenos oportunistas con posterior reminiscencia de la infección (7). El metaanálisis de Malone et al. (36) sobre estudios *in vivo* arrojó que al menos el 78% de las heridas crónicas contienen una biopelícula bacteriana. Asimismo, cabe resaltar que factores como la falta de vascularización y presencia de un componente bacteriano están implicados en la sanación normal de las heridas, explicando que la etiología es multifactorial (37).

El término de infección clínica es caracterizado por la presencia de signos clásicos de eritema, edema, calor, tumefacción y dolor (38); no obstante, cabe resaltar que el desarrollo de una infección se produce de manera secuencial mediante etapas de contaminación local, colonización, infección local temprana y tardía, diseminación de la infección e infección sistémica y sepsis, siendo esta última la complicación más grave (9) (figura 3).

Figura 3. Curso de una infección y puntos óptimos de intervención antimicrobiana



Fuente. Elaboración con base en Kalan & Brennan (9).

En las dos primeras etapas el sistema inmunológico es capaz de contrarrestar de manera efectiva la presencia de bacterias en una herida; no obstante, el desarrollo de signos y síntomas no ocurre hasta que la infección se instaura de forma local, siendo este el punto crítico

en el desarrollo y la maduración de biopelículas bacterianas; en consecuencia, esta corresponde a la etapa óptima para una intervención antimicrobiana, evitando la progresión de la infección (9,39).

Conformación estructural y microbiológica de biopelículas en heridas crónicas

En el inicio del estudio morfológico de las biopelículas bacterianas se tenía como concepto general que eran estructuras amorfas, sin una configuración específica y que solo dependían del medio externo o de factores genéticos para desarrollar su estructura (40,41). Hoy en día, por medio de estudios *in vitro* (en su mayoría con cepas de *P. aeruginosa*), se ha logrado explicar uno de los conceptos fundamentales sobre la conformación general de las biopelículas bacterianas. Este se basa en la organización bacteriana de forma gradual y en estructura de anillos, sobre diferentes planos y nivel de profundidad, dependiendo del gradiente de oxígeno, la actividad metabólica y la actividad redox, en donde las bacterias ubicadas en las zonas más profundas pueden sobrevivir mediante un metabolismo anabólico reducido; estas se denominan bacterias en estado cripto estático (criptobiótico) o “dormido”, mientras que las bacterias ubicadas en las zonas periféricas representan un metabolismo aeróbico de mayor capacidad.

El análisis de la estructura de las biopelículas y su conformación microbiológica en heridas crónicas ha sido una cuestión resultante de estudios sobre análisis de ecología bacteriana mediante toma de muestras de heridas crónicas en pacientes y su análisis mediante muestras de patología e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (43).

Las heridas crónicas se caracterizan por tener un cambio constante respecto a las especies bacterianas aisladas mediante técnicas de laboratorio, donde el factor ambiental, el uso de agentes antimicrobianos y las características propias del huésped para la erradicación de infecciones son los mayores determinantes de la ecología bacteriana (44). Mediante estudios de cultivo de muestras aisladas se ha logrado realizar un análisis del perfil microbiológico encontrado sobre úlceras venosas crónicas. Las especies de bacterias más halladas en las úlceras son *S. aureus* (93,5%), *Enterococcus faecalis* (71,7%), *P. aeruginosa* (52,2%), *Staphylococcus coagulans* negativo (45,7%), *Proteus spp.* (41,3%) y bacterias anaerobias (39,1%) (45); sin embargo, nuevas técnicas de análisis molecular han generado una descripción más precisa de las especies bacterianas encontradas con mayor frecuencia en heridas crónicas según su tipo (41) (tabla 1).

Tabla 1. Microbiota de biopelículas bacterianas en heridas crónicas

Tipo de herida	Especies identificadas
Crónica mixta	<i>Pseudomonas ssp, Rhodococcus erythropolis, Actinobacterium, Staphylococcus ssp, Haemophilus spp, Prevotella spp, Clostridium spp, Streptococcus spp, Bacteroides spp, Porphyromonas someroe.</i>
Úlceras de pie diabético	<i>Corynebacterium, Bacteroides, Peptoniphilus, Finegoldia, Anaerococcus, Streptococcus, Serratia, Staphylococcus, Prevotella, Porphyromonas, Actinomyces, Pseudomonas, Clostridium, Helococcus, Brevibacterium, Varibaculum, Aerococcus, Fusobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Peptoniphilus, Rhodopseudomonas, Enterococcus, Veillonella, Haemophilus, Acinetobacter, Morganelia, Proteus, Dialister, Stenotrophomonas, Peptococcus niger, Klebsiella, Gordonia, Delftia, Gemella, Corynebacterium, Salmonella, Fusobacterium, Varibacterium cambriense, Enterobacter, Eikonella, Anaerococcus, Hygenophaga, Alcaligenes faecalis, Escherichia coli, Sphingomonas, Acidovorax, Eubacterias, Bacteroides, Selenomonadaceae, Beviobacterium, Riemerella, Bradyrhizobium, Pantoea, Abiotropica, Citrobacter, Pseudoalteromonas, Granulicatella y bacterias desconocidas.</i>
Úlceras por presión	<i>Peptoniphilus, Serratia, Petococcus niger, Streptococcus, Finegoldia, Dialister, Pectobacterium, Enterobacter, Proteus, Veillionella, Clostridium, Corynebacterium striatum, Delftia, Enterococcus, Staphylococcus, Hydrogenophaga, Eggerthella, Prevotella, Varibaculum, Actinomyces europeus, Ferrimonas, Bacillus, Fusobacterium, Alcaligenes faecalis, Riemerella, stenotrophomonas, Shewanella, Eubacterium, Anerococcus, Klebsiella, Porphyromonas y bacterias desconocidas.</i>
Heridas malignas	<i>Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Corynebacterium striatum, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Klebsiella oxytoca, Fusobacterium necrophorum, Parvimonas micra, Petoniphilus asaccharolytica, Porphyromonas asacchariphyticus.</i>
Úlceras venosas en la pierna	<i>Enterobacter, Serratia, Stenotrophomonas, Proteus, Salmonella, Clostridium, Alcaligenes faecalis, Pseudomonas, Staphylococcus, Brevudimonas, Streptococcus, Acinetobacter, Enterococcus, Pantoea, Corynebacterium striatum, Peptoniphilus, Escherichia coli, Bacillus, Paennibacillus, Eubacterium, Klebsiella, Xanthomonas, Ferrimonas, Finegoldia, Dendrosporobacter quericalus, Shewanella algae, Helococcus, Achromobacter xylooxidans, Shigella y bacterias desconocidas</i>

Fuente. Elaboración con base en Cooper et al. (41).

Estudios observacionales sobre la influencia bacteriana en la cronicidad de heridas han demostrado el papel de la *P. aeruginosa* como una de las principales causas en el atraso del proceso de sanación; también se demostró que la presencia de su colonización bacteriana en úlceras venosas crónicas se ve relacionada con el aumento en el tamaño de la superficie en la úlcera (43,46).

Alteración en la reparación de las heridas

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y se encuentra expuesto al ambiente y todos sus estresores, incluyendo todo tipo de lesiones; es por esto que posee la capacidad de autorrepararse ante una lesión, funcionando como una barrera frente al medio ambiente (47). La piel cuenta con diferentes procesos para realizar su reparación, entre los que se encuentran la inflamación, la formación del coágulo, la proliferación celular y el remodelamiento de la matriz extracelular, los cuales en conjunto finalizan en la formación de una cicatriz (7,10,48). Cada uno de estos procesos lleva consigo el reclutamiento de células y activación de mediadores proinflamatorios que activan cascadas de señalización que facilitan el proceso de reparación y cicatrización (8).

Refiriéndonos a las heridas crónicas, en estas los procesos normales de reparación se ven alterados por diferentes factores, tanto externos como internos, que prolongan el tiempo normal de cada uno, caracterizado por un estado inflamatorio prolongado (49). Este estado proinflamatorio persistente predispone a una mayor contaminación, colonización bacteriana y posterior infección de la herida, impidiendo así la cicatrización y generando un círculo vicioso donde la herida no es capaz de cerrarse y permanece con elevados recuentos bacterianos (49,50).

Se han establecido parámetros para describir un estado de colonización crítica o una infección ya instaurada a nivel tisular tomando como punto de corte 10^{15} UFC por gramo de tejido; esta es la principal causa de prolongación en el tiempo de inflamación y curación de una herida (7,8,10). Otros factores como la hipoxia e isquemia son responsables de respuesta inmune alterada en pacientes con diabetes, consumo de alcohol o cigarrillo, estados de depresión o ansiedad, déficit de vitaminas y nutrientes e incluso consumo de algunos fármacos (8,51), repercutiendo en la regeneración celular y sanación del tejido afectado.

El paso de colonización a infección bacteriana involucra características como la carga biológica, virulencia del microorganismo, acción sinérgica entre bacterias y habilidad

del huésped de iniciar una respuesta inmune adecuada (7). Como ya se ha demostrado, las heridas crónicas son colonizadas por múltiples especies bacterianas y estas varían o se intercambian con el tiempo. Dependiendo del microorganismo que esté involucrado, este impedirá el proceso de cicatrización; los más estudiados, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, son *P. aeruginosa* y *S. aureus*, que a través de la expresión de toxinas, como la modulina, y enterotoxinas inducen la expresión de moléculas proinflamatorias alterando este proceso (52). De igual manera, los microorganismos más comúnmente aislados en heridas crónicas son *S. aureus* y *S. coagulasa* negativos (7,8).

La infección ocurre cuando la proliferación bacteriana excede la respuesta inmune del hospedero (7). Por lo general, los microorganismos se organizan en agregados polimicrobianos formando las biopelículas, lo que aumenta la virulencia, la resistencia a antibióticos y la evasión de la respuesta inmune del huésped (47,49).

Las heridas generan un ambiente óptimo para el desarrollo de las biopelículas debido a que el colágeno, la fibronectina y la laminina sirven de ligandos para la adhesión de las bacterias; por esta razón, un gran porcentaje de las heridas crónicas en humanos están infectadas con biopelículas bacterianas (7,36,51). Por consiguiente, se ha encontrado que las bacterias tienen acción contra las uniones celulares epiteliales, lo que altera la barrera epidérmica y explica por qué la infección de una herida por biopelículas bacterianas, impide la adecuada cicatrización, conllevando a un proceso crónico (47).

Mecanismos de resistencia a antimicrobianos asociados a la biopelícula

Son múltiples los aspectos que suscitan frente a la resistencia antimicrobiana asociada a biopelículas, pues esta se constituye como una respuesta adaptativa a ambientes hostiles para el crecimiento bacteriano. Uno de los aspectos relevantes es la estructura tridimensional de la biopelícula en sí misma, que gracias a su conformación e íntima conexión entre bacterias genera un ambiente microbiológico óptimo para la transferencia horizontal de genes, contribuyendo de esta manera a la generación de mecanismos de resistencia diferentes a los del estado planctónico del microorganismo (53). Cabe mencionar que los mecanismos de resistencia asociados a la biopelícula son adicionales a los que se encuentran en bacterias en estado planctónico, generando así tratamientos más complejos frente a infecciones y difícil erradicación de las mismas (54).

En el entendimiento de la resistencia antimicrobiana intervienen diferentes aspectos asociados a las biopelículas, entre ellos, y desde una visión general, se encuentran: heterogeneidad, células persistentes, presencia de matriz, bombas de eflujo, sistemas de comunicación (quorum sensing), respuesta general al estrés e inducción de fenotipos y genotipos específicos de biopelículas (55,56). La importancia de conocer los mecanismos de resistencia radica en poder abrir una puerta a nuevas estrategias terapéuticas guiadas para disminuir la resistencia asociada a la biopelícula; así pues, se ha descrito que las bacterias en las biopelículas adquieren una resistencia de 1000 veces y una tasa de mutación 100 veces mayor a la que puede conferir una bacteria en estado planctónico, lo cual trasciende al ámbito médico y se convierte en un reto clínico (54).

De acuerdo a esto, la heterogeneidad de la biopelícula se entiende por las diferencias en expresión génica, actividad metabólica e incluso resistencia antimicrobiana de las diferentes poblaciones celulares dentro de esta, lo cual está directamente relacionado con la disponibilidad de oxígeno y nutrientes en las diferentes áreas de la biopelícula (56,57). De acá surge el concepto de células persistentes, las cuales son células bacterianas con un metabolismo inactivo, en estado criptobiótico y que cuando son expuestas al antibiótico muestran cierta tolerancia, es decir, no son eliminadas por ellos; sin embargo, cuando estas mismas bacterias salen de ese estado y se exponen de nuevo al antibiótico, son sensibles.

El anterior mecanismo es muy importante en el ámbito médico ya que de alguna forma las bacterias muestran resistencia a la exposición de los antibióticos, un ejemplo de ello es la observación de subpoblaciones de *Staphylococcus epidermidis* en biopelículas (53). Si bien las células planctónicas son aquellas que permiten la dispersión de la biopelícula, las células persistentes que hacen parte de esta permiten la replicación lentamente debido a su metabolismo casi inerte, que en adición a un ambiente de hipoxia y de bajos nutrientes promueve la formación de las biopelículas de forma asincrónica y la expresión génica, además le confiere una mayor tolerancia a los antibióticos (53,58).

La matriz extracelular o glucocálix está compuesta por diferentes moléculas, entre las que se encuentran glicoproteínas, material genético, polisacáridos y enzimas capaces de degradar antibióticos. Dependiendo de su composición, espesor e incluso de las uniones celulares que participan en la matriz, las moléculas interfieren en el transporte y la penetrancia del antibiótico

limitando su difusión (56,57). Se han encontrado diferentes variables que van a determinar la penetración del antibiótico, como el tipo de cepa que compone la biopelícula, el ambiente en el que se encuentra, la disponibilidad de sustratos y de oxígeno que van a establecer el crecimiento de la biopelícula, las interacciones electrostáticas de la matriz e incluso el tipo de antibiótico. Algunas cepas de *P. aeruginosa* producen Psl o Pel, polisacáridos que intervienen en la resistencia antimicrobiana; por otro lado, para *Staphylococcus*, el Poly $\beta(1,6)$ -N-acetilglucosamina (PNAG) es el involucrado en estos mecanismos (54,56,59). Por último, la presencia de β -lactamasas en la matriz extracelular, de aquellas bacterias productoras de estas enzimas, es uno de los mecanismos de mayor importancia clínica debido a su capacidad de degradar los antibióticos, confiriendo mayor resistencia antibiótica (56).

Por otro lado, el *quorum sensing* es la interacción célula-célula, más conocida como la "comunicación bacteriana", que se encarga de regular la formación y desarrollo de la biopelícula mediante la expresión de diferentes genes en respuesta a la densidad de la población celular. En bacterias grampositivas, las moléculas son los metil péptidos, mientras que en gramnegativas son las N-acil homoserina lactonas. A través de estos se regulan procesos como la formación de la biopelícula, producción de la matriz extracelular e incluso secreción de factores de virulencia (60).

En cuanto al papel en la resistencia antimicrobiana, se han encontrado asociaciones en modelos con *P. aeruginosa* deficientes de *quorum sensing*, las cuales fueron más susceptibles a los antibióticos (56). De igual manera, se ha visto que un *quorum sensing* deficiente va a repercutir en el crecimiento de la biopelícula con menor producción de matriz extracelular, por consiguiente aumentando la penetración de antibióticos (57).

La biopelícula bacteriana frente a situaciones de estrés responde a través de inducción de señales y expresión de genes permitiendo cambiar su estructura y morfología para prevenir el daño celular y poder sobrevivir. "Como respuesta, la biopelícula expresa genes frente al estrés generando ..." fenotipos más tolerantes que permiten la adaptación al ambiente. Así mismo, en ambientes de inanición se limitan las tasas de crecimiento bacteriano, donde se ha visto una mayor resistencia a antibióticos (54). Cabe resaltar que el mecanismo de acción de los antibióticos es dirigido hacia

bacterias que se encuentran en ciclo de división celular, por lo que al cambiar su metabolismo y disminuir su crecimiento y división, no hay lugar, para acción del antibiótico; esto hace que se considere uno de los mecanismos de resistencia.

Diagnóstico de biopelículas en heridas crónicas

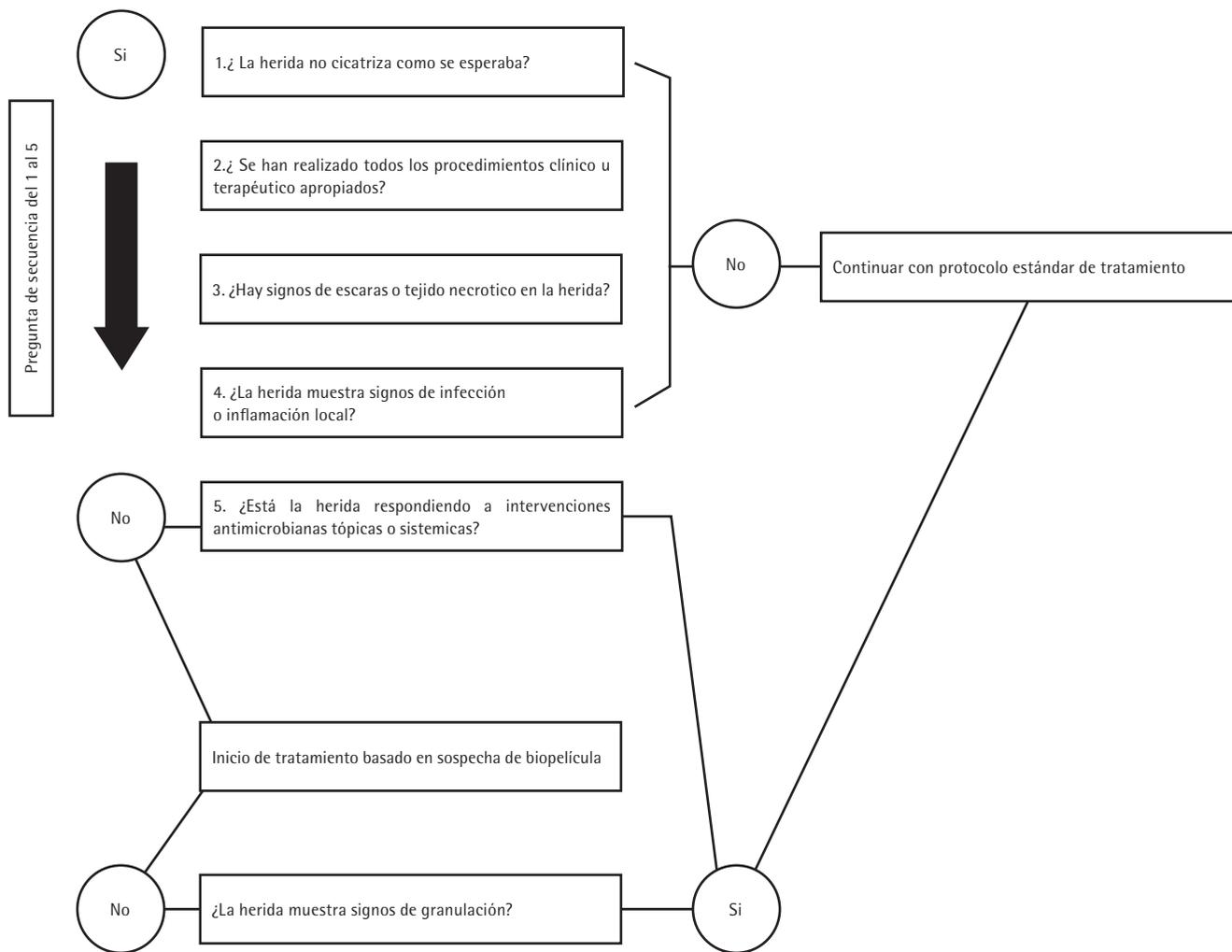
Como ya se mencionó, se estima que alrededor del 65% de todas las infecciones bacterianas están asociadas a biopelículas bacterianas (30), de modo que el diagnóstico microbiológico en las infecciones bacterianas asociadas a biopelículas es fundamental para dirigir la eficacia del tratamiento antimicrobiano y así disminuir esos mecanismos de resistencia antibiótica.

La identificación acertada de la biopelícula requiere de pruebas de laboratorio; sin embargo, pueden hacerse aproximaciones de impresión diagnóstica o sospecha clínica, como lo proponen Keast et al. (61), basándose en cuatro características clínicas para determinar la presencia de biopelícula (61): primero el fracaso a los antibióticos, segundo la presencia de una infección con duración >30 días, tercero la observación de tejido de granulación friable y cuarto la apariencia de un material gelatinoso en la superficie de la herida de fácil eliminación que crece con rapidez (62).

Otras características que permiten sospechar o inferir la presencia de biopelícula son la identificación de una capa translúcida, brillante y babosa sobre la herida, signos de infección local (eritema, edema, calor, efusión serosa o purulenta, etc.) o signos no visibles como la recalcitrancia a pesar de abordarse la herida de forma apropiada (62,63).

Debido a las dificultades que presentan los anteriores criterios y de la baja sensibilidad de interpretar estas características por el clínico, Percival et al. (64) presentaron una propuesta, teniendo en cuenta los criterios de Keast y colaboradores, con el fin de disminuir una errada sospecha de biopelícula. Se trata de una serie de 5 preguntas jerárquicas que responden a "sí" o "no", en la cual la pregunta número 5 frente a la opción de respuesta "no" indicaría una mayor sospecha de presencia de biopelícula y por tanto sería indicación para redireccionar el manejo (64). Las preguntas y respectivo algoritmo se presentan en la figura 4):

Figura 4. Algoritmo de sospecha de presencia de biopelícula en heridas



Fuente. Elaboración con base en Bjarnsholt et al. (62).

En este sentido, el diagnóstico de la biopelícula puede sospecharse clínicamente, pero su confirmación está dirigida a las pruebas de laboratorio, la cuales requieren una adecuada toma de muestra, procesamiento, cultivo y realización de técnicas de diagnóstico molecular e imágenes microscópicas de alta complejidad (65). Si bien estos parámetros son usados en todo tipo de tejidos infectados, frente a las heridas crónicas asociadas a biopelículas las técnicas convencionales resultan no ser idealmente extrapolables debido a su falta de estandarización diagnóstica y aplicación clínica (62,65). En consecuencia, teniendo en cuenta

la revisión de literatura actual en heridas crónicas, a continuación se describen los pasos para un adecuado diagnóstico de biopelículas:

1. **Toma de muestras:** en principio, la toma de la muestra depende de la localización de la lesión; esta se debe tomar antes del manejo antimicrobiano para asegurar el menor error posible en la evaluación de los microorganismos y las biopelículas. Dichos tejidos deben ser llevados a una cápsula o contenedor estéril, el cual debe ser procesado en un máximo de 24 horas y, dependiendo

el microorganismo en sospecha, debe mantenerse una temperatura de 2-8 °C para bacterias aerobias y a temperatura ambiente para las anaerobias o en los medios de transporte especializados para la toma de muestras (39,65).

- En el caso de las heridas crónicas, la Sociedad Europea de Microbiología Clínica e Infecciones recomendó el uso de biopsia para la confiabilidad del diagnóstico de las cepas bacterianas. Además, añadió que el uso de hisopos es inadecuado por la tasa de contaminación con agentes propios del epitelio circundante a la herida y la baja consideración de las bacterias en tejidos más profundos, como son los anaerobios. En el caso de una herida de moderada a grave en tejidos blandos, se resalta la recomendación de un análisis biopsiado de la base de la herida desbridada, esto con el objetivo de aumentar la confiabilidad de diagnóstico. En caso tal de imposibilidad de este análisis, la toma de una muestra con un hisopo de la base de la herida proporciona información para direccionar el tratamiento antimicrobiano (40,66).

2. Procesamiento de muestras: con frecuencia, la tinción de Gram es usada para la visualización de las morfologías bacterianas, infiriendo así posibles especies de dicha biopelícula y determinando la presencia de células inflamatorias que permiten evidenciar el proceso infeccioso en curso. Sin embargo, su especificidad y sensibilidad en reconocer estructuras características de las biopelículas no es el método más apropiado. Las técnicas de diagnóstico por microscopia y moleculares (microscopía láser confocal, FISH), son las más apropiadas, con la limitante que no están siempre disponibles en los laboratorios de diagnóstico microbiológico clínico (39,40,65,66).

3. Cultivo y técnicas de diagnóstico: existen dos modos de diagnóstico de la biopelícula, las cuales pueden ser a través de la observación microscópica o los cultivos. Estos últimos se usan según la ubicación de la muestra, ya que algunos casos, se requieren de un procesamiento a través de medios físicos como la sonicación, trituración o agitación para desprender los microorganismos bacterianos (40,66).

Para la técnica de cultivo es importante tener en cuenta las cepas bacterianas que pueden hacer parte de la biopelícula, ya que los medios habitualmente usados para el crecimiento y la identificación de los microorganismos infecciosos son enriquecidos y, por tanto, susceptibles a contaminación; es

por esto que se debe hacer con extremo cuidado para aumentar la sensibilidad y resultados acertados. De tal forma, el microbiólogo clínico, frente a una sospecha específica de un microorganismo, deberá disponer de distintos medios de cultivo, por ejemplo: para bacterias aerobias (agar sangre, agar chocolate) y medio selectivo para bacilos gram-negativos (agar MacConkey o similar), anaeróbico bacterias (agar Brucella o agar Schaedler) y estreptococos (agar sangre, agar CNA: agar sangre + colistina y ácido nalidíxico). Además, se debe inocular un medio líquido de enriquecimiento tal como caldo infusión cerebro corazón (BHI), caldo tripticosa soya (TSB) o tioglicolato, esto con el fin de permitir la adecuada identificación de la bacteria o bacterias causales de la herida crónica (65,67).

Otra de las características de las biopelículas *in vivo* como reto diagnóstico es su tamaño: son realmente pequeñas. Cuando se encuentran en tejidos llegan a medir de 4 a 20 micrómetros, mientras que en cuerpos extraños y superficies logran medir hasta 1.200 micrómetros. Por tanto, su reducido tamaño genera una difícil identificación por técnicas convencionales (68).

Dentro de las técnicas actuales para la detección de biopelículas, la microscopia electrónica de barrido es de las más usadas, preferentemente por su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, se intenta usar pruebas diagnósticas alternas como la microscopia defluorescencia o láser confocal; estas se realizan en centros de alta tecnología con un elevado costo.

Por otro lado, existen técnicas de acceso más fácil y más económicas como los cultivos en microplacas de 96 pozos; sin embargo, aunque tienen la probabilidad de detectar el microorganismo productor de la biopelícula, no lo hacen con la identificación de esta en el corto tiempo (69,70).

En el contexto de Colombia no es frecuente contar con estos medios diagnósticos, mucho menos en el ámbito clínico. Sin embargo, centros de educación superior en la línea de investigación microbiológica de alimentos han usado la microscopía electrónica de barrido para la determinación de estas biopelículas (71). Así pues, si se plantea la biopelícula bacteriana como un reto clínico, es preciso que se aumente la sospecha clínica de esta entidad por parte de los médicos y el personal de la salud, así como el interés por las buenas prácticas clínicas, para tomar pertinencia sobre los métodos diagnósticos. A continuación, se presenta un cuadro resumen de los métodos tradicionales y las técnicas moleculares (tabla 2):

Tabla 2. Métodos tradicionales y moleculares para la detección de biopelícula

Método	Tipo	Mecanismo	Límite de resolución	Ventajas	Desventajas
Métodos tradicionales (72,73)	Cultivo y microscopía óptica	<ul style="list-style-type: none"> Luz blanca o visible Reacciones químicas Morfología macroscópica 	0,2 μm (1500x)	<ul style="list-style-type: none"> Permite identificar la especie presuntiva formadora de biopelícula con facilidad Bajo costo y fácil disponibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> No detecta biopelículas Largo tiempo en la caracterización del microorganismo
	Microscopía por fluorescencia (FISH)	Luz ultravioleta	0,1 μm (2000x)	<ul style="list-style-type: none"> Identificación de las especies y mapeo de su ubicación Identificación de la biopelícula 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo de equipo y técnico Difícil disponibilidad Solo son observables las estructuras fluorescentes Uso limitado a suspensiones de células y secciones de tejidos finas
Métodos moleculares (74)	Microscopía láser confocal de barrido	Una luz láser acoplada a un microscopio óptico con un software de reconstrucción	0,1 μm (2000x)	<ul style="list-style-type: none"> Identificación de la biopelícula Reconstrucción estructural del tejido/muestra para obtener imágenes 2D o 3D Identificación y mapeo de las especies 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo de equipo y técnico Difícil disponibilidad Solo son observables las estructuras fluorescentes
	Microscopía electrónica de barrido	Haz de electrones que inciden sobre la muestra con recuperación de los electrones desviados	10 μm (500000x)	<ul style="list-style-type: none"> Identificación de la biopelícula Preparación corta de muestra Reconstrucción estructural de la muestra en 3D 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo técnico y de equipo Difícil disponibilidad No examina material vivo La deshidratación de la muestra podrá alterar el resultado
	Microscopía electrónica de transmisión	Haz de electrones que inciden sobre una muestra de una capa fina y se absorbe los electrones desviados	0,2 μm (5000000x)	<ul style="list-style-type: none"> Identificación de la biopelícula Proporciona información detallada de las estructuras celulares 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo de equipo y técnico Difícil disponibilidad No examina material vivo Preparación de la muestra prolongada

Fuente. Elaboración con base en Swanson *et al.* (74).

Tratamiento de heridas crónicas

Muchas técnicas se han planteado para el tratamiento de úlceras crónicas; sin embargo, no todas han sido efectivas o se correlacionan clínicamente. Cabe resaltar que la mayoría de estudios que las describen están basados en investigaciones en modelos animales o *in vitro* o son estrategias terapéuticas probadas en series pequeñas de pacientes o pocos ensayos controlados, que pueden no representar el espectro multifactorial que explica el desarrollo de una herida crónica (75).

A pesar de lo anterior, abordando la información disponible sobre identificación y tratamiento de biopelículas en heridas crónicas, en el 2017 se realizó un consenso de guías clínicas a cargo del Panel Global de Expertos de Heridas y Biopelículas en el que se obtuvieron los principales puntos clave con la evidencia clínica de mayor relevancia hasta el momento y con objetivo de tener impacto en el manejo de los pacientes con este tipo de patologías (76).

La preparación del lecho de la herida es una de las estrategias para el manejo de las heridas crónicas que

más ha tenido relevancia a nivel mundial desde que fue propuesta por Schultz y colaboradores en el 2003. Esta estrategia se basa en el manejo de la herida en orden de promover la sanación natural y facilitar la efectividad de otras medidas terapéuticas (77).

Usando el acrónimo TIME (por su sigla en inglés de *tissue, infection/inflammation, moisture, edge of wound*), la estrategia preparación del lecho de la herida describe los cuatro aspectos que deben ser abordados sistemáticamente con el fin de optimizar el manejo de una herida crónica mediante un enfoque multidisciplinario con la generación de nuevo conocimiento y estrategias a través del tiempo para el manejo de heridas crónicas (78). El abordaje TIME consiste en:

- 1. Tejido (*Tissue*):** se refiere al desbridamiento de tejido necrótico, no viable o extraño que está colonizado excesivamente por microorganismos relacionados con la formación de biopelículas bacterianas, que es sabido retrasan el proceso de sanación y representan un foco infeccioso, exacerbando la respuesta inflamatoria y progresión de la herida. El desbridamiento de la herida se realiza con el fin de remover el agregado microbiano, generando de esta manera una “ventana terapéutica” en la cual las bacterias son más susceptibles a la terapia antibiótica (79,80).
- 2. Infección/inflamación:** aborda la etiología de la herida mediante el uso de antisépticos tópicos o antibióticos sistémicos con el fin de controlar la infección cuyo componente principal es la presencia de biopelículas bacterianas a diferentes niveles de profundidad en la herida. En general, el uso de antibióticos sistémicos es debatido y solo debe usarse ante la presencia de una herida clínicamente infectada, preferible con el cultivo de una muestra de la herida o ante el aislamiento del microorganismo en sangre (79,81).

En este punto la incapacidad de alcanzar concentraciones bactericidas *in situ*, de potenciar la generación de cepas resistentes y de promover el cambio de la microflora bacteriana en la herida, son factores a tener en cuenta al momento de prescribir antibióticos sistémicos y antibióticos tópicos en heridas crónicas (82).

Por otro lado, el uso de antisépticos tópicos ha generado más aceptación debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana y rara resistencia, en particular en patógenos humanos (79). Su uso se recomienda en pacientes con alto grado de infección o presencia de infección local como coadyuvante ante el manejo de antibióticos sistémicos;

entre ellos se destaca el uso de clorhexidina, sales de plata, yodo-povidona, permanganato de potasio y hasta elementos cotidianos como la miel y el ácido acético (83,84).

- 3. Desequilibrio de la humedad (*moisture*):** un pilar fundamental del manejo en heridas crónicas se basa en el manejo de la humedad para tener condiciones óptimas para la sanación de la herida, lo cual incluye el manejo por medio de curaciones, limpieza del exudado y protección del tejido periférico a la lesión (85).
- 4. Borde de la herida, evolución tórpida, falta sanación (*Edge*):** la apariencia del borde de la lesión suele ser uno de los marcadores más sensibles relacionados con una pobre progresión de sanación. La falla de migración epitelial de las células desde el borde al tejido de granulación explica la falla de progresión favorable, que solo se alcanza cuando los otros factores ya mencionados en la estrategia TIME son alcanzados (86).

Conclusión

La presencia de biopelículas bacterianas, y en algunos casos de múltiples especies, es uno de los factores de mayor contribución en el desarrollo de heridas crónicas. Dichas estructuras, mediante diferentes mecanismos, son capaces de generar permanencia/persistencia de la infección, evadiendo tanto mecanismos del huésped como tratamientos convencionales como las terapias antibióticas. Por esta razón, resulta de gran importancia conocer y entender la formación de las biopelículas, correlacionando conceptos clave para lograr terapias dirigidas y efectivas en el diagnóstico y tratamiento de las heridas crónicas.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

Financiación

Este artículo hace parte de los resultados obtenidos de la financiación del proyecto PCI-2016-8873 convocatoria interna. Modalidad semilleros de Investigación.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Hugo Cardenas y la Dra. Zoila Castañeda por su apoyo y colaboración. A la facultad de medicina de la Universidad El Bosque y a la vicerrectoría de investigaciones por el soporte brindado para la realización y publicación de este artículo de revisión.

Referencias

1. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:435-64. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
2. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS.* 2017;125(4):272-5. DOI: 10.1111/apm.12686.
3. Lappin-Scott H, Burton S, Stoodley P. Revealing a world of biofilms--the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(11):781-7. DOI: 10.1038/nrmicro3343.
4. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013;(136):1-51. DOI: 10.1111/apm.12099.
5. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care.* 2010;19(2):45-6. DOI: 10.12968/jowc.2010.19.2.46966.
6. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):37-44. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.
7. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):2-10. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x.
8. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29. DOI: 10.1177/0022034509359125.
9. Kalan LR, Brennan MB. The role of the microbiome in nonhealing diabetic wounds. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1435(1):79-92. DOI: 10.1111/nyas.13926.
10. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: A review of current management and treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599-610. DOI: 10.1007/s12325-017-0478-y.
11. Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2017;6(1):15. DOI: 10.1186/s13643-016-0400-8.
12. Gottrup F. A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *Am J Surg.* 2004;187(5A):38S-43S. DOI: 10.1016/S0002-9610(03)00303-9.
13. González-Consuegra RV, Gómez-Ochoa AM. Contexto social, biológico, psicológico, económico y cultural en personas con heridas en miembros inferiores. *Av. enferm.* 2008;26(1):75-84.
14. Sánchez-Cruz LY, Martínez-Villarreal AA, Lozano-Platonoff A, Cárdenas-Sánchez A, Contreras-Ruiz J. Epidemiología de las úlceras cutáneas en Latinoamérica. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2016;44(3):183-97.
15. Vargas-Uricoechea H, Casas-Figueroa LÁ. Epidemiología de la diabetes mellitus en Sudamérica: la experiencia de Colombia. *Clin Investig Arterioscler.* 2016;28(5):245-56. DOI: 10.1016/j.arteri.2015.12.002.
16. World Health Organization (WHO). Diabetes Country Profiles, Colombia, 2016. WHO; 2018 [consultado 2018 Nov 5]. Disponible en: https://www.who.int/nmh/countries/2018/col_en.pdf?ua=1.
17. Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de Situación de Salud (ASIS). Colombia, 2017. Bogotá D.C.: MinSalud; 2018 [consultado 2018 Dic 5]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-nacional-2017.pdf>.
18. Armstrong DG, Wrobel J, Robbins JM. Guest Editorial: are diabetes-related wounds and amputations worse than cancer? *Int Wound J.* 2007;4(4):286-7. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2007.00392.x.
19. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis.* 2002;8(9):881-90. DOI: 10.3201/eid0809.020063.
20. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
21. Nazar J. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 2007;67(1):61-72. DOI: 10.4067/S0718-48162007000100011.
22. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1663-74. DOI: 10.2217/fmb.10.125.
23. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011;3(2):55-65. DOI: 10.4248/IJOS11026.
24. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics.* 2010;22(1):2-16. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.
25. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-75. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
26. Huertas-Valero MG, Zambrano-Eder MM. Biopelículas Bacterianas y su Importancia Clínica. *Innovación y Ciencia.* 2011;18(4):20-27
27. Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD. In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. *J Surg Res.* 2012;178(1):330-8. DOI: 10.1016/j.jss.2012.06.048.
28. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
29. Melton CN, Anderson GG. Biofilms and disease: A persistent threat. En: Caplan MJ. Reference module in biomedical sciences. Elsevier; 2018.
30. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(1):7-11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

31. Scali C, Kunitomo B. An update on chronic wounds and the role of biofilms. *J Cutan Med Surg.* 2013;17(6):371-6. DOI: 10.2310/7750.2013.12129.
32. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209. DOI: 10.1146/annurev-micro.56.012302.160705.
33. Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science.* 2010;328(5978):627-9. DOI: 10.1126/science.1188628.
34. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(5):990-1004. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x..
35. Røder HL, Sørensen SJ, Burmølle M. Studying bacterial multispecies biofilms: where to start? *Trends Microbiol.* 2016;24(6):503-13. DOI: 10.1016/j.tim.2016.02.019.
36. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, James GA, Stoodley P, Leaper D, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care.* 2017;26(1):20-5. DOI: 10.12968/jowc.2017.26.1.20.
37. Clinton A, Carter T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies. *Lab Med.* 2015;46(4):277-84. DOI: 10.1309/LMBNSWKUI4JPN7SO.
38. Ki V, Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2008;19(2):173-84. DOI: 10.1155/2008/846453.
39. Swanson T, Angel D, Sussman G, Cooper R, Haesler E, Ousey K, et al. *Wound infection in clinical practice: principles of best practice.* London: International Wound Infection Institute; 2016.
40. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms.* 2017;5(1):1-15. DOI: 10.3390/microorganisms5010009.
41. Cooper RA, Bjarnsholt T, Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge. *J Wound Care.* 2014;23(11):570. DOI: 10.12968/jowc.2014.23.11.570.
42. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimo UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(5):605-13. DOI: 10.1586/14787210.2015.1023291.
43. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2717-22. DOI: 10.1128/JCM.00501-08.
44. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microb Ecol.* 2017;73(3):710-21. DOI: 10.1007/s00248-016-0867-9.
45. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogh KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J.* 2006;3(3):225-31. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2006.00159.x.
46. Madsen SM, Westh H, Danielsen L, Rosdahl VT. Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *APMIS.* 1996;104(12):895-9. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1996.tb04955.x.
47. Roy S, Elgharably H, Sinha M, Ganesh K, Chaney S, Mann E, et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. *J Pathol.* 2014;233(4):331-43. DOI: 10.1002/path.4360.
48. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614-20. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741.
49. Gurtner GC, Neligan PC. Wound Healing. En: Gurtner GC, Neligan PC, editores. *Plastic Surgery: Volume 1: Principles* [Internet]. 4th ed. Stanford: Elsevier; 2018 [citado 2018 Mar 29]. p. 165-95. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.ezproxy.unbosque.edu.co/#!/content/book/3-s2.0-B9780323356947000138>.
50. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care.* 2008;17(11):502-8. DOI: 10.12968/jowc.2008.17.11.31479.
51. Bologna JL, Schaffer JV, Cerroni L. Biology of wound healing. En: Callen JP, Cowen EW, Hruza GJH, Jorizzo JL, Lui H, Requena L, et al., editores. *Dermatology* [Internet]. 4th ed. Londres: Elsevier; 2018 [citado 2018 Nov 5]. p. 2413-24. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.ezproxy.unbosque.edu.co/#!/content/book/3-s2.0-B9780702062759001410>.
52. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care.* 2008;17(8):333-41. DOI: 10.12968/jowc.2008.17.8.30796.
53. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(5):580-9. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.013.
54. Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules.* 2015;20(4):5286-98. DOI: 10.3390/molecules20045286.
55. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-9. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2.
56. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010.
57. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J.* 2017;11:53-62. DOI: 10.2174/1874285801711010053.
58. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2017;307(8):481-9. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.09.016.

59. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1743-50. DOI: 10.2217/fmb.15.69.
60. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(12):740-55. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.99.
61. Keast DH, Bowering CK, Evans AW, Mackean GL, Burrows C, D'Souza L. MEASURE: A proposed assessment framework for developing best practice recommendations for wound assessment. *Wound Repair Regen.* 2004;12(Suppl 3):S1-17. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.0123S1.x.
62. Bjarnsholt T, Cooper R, Fletcher J, Fromantin I, Kirketerp-Møller K, Malone M, et al. Tratamiento del biofilm [Internet]. Londres: Unión Mundial de Sociedades de Cicatrización de Heridas; 2016 [citado 2018 Nov 23]. Disponible en: <https://gneaupp.info/wp-content/uploads/2017/10/management-of-biofilms-wuwhs-en-castellano.pdf>.
63. Cutting KF, White RJ. Revisión de criterios para la identificación de infecciones en heridas. *Gerokomos.* 2006;17(1):39-47.
64. Percival SL, Vuotto C, Donelli G, Lipsky BA. Biofilms and wounds: an identification algorithm and potential treatment options. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(7):389-97. DOI: 10.1089/wound.2014.0574
65. Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(6):375-81. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.04.006.
66. 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. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(Suppl 1):S1-25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.
67. Chandan S, Sashwati R, Gordillo G. Wound healing. En: Gurtner GC, Neligan PC, editores. *Plastic Surgery: Volume 1: Principles.* 4th ed. Stanford: Elsevier; 2017. p. 165-95.
68. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013;21(9):466-74. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
69. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2018;75(2):79-88. DOI: 10.24875/BMHIM.M18000012.
70. Vanegas M, Correa N, Morales A, Martínez A, Rúgeles L, Jiménez F. Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Revista MVZ Córdoba.* 2009;14(2):1677-83.
71. Mora-Collazos A, Bravo-Montaño E. Diversidad bacteriana asociada a biopelículas anódicas en celdas de combustible microbianas alimentadas con aguas residuales. *Acta biol. Colomb.* 2017;22(1):77-84. DOI: 10.15446/abc.v22n1.55766.
72. Mühlhauser MM, Rivas L. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2014;25(3):569-79. DOI: 10.1016/S0716-8640(14)70072-0.
73. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(8):601-8. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
74. Swanson T, Angel D, Sussman G, Coper R, Haesler E, Ousey K, et al. La infección de las heridas en la práctica clínica [Internet]. Londres: International Wounds infection institute; 2016 [citado 2018 Nov 26]. Disponible en: http://www.woundinfection-institute.com/wp-content/uploads/2016/11/IWII-Consensus-2016_WebES.pdf.
75. Jones CE, Kennedy JP. Treatment Options to Manage Wound Biofilm. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1(3):120-6. DOI: 10.1089/wound.2011.0300.
76. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, Leaper DJ, McBain AJ, Malone M, et al. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen.* 2017;25(5):744-57. DOI: 10.1111/wrr.12590.
77. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen.* 2003;11(Suppl 1):S1-28.
78. European Wound Management Association (EWMA). Preparación del Lecho de la Herida en la Práctica. Londres: Medical Education Partnership LTD; 2004.
79. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T, Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?(*). *Int Wound J.* 2012;9(Suppl 2):1-19. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2012.01097.x.
80. Eberlein TW. Management of wound biofilm Made Easy. Londres: Wounds UK; 2017.
81. Lipsky BA, Dryden M, Gottrup F, Nathwani D, Seaton RA, Stryja J. Antimicrobial stewardship in wound care: a Position Paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(11):3026-35. DOI: 10.1093/jac/dkw287.
82. Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *Int Wound J.* 2013;10(Suppl 1):9-14. DOI: 10.1111/iwj.12175.
83. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis.* 2009;49(10):1541-9. DOI: 10.1086/644732.
84. Cooper R, Kirketerp-Møller K. Non-antibiotic antimicrobial interventions and antimicrobial stewardship in wound care. *J Wound Care.* 2018;27(6):355-77. DOI: 10.12968/jowc.2018.27.6.355.
85. Snyder RJ, Fife C, Moore Z. Components and quality measures of DIME (devascularized tissue, infection/inflammation, moisture balance, and edge preparation) in wound care. *Adv Skin Wound Care.* 2016;29(5):205-15. DOI: 10.1097/01.ASW.0000482354.01988.b4.
86. Bianchi T, Wolcott RD, Peghetti A, Leaper D, Cutting K, Polignano R, et al. Recommendations for the management of biofilm: a consensus document. *J Wound Care.* 2016;25(6):305-17. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.6.305.